

# Diplomarbeit

## Kontraktilität und Kalzium-Homöostase in NAMPT-haploinsuffizienten Maus-Kardiomyozyten

eingereicht von

**Hendrik Paul Jöst**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde**

**(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt an der

**Klinischen Abteilung für Kardiologie**

**Universitätsklinik für Innere Medizin**

unter der Anleitung der Betreuer

Assoz. Prof. Dr. Simon Sedej

Dr. Mahmoud Abdellatif, MSc

Graz, 21.02.2022

## EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 21.02.2022

Hendrik Jöst e.h.

## DANKSAGUNG

Ich möchte mich hiermit bei allen Menschen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Diplomarbeit unterstützt haben.

Im Besonderen gilt mein Dank Assoz.-Prof. Dr. Simon Sedej, der mit seiner unermüdlichen und geduldigen Art diese Arbeit erst möglich gemacht hat und mir in den letzten Jahren Einblicke in ein faszinierendes Feld der Forschung geben konnte, sowie Dr. Mahmoud Abdellatif, der mit seiner Kompetenz in Statistischer Analyse eine sehr große Hilfe gewesen ist.

Zudem möchte ich meinen Eltern danken, ohne deren Unterstützung ich diesen Weg nie hätte beschreiten können, sowie meiner Freundin für ihren unentwegten Beistand während der Erstellung dieser Arbeit.

# INHALTSVERZEICHNIS

Eidesstattliche Erklärung	I
Danksagung	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	V
Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	VII
Zusammenfassung	IX
Abstract	X
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Übersicht	1
1.2 Was ist Herzinsuffizienz?	2
1.3 Altersassoziierte Herzinsuffizienz: HFpEF und HFrfEF	3
1.4 HFpEF Epidemiologie	4
1.4.1 Prävalenz und Inzidenz	4
1.4.2 Risikofaktoren	7
1.5 HFpEF Pathophysiologie	8
1.5.1 Hypertrophie des Herzmuskels	8
1.5.2 Fibrosierung des Herzmuskels	9
1.5.3 Elektromechanische Kopplung	9
1.5.4 Funktion des intrazellulären Kalziums im Rahmen der Sarkomerkontraktion	10
1.5.5 Sarkomerfunktion bei HFpEF	11
1.6 Potenzielle HFpEF Therapien	12
1.6.1 Medikamentöse Therapieoptionen	13
1.6.2 Geräteunterstützte Intervention	13
1.6.3 Körperliche Aktivität, Kalorienrestriktion und bariatrische Operationen gegen Übergewicht	14
1.7 NAD <sup>+</sup> und Nikotinamid als zukünftige HFpEF Therapie?	16
1.7.1 NAD <sup>+</sup> und Nikotinamid Mangel im Rahmen der HFpEF	17
1.7.2 NAD <sup>+</sup> als Bestandteil der Signaltransduktion	18
1.7.3 NAMPT-Bedeutung und Funktion	19
1.8 Hypothese der Diplomarbeit	20
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>21</b>
2.1 Mäuse	21
2.2 Lösungen	22
2.3 Isolationsprozess	22
2.3.1 Herzentnahme und Kanülierung	22
2.3.2 Langendorff-Setup und Kalzium Aufbau	23
2.4 Messungen und Pacing-Protokoll	25
2.5 Datenanalyse	26
2.6 Grafische Interpretation und statistische Auswertung	28

3	Ergebnisse	29
4	Diskussion	38
4.1	Mögliche Einschränkungen/Bias	41
4.1.1	Systematisches Bias	41
4.1.2	Selektionsbias	41
5	Literaturverzeichnis	42
6	Appendix	46

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ATP	Adenosintriphosphat
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium-Ion
CD38	Cluster of differentiation 38, zyklische ADP-Ribose-Hydrolase
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Cre	Engl. Cyclization recombination
Dep v Fura	Engl. Departure velocity of Fura-2AM signal
Dep v Sarc	Engl. Departure velocity of the sarcomere shortening/re-lengthening signal
Dep v t Fura	Engl. Departure velocity time of Fura-2AM signal
Dep v t Sarc	Engl. Departure velocity time of the sarcomere shortening/re-lengthening signal
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
Fisher's LSD	Engl. Fisher's least significant difference
FURA-2AM	Fura-2-acetoxymethylester
HFmrEF	Heart failure with mid-range ejection fraction, Herzinsuffizienz mit mäßig eingeschränkter Ejektionsfraktion
HFpEF	Heart failure with preserved ejection fraction, Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion
HFrfEF	Heart failure with reduced ejection fraction, Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion
loxP	Engl. Locus of X-over P1
MLC2a	Engl. myosin light chain 2a
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NAMPT	Nikotinamid-Phosphoribosyltransferase
PDE9	Phosphodiesterase Typ 9
PKG	Proteinkinase G
Ret v Fura	Engl. Return velocity of Fura-2AM signal
Ret v Sarc	Engl. Return velocity of the Sarcomere signal
Ret v t Fura	Engl. Return velocity time of Fura-2AM signal
Ret v t Sarc	Engl. Return velocity time of the Sarcomere Signal

<b>SEM</b>	Standardfehler des Mittelwerts (Engl. Standard error of the mean)
<b>SERCA2a</b>	Engl. Sarcoplasmic-endoplasmic reticulum calcium ATPase 2a/ Kalzium-ATPase 2a des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums
<b>SR</b>	Sarkoplasmatisches Retikulum

# TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Tabelle 1: Inzidenz der HFpEF in ausgewählten Kohortenstudien

Tabelle 2: Transientenparameter und statistische Analyse

Tabelle 3: 'Mixed-effect' Analyse (p-Werte)

Tabelle 4: Perfusionslösung

Tabelle 5: Perfusionspuffer

Tabelle 6: Kanülierungslösung

Tabelle 7: Myozytenverdauungslösung

Tabelle 8: Myozyten Stopplösung 1

Tabelle 9: Myozyten Stopplösung 2

Tabelle 10: Kalzium Reihe

Tabelle 11: Tyrode-Lösung

Abbildung 1: Relativer Anstieg der Bevölkerung über 65 Jahren

Abbildung 2: Zunahme der PatientInnen mit Herzinsuffizienz bis 2030

Abbildung 3: Prävalenz der HFpEF und HFrEF nach Alter

Abbildung 4: Komorbiditäten bei PatientInnen mit HFpEF

Abbildung 5: Schematische Darstellung der Elektromechanischen Kopplung

Abbildung 6: Position des Titins innerhalb des Sarkomers

Abbildung 7: Einfluss von NAD<sup>+</sup>-auf Organfunktionen

Abbildung 8: Schematische Darstellung des Biosynthesewegs von NAD<sup>+</sup>

Abbildung 9: Schematischer Aufbau des Langendorff Setups

Abbildung 10: Exemplarische Transientenanalyse/Auswahl

Abbildung 11: Exemplarische Transientenanalyse/Kurvenmodellierung

Abbildung 12: Baseline Analyseparameter

Abbildung 13: Relative Kontraktion

Abbildung 14: Maximale Kontraktionsgeschwindigkeit

Abbildung 15: Zeit bis zur maximalen Kontraktion

Abbildung 16: Maximale Kontraktion

Abbildung 17: Maximale Relaxationsgeschwindigkeit

Abbildung 18: Zeit bis zur maximalen Relaxation

Abbildung 19: Zeit bis zur 50%-igen Kontraktion

Abbildung 20: Zeit bis zur 90%-igen Relaxation

## ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund: Für die Herzinsuffizienz mit erhaltener Auswurfsfraktion (HFpEF; heart failure with preserved ejection fraction) gibt es – im Gegensatz zur Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion (HFrEF) – keine evidenzbasierte Kausaltherapie und wird bisher rein symptomatisch behandelt. Diese Arbeit hat zum Ziel, das Wissen um die Pathomechanismen in Bezug zum Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD<sup>+</sup>) Stoffwechsel der Herzmuskelzellen zu erweitern und somit das Verständnis für diese Erkrankung zu verbessern.

Hypothese: In dieser Diplomarbeit wurde der Hypothese nachgegangen, ob verminderte NAD<sup>+</sup> Bioverfügbarkeit aufgrund von Nikotinamid-Phosphoribosyltransferase Haploinsuffizienz (*NAMPT*<sup>+/-</sup>) die Kalzium-Homöostase beeinträchtigt und die Kinetik von Kontraktion und Relaxation in isolierten Maus-Kardiomyozyten verlangsamt.

Methoden: Es wurden einzelne Kardiomyozyten aus Nikotinamid-Phosphoribosyltransferase haploinsuffizienten *Nampt*<sup>flox/wt</sup> *MLC-Cre*<sup>+</sup> (*Nampt*<sup>+/-</sup>) Mäusen sowie *Nampt*<sup>flox/wt</sup> *MLC-Cre*<sup>-</sup> (*Nampt*<sup>+/+</sup>) Mäusen mithilfe eines liberasebasierten Isolationsprotokolls sowie eines Langendorff-Setups isoliert. Diese kardialen Myozyten wurden mit ratiometrischem Fura-2AM beladen, einem Ca<sup>2+</sup> sensitiven Farbstoff, und in der Folge mit Frequenzen von 1 bis 4 Hertz elektrisch stimuliert. Mithilfe eines Epilfluoreszenzmikroskops sowie einem Myozytenkontraktionsaufnahmesystem wurden zeitgleich Ca<sup>+</sup> Transienten und Sarkomerverkürzungen der Kardiomyozyten gemessen.

Ergebnisse: Es konnten Unterschiede der *Nampt*<sup>+/-</sup> und *Nampt*<sup>+/+</sup> Mäuse aufgezeigt werden, diese betreffen die Sarkomerlänge, maximale Kontraktion, Zeit zur maximalen Kontraktion, Relaxationsgeschwindigkeit sowie Zeit zur 90%igen Relaxation. Entgegen der Hypothese zeigten *Nampt*<sup>+/-</sup> Kardiomyozyten dabei nicht in allen Parametern einen schlechteren Phänotyp. Dies könnte in Teilen durch eine beobachtete Reduktion des NAD<sup>+</sup>-Gehaltes der *Nampt*<sup>+/-</sup> Kardiomyozyten um 15% anstatt der aufgrund der Haploinsuffizienz erwarteten 50% bedingt sein.

Conclusio: Die vorliegenden Ergebnisse deuten auf komplexe Interaktionen zwischen einer reduzierten intrazellulären Verfügbarkeit von NAD<sup>+</sup>, Kalzium-Homöostase und die Kinetik von Kontraktion und Relaxation in *Nampt*<sup>+/-</sup> Maus-Kardiomyozyten hin. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um diese unerwarteten Unterschiede zu erklären.

## ABSTRACT

Background: Heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF), unlike heart failure with reduced ejection fraction (HFrEF), still lacks evidence-based therapy and instead its treatment focuses on the alleviation of symptoms. The aim of this work is to improve the understanding for this disease and to put the pathophysiology into perspective with relation to the metabolism of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) in mouse cardiomyocytes.

Hypothesis: We tested the hypothesis that NAD<sup>+</sup> deficiency, induced by cardiomyocyte-specific nicotinamide-phosphoribosyltransferase (NAMPT) haploinsufficiency, impairs calcium homeostasis and contraction/relaxation kinetics in freshly isolated mouse cardiomyocytes.

Methods: Single cardiomyocytes were isolated from nicotinamide-phosphoribosyltransferase haploinsufficient *Nampt*<sup>flox/wt</sup> *MLC-Cre*<sup>+</sup> (*Nampt*<sup>+/-</sup>) mice as well as *Nampt*<sup>flox/wt</sup> *MLC-Cre*<sup>-</sup> (*Nampt*<sup>+/+</sup>) mice using a standard liberase-based isolation protocol and a Langendorff-setup. Cardiac myocytes were loaded with the ratiometric Fura-2AM Ca<sup>2+</sup>-sensitive dye and electrically stimulated at 1 to 4 Hz to simultaneously measure Ca<sup>+</sup> transients and sarcomere shortening using an epifluorescent microscope combined with a myocyte contractility recording system, respectively.

Results: At baseline, cardiomyocytes of *Nampt*<sup>+/-</sup> and *Nampt*<sup>+/+</sup> mice showed differences in sarcomere length, peak shortening, time to peak, return velocity as well as time to 90% relaxation. However, at odds with our hypothesis, *Nampt*<sup>+/-</sup> cardiomyocytes did not show a significantly inferior phenotype in each and every one of these parameters. This might be explained, at least in part, by the finding that *Nampt*<sup>+/-</sup> cardiomyocytes exhibited a 15% reduction in NAD<sup>+</sup> content, instead of the expected 50% due to haploinsufficiency.

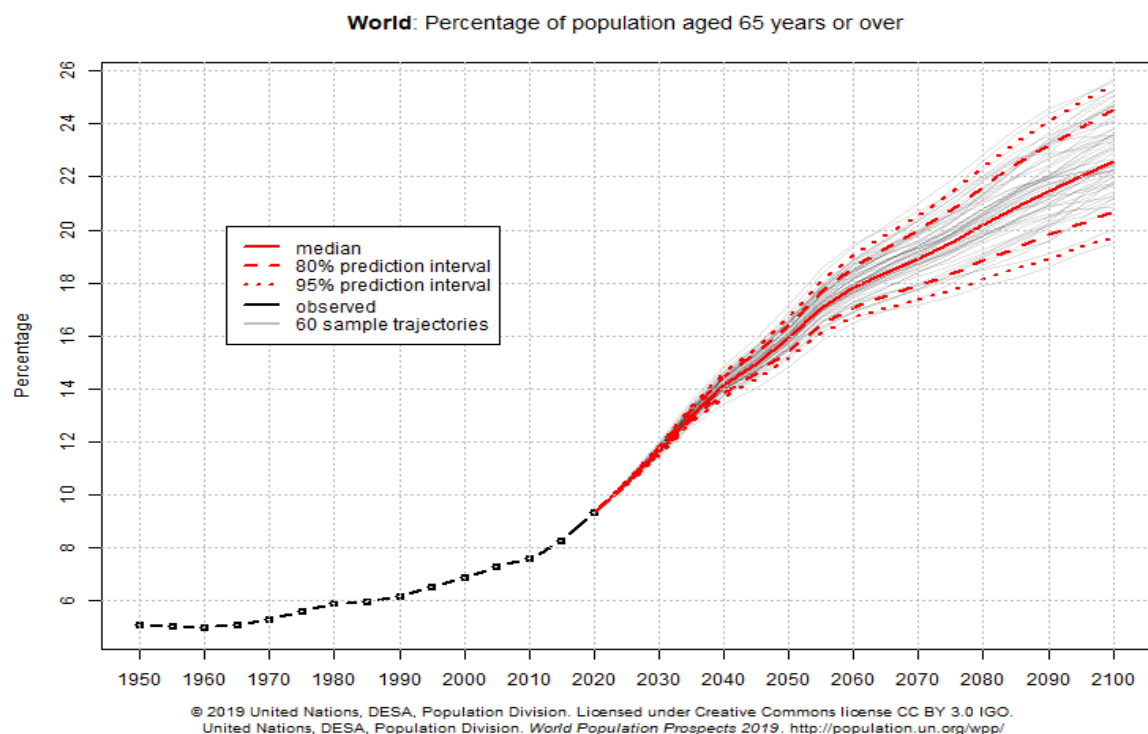
Conclusion: The results point towards complex interactions between reduced intracellular NAD<sup>+</sup> bioavailability, global Ca<sup>2+</sup> homeostasis and contraction/relaxation kinetics in *Nampt*<sup>+/-</sup> cardiomyocytes. Further research is warranted to explain these unexpected results.

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 ÜBERSICHT

Herz-Kreislauf-Erkrankungen haben in den letzten Jahrzehnten insbesondere in der westlichen Welt einen starken Anstieg der Fallzahlen erfahren, sie sind, noch vor tumorassoziierten Erkrankungen, verantwortlich für die meisten Todesfälle in Europa und Nordamerika. Allein in der EU sind im Jahr 2016 1.8 Millionen Todesfälle auf Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems zurückzuführen (Eurostat, 2021).

Die Konsequenzen dieses Umstandes tragen zu den immer weiter steigenden Kosten des Gesundheitssystems bei und wirken sich negativ auf den Arbeitsmarkt aus. Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind für eine Vielzahl an chronischen Erkrankungen mitverantwortlich und stellen somit eine der größten Gesundheits- und sozioökonomischen Herausforderungen der westlichen Welt dar. Zusätzlich zu diesem Umstand wird auch in Zukunft ein relativer Anstieg der Bevölkerungsgruppe über 65 Jahren erwartet, ein demographischer Wandel ist in beinahe allen Ländern zu beobachten. (Abbildung 1)



**Abbildung 1: Relativer Anstieg der Bevölkerung über 65 Jahren**

Abgebildet ist die erwartete demographische Entwicklung der Bevölkerungsgruppe über 65 Jahren im Verhältnis zur Gesamtbevölkerung bis zum Jahr 2100. Abbildung übernommen von UN DESA World Population Prospects 2019.

Im Rahmen dessen sticht die Herzinsuffizienz heraus, sie stellt innerhalb der kardiovaskulären Erkrankungen eine der Hauptursachen für Morbidität und Mortalität dar (Mishra & Kass, 2021). Herzinsuffizienz ist ein Krankheitsbild, das sich nicht nur auf das Herz selbst beschränkt, sondern viele weitere Organe des Körpers in Mitleidenschaft zieht. So sind neben dem Herz und den Gefäßen auch die Lunge, Leber, Nieren, das vegetative Nervensystem und die Muskeln von dieser Erkrankung betroffen (Mishra & Kass, 2021, Dunlay *et al.*, 2017). Während es für einige kardiovaskuläre Erkrankungen inzwischen adäquate Therapieformen gibt, so hat sich bis heute bei einer Form der Herzinsuffizienz, der HFpEF (Engl. heart failure with preserved ejection fraction) keine Behandlungsstrategie als erfolgreich erwiesen. Im Rahmen dieser Diplomarbeit soll ein Beitrag dazu geleistet werden, das Verständnis für diese Form der Herzinsuffizienz zu verbessern und in Bezug zur Pathophysiologie der Defizienz von Nikotinamidadenindinukleotid zu setzen.

## **1.2 WAS IST HERZINSUFFIZIENZ?**

Als Herzinsuffizienz wird das Unvermögen des Herzmuskels bezeichnet, durch seine Pumpleistung den Sauerstoffbedarf des Körpers zu bedienen. Die Ursachen für dieses Unvermögen können dabei vielgestaltig sein. Herzinsuffizienz kann als Konsequenz chronischer Erkrankungen auftreten, sich im Rahmen eines akuten Geschehens entwickeln, oder aber sich im Alter als Begleiterkrankung manifestieren. Abhängig von der Diskrepanz zwischen dem Bedarf des Körpers und der Leistung des Herzmuskels sind die Symptome mehr oder weniger schwerwiegend. Grundsätzlich treten Symptome wie Atemnot, Erschöpfung, Schwindel, Herzrhythmusstörungen, Zyanose, Lungenstauungen und Ödeme auf, zudem ist eine insgesamt Leistungsabnahme zu beobachten. Abhängig von der Schwere der Insuffizienz treten diese Symptome erst bei höherer Belastung auf (leichte Herzinsuffizienz), bei geringer Belastung, oder aber schon im Ruhezustand (schwere Herzinsuffizienz). Eine Einteilung der Herzinsuffizienz kann anhand des Schweregrades (NYHA-Stadien), des betroffenen Teils des Herzens (Linksherzinsuffizienz, Rechtsherzinsuffizienz oder globale Insuffizienz) oder aber nach dem zugrunde liegenden pathophysiologischen Phänotyp erfolgen.

### 1.3 ALTERSASSOZIIERTE HERZINSUFFIZIENZ: HFPEF UND HFREF

Bei der Herzinsuffizienz gilt es, zwei Phänotypen voneinander abzugrenzen: Einerseits die Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion (Engl. heart failure with reduced ejection fraction, HFrEF) und andererseits die Herzinsuffizienz mit (annähernd) physiologischer Ejektionsfraktion (Engl. heart failure with preserved ejection fraction, HFpEF). Unterscheidungsmerkmal ist hier die Linksherz-Auswurffraktion (linksventrikuläre Ejektionsfraktion, LV-EF), die definierend für die Erkrankungsform steht. PatientInnen mit einer LV-Auswurfsfraktion unter 40% (bei einem physiologischen Normalwert zwischen 60% und 70%) werden in die Kategorie der HFrEF eingeteilt. PatientInnen mit einer EF über 50% als HFpEF-PatientInnen definiert, und PatientInnen mit einer LV-EV zwischen 40% und 49% in die Kategorie der HFmrEF (Engl. heart failure with mid-range ejection fraction) eingeteilt. Diese Unterscheidung ist notwendig, da die weitere Therapie der Erkrankungsform maßgeblich von der Art der Herzinsuffizienz bestimmt wird (McMurray, 2010, Redfield, 2016, Dunlay *et al.*, 2017). Die Hälfte der PatientInnen, die an Herzinsuffizienz leiden, kann der Gruppe der HFpEF zugeordnet werden (Bursi *et al.*, 2006, Lenzen *et al.*, 2004, Brouwers *et al.*, 2013, Dunlay *et al.*, 2017, Mishra & Kass, 2021). Während es für die HFrEF Therapieoptionen gibt, die Mortalität und Morbidität zufriedenstellend behandeln können, ist *bis dato* keine Therapie zur Behandlung der HFpEF zugelassen. Da rund 50% aller von Herzinsuffizienz betroffenen PatientInnen an der Unterform HFpEF leiden, ergibt sich so eine große Herausforderung der kardiovaskulären und geriatrischen Medizin, für diese Form zukünftig eine suffiziente Therapieform zu etablieren.

Die zentrale Problematik der HFpEF stellt die diastolische Dysfunktion dar. Um ein adäquates Herzzeitvolumen zu gewährleisten, muss das Herz nach jedem Schlag wieder relaxieren, um eine erneute Füllung der Ventrikel zu ermöglichen. Dieser Abschnitt der Herzaktion ist als Diastole bezeichnet, und ist bei der HFpEF eingeschränkt. Die Bezeichnung „preserved ejection fraction“ ist mitunter irreführend, da sie einen physiologischen Herzschlag suggeriert. Sie bezieht sich jedoch nur auf das Verhältnis von Auswurfsmenge zu Gesamtvolumen des Blutes im Herzen. Dieses Gesamtvolumen ist allerdings, aufgrund einer unzureichenden Füllung während der Diastole, reduziert. Die Auswurfsfraktion ist somit prozentuell zwar vergleichbar mit gesunden Herzen, absolut gesehen haben jedoch Herzen mit diastolischer Dysfunktion ein deutlich geringeres Herzzeitvolumen.

Aufgrund der beschränkten Modalitäten hinsichtlich der Therapie der HFpEF zeigt sich eine recht hohe Sterblichkeit innerhalb der ersten Jahre nach Diagnosestellung, so sind nach einem Jahr, abhängig von der betrachteten Studie, ein Fünftel bis zu knapp einem Drittel der erstdiagnostizierten PatientInnen verstorben (20-29%) (Owan *et al.*, 2006, Gerber *et al.*, 2015, Dunlay *et al.*, 2017)

Fünf Jahre nach Diagnose verstarben über die Hälfte der PatientInnen, je nach Studie werden hier Werte zwischen 53% und 74% beschrieben (Gerber *et al.*, 2015, Lee *et al.*, 2009, Owan *et al.*, 2006, Dunlay *et al.*, 2017). Je höher hierbei die Anzahl der Komorbiditäten ist, desto größer wird dabei das Risiko, an HFpEF zu versterben (Paulus & Tschöpe, 2013, Dunlay *et al.*, 2017). Diese Komorbiditäten müssen nicht zwangsläufig kardiovaskulären Ursprung haben, sowohl Nierenerkrankungen, reduzierte kognitive Kapazität, als auch reduzierte körperliche Aktivität haben Einfluss auf das Sterberisiko (Paulus & Tschöpe, 2013, Dunlay *et al.*, 2017). Aus genannten Gründen ist es daher nachvollziehbar, dass in mehreren Studien gezeigt werden konnte, dass PatientInnen mit HFpEF gegenüber der Gesamtbevölkerung alters- und geschlechtsunabhängig ein deutlich erhöhtes Sterberisiko aufweisen (Lee *et al.*, 2009, Dunlay *et al.*, 2017).

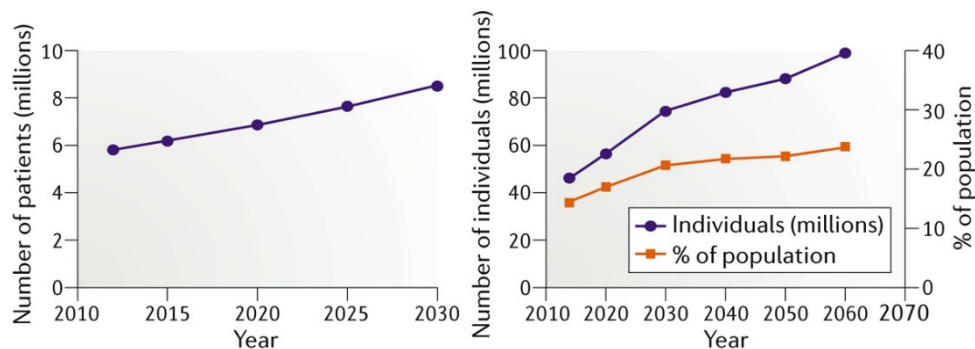
## **1.4 HFPEF EPIDEMIOLOGIE**

Folgende Zahlen hinsichtlich der epidemiologischen Situation der Herzinsuffizienz bzw. der Unterformen HFpEF und HFrEF beziehen sich vorwiegend auf Regionen der westlichen Welt, da sich hier die Studienlage am aussagekräftigsten darstellt.

### **1.4.1 Prävalenz und Inzidenz**

Mehrere Studien aus 2010 bis 2015 (Colby und Ortman, 2015, Finkelstein *et al.*, 2012, Boyle *et al.*, 2010, Dunlay *et al.*, 2017) wiesen eine Prävalenz der Herzinsuffizienz in den USA und Europa im Bereich von 1-14% aus; die Schwankungsbreite resultiert hierbei aus der Art der Datenerhebung und der Gruppe der Personen, die in die Studie miteingeschlossen wurden. Unter Einbezug aller Erwachsenen der Bevölkerung konnte eine Prävalenz der Erkrankung zwischen 1-3% angenommen werden. So hatten im Jahr 2012 etwa 5,8 Millionen Amerikaner eine diagnostizierte Herzinsuffizienz, dies macht 2,4% der Bevölkerung aus (Dunlay *et al.*, 2017). Laut Prognosen wird sich diese Zahl in den kommenden zwanzig Jahren weiter erhöhen, da eine Alterung der Bevölkerung zu erwarten ist und damit einhergehend

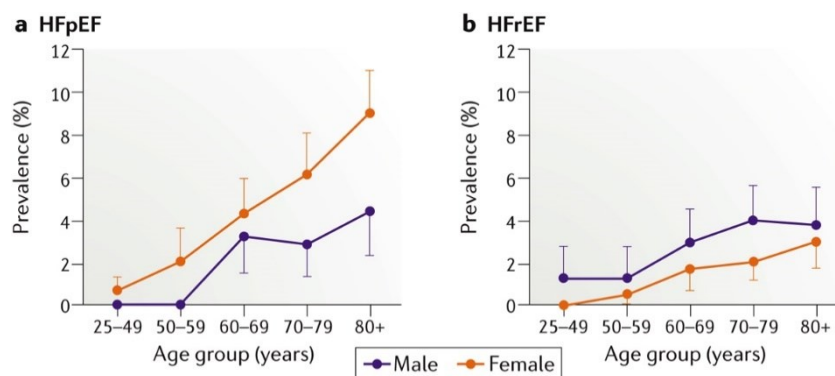
auch eine Zunahme der Prävalenz der Herzinsuffizienz, die überproportional stark die ältere Bevölkerung betrifft (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Zunahme der PatientInnen mit Herzinsuffizienz bis 2030**

Links abgebildet ist die erwartete Entwicklung der PatientInnenzahlen bis 2030, die in den USA von Herzinsuffizienz betroffen sein werden. Rechts abgebildet ist die demographische Entwicklung der Bevölkerung in den USA über 65 Jahre, diese wird in den kommenden Jahren in absoluten Zahlen, aber auch relativ zur Gesamtbevölkerung, weiter steigen. Abbildung übernommen von Dunlay, S. M. *et al.* (2017).

Im Rahmen der Aufschlüsselung der Prävalenz nach Geschlecht konnte in einer Einzelstudie (Ceia *et al.*, 2002) gezeigt werden, dass die Erkrankungsbilder inhomogen verteilt sind. Männer sind, unabhängig des Alters, häufiger von HFrEF betroffen als Frauen, HFpEF hingegen betrifft jedoch deutlich häufiger Frauen als Männer (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Prävalenz der HFpEF und HFrEF nach Alter und Geschlecht**

Die Abbildungen zeigen die prozentuelle Prävalenz der HFpEF und HFrEF in Abhängigkeit zu Alter und Geschlecht. Es wird ersichtlich, dass die HFpEF häufiger Frauen betrifft als Männer, während hingegen die HFrEF häufiger bei Männern anzutreffen ist. Abbildung übernommen von Dunlay, S. M. *et al.* (2017).

Ähnliche Ergebnisse konnten mehreren anderen Studien (Bursi *et al.*, 2006, Fonarow *et al.*, 2007, Lee *et al.*, 2009, Dunlay *et al.*, 2017) aufgezeigt werden, auch dort waren im

Durchschnitt Frauen häufiger von HFpEF betroffen als Männer. Bei diesen Studien wurde, wie Ho *et al.* 2016 zeigen konnte, jedoch nicht in Betracht gezogen, dass der Altersdurchschnitt der Geschlechter innerhalb der genannten Studien voneinander abweicht. Nach einer Korrektur der epidemiologischen Daten hinsichtlich des Alters, Gewichts, des durchschnittlichen Blutdrucks sowie dem aktuellen Behandlungsregime zeigte sich, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern hinsichtlich HFpEF aufgezeigt werden konnte. Bezogen auf HFrEF zeigte sich bei Frauen zudem eine geringere Wahrscheinlichkeit gegenüber Männern, von dieser Form der Herzinsuffizienz betroffen zu sein.

Eine umfangreiche Studie aus dem Jahr 2015 kam innerhalb eines Beobachtungszeitraums von zehn Jahren zu dem Ergebnis, dass die Inzidenz der Herzinsuffizienz innerhalb dieser Zeit leicht abgenommen hat, so wurden im Jahr 2000 315,8 Fälle auf 100.000 Personen registriert, während hingegen im Jahr 2010 219,3 Fälle auf 100.000 Personen nachgewiesen werden konnten (Gerber *et al.*, 2015, Dunlay *et al.*, 2017). Ho *et al.* konnten 2016 die kumulative Inzidenz mehrerer Kohortenstudien zusammenfassen (Framingham Heart Study, FHS, Renal and Vascular End-Stage Disease, PREVEND, sowie Cardiovascular Health Study, CHS) und den jeweiligen Altersgruppen zuordnen. Es stellte sich dabei eine steigende Inzidenzrate in Abhängigkeit zum Alter dar. In der Gruppe mit einem mittleren Durchschnittsalter von 73 Jahren konnte die höchste Inzidenzrate nachgewiesen werden, in der Gruppe mit einem Durchschnittsalter von 49 Jahren wurde die niedrigste Inzidenzrate identifiziert (Tabelle 1). Diese Ergebnisse korrespondieren mit der Altersverteilung der Risikofaktoren (Ho *et al.*, 2016, Dunlay *et al.*, 2017).

Zusätzlich nimmt die Prävalenz der Risikofaktoren für Herzinsuffizienz weiter zu. In den kommenden Jahren wird ein Anstieg der Erkrankungen, die stark mit Herzinsuffizienz vergesellschaftet sind, wie beispielsweise Adipositas und Diabetes mellitus, erwartet (Finkelstein *et al.*, 2012, Boyle *et al.*, 2010, Dunlay *et al.*, 2017). Es ist davon auszugehen, dass ein Anstieg der Risikofaktorprävalenz direkte Auswirkungen auf die Inzidenzrate der Herzinsuffizienz haben wird.

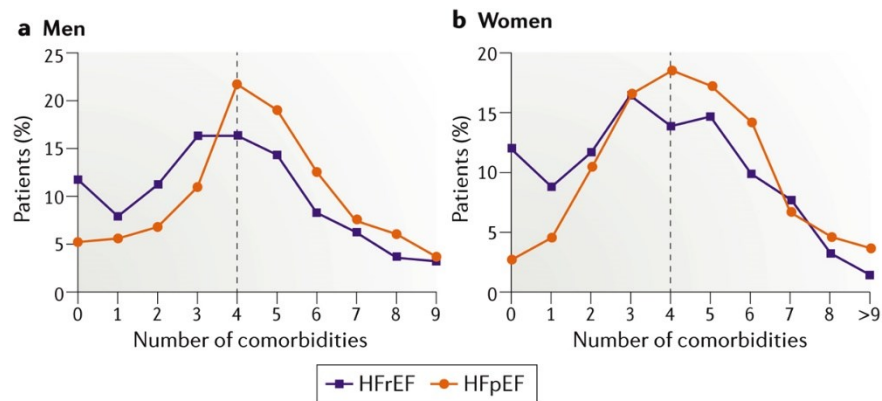
Cohort study	Mean age at entry (years)	12-year cumulative incidence of HF (%)	Proportion with HFpEF (%)
Cardiovascular Health Study <sup>113</sup>	73	13.7	53.3
Framingham Heart Study <sup>114,115</sup>	58	6.7	46.5
PREVEND <sup>116</sup>	49	4.2	36.9

**Tabelle 1: Inzidenz der HFpEF in ausgewählten Kohortenstudien**

Die im Text beschriebenen Kohortenstudien wurden hier zusammengefasst und die entsprechenden Werte für kumulative Inzidenz, Anteil der PatientInnen mit HFpEF im Verhältnis zur Gesamtheit der von Herzinsuffizienz Betroffenen und das durchschnittliche Eintrittsalter der in die Studie aufgenommenen PatientInnen dargestellt. Tabelle übernommen von Dunlay, S. M. *et al.* (2017).

#### 1.4.2 Risikofaktoren

Ein zentraler Faktor für die Entstehung einer HFpEF ist das Alter, die Prävalenz von Risikofaktoren sowie die Prävalenz der Erkrankung selbst steigen mit fortschreitenden Jahren stetig an. Als wichtiger Risikofaktor konnte Bluthochdruck identifiziert werden (Lenzen *et al.*, 2004, Lee *et al.*, 2009, Dunlay *et al.*, 2017), sowohl PatientInnen mit HFpEF als auch HFrEF zeigen hier eine starke Vergesellschaftung dieses Risikofaktors mit dem Auftreten einer Herzinsuffizienz (Ho *et al.*, 2016, Dunlay *et al.*, 2017). Weiterhin konnten diverse zusätzliche Faktoren definiert werden, bei denen eine Korrelation mit dem Auftreten von HFpEF nachgewiesen werden konnte. Diabetes ist bei 20-40% der HFpEF-PatientInnen anzutreffen (Owan *et al.*, 2006, Bhatia *et al.*, 2006, Dunlay *et al.*, 2017), auch Übergewicht ist bei HerzinsuffizienzpatientInnen deutlich überrepräsentiert, 80-85% der PatientInnen mit HFpEF sind übergewichtig (Owan *et al.*, 2006, Ho *et al.*, 2013, Kitzman *et al.*, 2017, Dunlay *et al.*, 2017, Carbone *et al.*, 2020). Ein weiterer relevanter Risikofaktor ist Vorhofflimmern (VHF). Bei PatientInnen mit HFpEF konnte eine Assoziation mit VHF festgestellt werden, wobei hier das Vorhofflimmern entweder vor, während oder nach der Diagnosestellung mit HFpEF auftrat (Zakeri *et al.*, 2013, Dunlay *et al.*, 2017). Der überwiegende Anteil der PatientInnen mit HFpEF weist zudem eine hohe Anzahl an Komorbiditäten auf, 50% der PatientInnen haben zusätzlich zur diagnostizierten Herzinsuffizienz mindestens fünf weitere chronische Erkrankungen (Abbildung 4) (Dunlay *et al.*, 2017, Chamberlain *et al.*, 2015).



**Abbildung 4: Komorbiditäten bei PatientInnen mit HFpEF**

Dargestellt ist die Häufigkeitsverteilung von Komorbiditäten bei PatientInnen mit diagnostizierter HFpEF bzw. HFrEF, aufgetrennt nach Geschlecht. Unabhängig des Geschlechts treten Komorbiditäten ähnlich häufig auf, PatientInnen mit HFrEF sind gering seltener betroffen. Abbildung übernommen von Dunlay, S. M. *et al.* (2017).

## 1.5 HFPEF PATHOPHYSIOLOGIE

Basierend auf Experimenten in verschiedenen Tiermodellen (überwiegend Maus und Ratte) und Untersuchungsdaten der HFpEF des Menschen konnten verschiedene Mechanismen, die zur Erkrankungsentstehung beitragen, nachgewiesen werden. Dazu gehören die Hypertrophie des Herzmuskels, Fibrosierung des Myokards, Defekte innerhalb der Verbindung der elektrischen Herzerregung und mechanischer Kontraktion, Dysfunktionen der Sarkomere, cGMP-PKG Signalübertragungsstörungen, nitrosativer-oxidativer Stress, Entzündungsreaktionen, metabolische und mitochondriale Defekte sowie mikrovaskuläre Dysfunktion (Mishra & Kass, 2021). Diese Mechanismen ergeben in der Kombination das pathophysiologische Bild der HFpEF; einige davon werden im Folgenden genauer beschrieben.

### 1.5.1 Hypertrophie des Herzmuskels

Zu Beginn als eines der Hauptkriterien betrachtet, hat sich in der jüngeren Vergangenheit gezeigt, dass die linksventrikuläre Hypertrophie nur bei 30-60% der PatientInnen mit HFpEF anzutreffen ist (Zile *et al.*, 2011, Armstrong *et al.*, 2014, Mishra & Kass, 2021). PatientInnen mit Hypertrophie des Herzmuskels weisen dabei ähnliche Mechanismen auf wie PatientInnen mit HFpEF. So sind PatientInnen mit kardialer Hypertrophie ebenfalls betroffen von Fibrosierung, oxidativem Stress, mitochondrieller Dysfunktion und gestörter  $Ca^{2+}$  Homöostase. Weiterhin zeigen sie Zeichen für vermehrten Zelltod, unzureichende

Angiogenese, vermehrtes Zellwachstum und Proteinsynthese als auch Aktivierung von fetalen Genen (Nakamura *et al.*, 2018, Mishra & Kass, 2021). Diese Vorgänge konnten auch in PatientInnen mit HFpEF nachgewiesen werden.

### **1.5.2 Fibrosierung des Herzmuskels**

Durch die beschriebene Hypertrophie des Herzmuskels in Kombination mit erhöhtem Blutdruck kommt es zur Fibrosierung des Herzmuskels durch sukzessives Ersetzen der Kardiomyozyten mit Myofibroblasten (Mishra & Kass, 2021, Xiao *et al.*, 2019). Hierbei wird durch eine vermehrte Produktion und Einlagerung von Kollagen in das Myokard die Steifigkeit des Gewebes erhöht und folglich die Elastizität des Herzmuskels verringert. Dadurch ist der Muskel nicht mehr im gleichen Maße in der Lage sich während der Diastole, der Entspannungsphase, zu dehnen und so die für die nächste Kontraktion benötigte Blutmenge aufzunehmen (Doi *et al.*, 2000, Yamamoto *et al.*, 2002, Mishra & Kass, 2021). Ähnliche Vorgänge konnten in Herzen von DiabetespatientInnen nachgewiesen werden, bei denen durch die Anhäufung von unlöslichen fortgeschrittenen Glykierungsendprodukten Myokardfibrosierung ausgelöst wurde (Paulus & Tschöpe, 2013). Daher ist es naheliegend, dass auch bei übergewichtigen PatientInnen ein ähnliches Phänomen festgestellt werden konnte (Cavalera *et al.*, 2014, Mishra & Kass, 2021). Oxidativer Stress als auch inflammatorische Prozesse tragen ebenfalls zur Fibrosierung bei (Paulus & Tschöpe, 2013, Mishra & Kass, 2021). Aus dieser Aufzählung lässt sich erkennen, dass mehrere Mechanismen, die bei HFpEF anzutreffen sind, synergistisch bei der Entstehung von Myokardfibrosierung zusammenwirken. Hierbei gilt es zu erwähnen, dass bei den meisten PatientInnen mit HFpEF nur ein geringer Grad an Fibrosierung vorhanden ist, nur 26% der PatientInnen mit HFpEF wiesen eine moderate bis schwere Fibrosierung auf. Dahingehend scheint es wahrscheinlich, dass die Fibrosierung als Sekundärfolge der Komorbiditäten entsteht und das Vorliegen eines primären fibrotischen HFpEF-Typen selten ist (Hahn *et al.*, 2020, Mishra & Kass, 2021).

### **1.5.3 Elektromechanische Kopplung**

Der Verbindungsprozess zwischen der Depolarisation der Kardiomyozyten, der daraus folgenden Kalziumausschüttung und Kontraktion der Myofilamente wird als elektromechanische Kopplung beschrieben. Die Kontraktion der Zelle ist maßgeblich durch

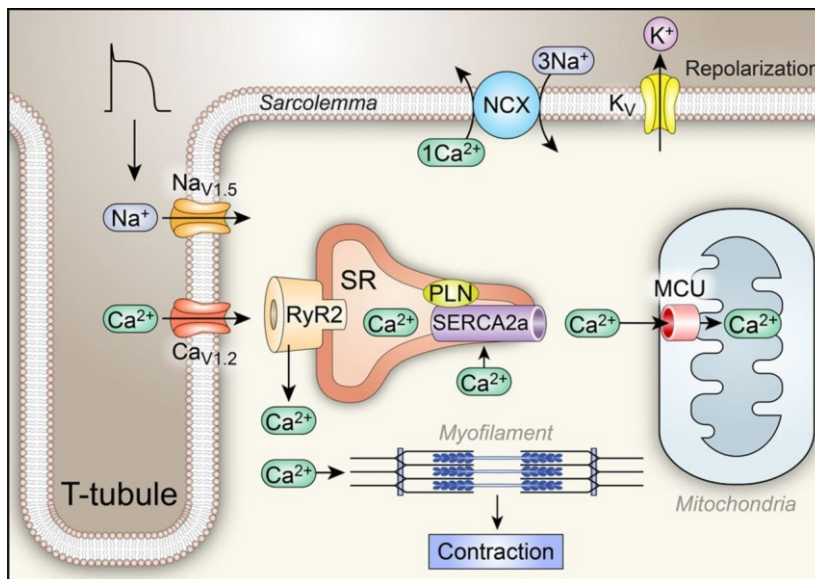
die Fähigkeit des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) bedingt, nach erfolgter Kontraktion das intrazelluläre Kalzium wieder aufzunehmen. (Abbildung 5)

Bei HFrEF ist diese Wiederaufnahme in das SR gestört, da Phospholamban (PLB) stärker phosphoryliert wird als im Normalzustand. Hierdurch ist die Bindung an die Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2a (SERCA2a), die eine zentrale Rolle in der Wiederaufnahme spielt, reduziert. Folglich findet eine Kalziumaufnahme in das SR nur unzureichend statt. Dies reduziert die  $Ca^{2+}$  Amplitude als auch die Kontraktion der Zelle und führt zu einer verlängerten Relaxationszeit (Luo & Anderson, 2013).

#### **1.5.4 Funktion des intrazellulären Kalziums im Rahmen der Sarkomerkontraktion**

Die Herzmuskulatur ist stets darauf angewiesen, sich adäquat an neue Belastungsverhältnisse anzupassen. Bei kurzfristig ansteigender Belastung und damit einhergehendem erhöhtem Sauerstoffbedarf der Skelettmuskulatur müssen die Kardiomyozyten rasch in der Lage sein, diesen größeren Bedarf durch eine erhöhte Kontraktilität bedienen zu können.

Der intrazelluläre Kalziumspiegel trägt maßgeblich zur Kontraktionsfähigkeit der Zelle bei, nach Aktivierung der spannungsabhängigen Kalziumkanäle der Zellmembran und einem folgenden Kalziumeinstrom in das Zytoplasma kommt es durch diesen Anstieg zu einer Öffnung der kardialen Ryanodin-Rezeptoren am sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Das in den SR gespeicherte Kalzium wird so nun innerhalb weniger Millisekunden in das Zytoplasma abgegeben und kann nun in großer Menge an das Troponin C der Sarkomere binden, das dadurch die Bindungsstellen zwischen Aktin und Myosin freigibt und somit dem Sarkomer die Kontraktion ermöglicht. Nach erfolgter Kontraktion wird der überwiegende Teil des Kalziums durch aktive Kalziumpumpen wieder in das SR aufgenommen, sowie über Natrium-Kalzium-Austauscher aus dem Zytoplasma entfernt (Abbildung 5).

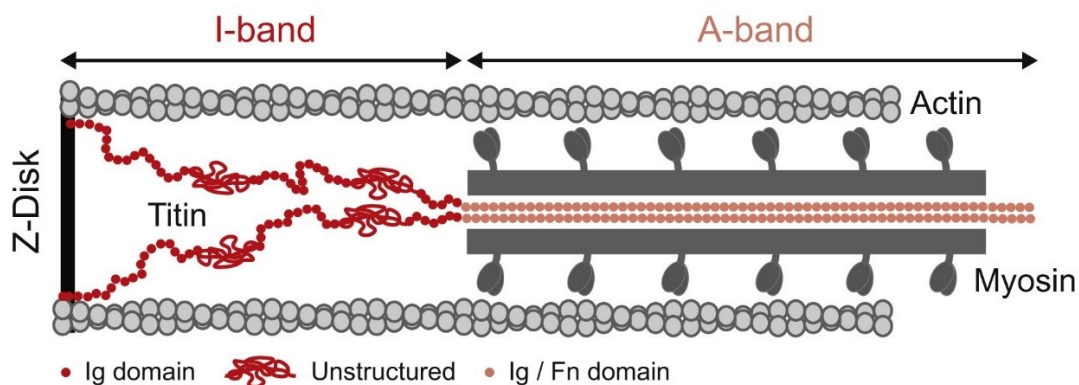


**Abbildung 5: Schematische Darstellung der elektromechanischen Kopplung**

Schematisch dargestellt ist die Signalkaskade zwischen Aktionspotential und Kontraktion des Sarkomeres. Das Aktionspotential öffnet spannungsabhängige Natriumkanäle, diese öffnen in der Folge spannungsabhängige L-Typ Kalzium Kanäle. Der resultierende Kalzium Einstrom öffnet die Ryanodin-Rezeptoren Typ 2 des SR, aus dem nun der überwiegende Teil des für die Kontraktion notwendigen Kalziums in das Zytoplasma abgegeben wird. Das Kalzium bindet an Troponin C, das an den Aktinfilamenten sitzt, und ermöglicht so die Kontraktion der Sarkomere. Nach der Kontraktion wird das Kalzium über SERCA2a wieder in das SR aufgenommen sowie über Natrium-Kalzium-Austauscher aus dem Zytoplasma durch den Transport in die extrazelluläre Matrix entfernt. Abbildung übernommen von Luo & Anderson (2013).

### 1.5.5 Sarkomerfunktion bei HFpEF

An gefrorenen Gewebeproben von PatientInnen mit HFpEF konnte gezeigt werden, dass das Verhältnis von  $\text{Ca}^{2+}$  zur Kraftentwicklung der Sarkomere sich nicht von gesunden Gewebeproben unterscheidet. Allerdings zeigte sich eine Veränderung der Fähigkeit der Sarkomere, sich passiv durch Krafteinwirkung zu dehnen und damit in der Diastole des Herzens die Füllung zu ermöglichen (van Heerebeek *et al.*, 2006, 2008, Mishra & Kass, 2021). Diese Veränderung konnte auf die Hypophosphorylierung von Titin zurückgeführt werden. Titin nimmt innerhalb des Sarkomeres eine wichtige Rolle ein, es ist mit einem festen Teil an Myosin gebunden und mit einem elastischen Teil an die Z-Scheiben des Sarkomeres (Borbely *et al.*, 2005, Li *et al.*, 2016, Mishra & Kass, 2021) (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Position des Titins innerhalb des Sarkomers**

Titin lässt sich grob in zwei Bereiche unterteilen, eine elastische Region (I-Band) sowie eine solide Region (A-Band), die mit Myosin verbunden ist. Die elastische Region ermöglicht es dem Protein, im Rahmen der Zellkontraktion eine federnde Wirkung auf das Myosin und somit auf das Sarkomer auszuüben, zudem hält Titin auf diese Weise auch das Myosin zentral zwischen den Aktinfilamenten. Nach durchgeführter Kontraktion unterstützt Titin die Myosinfilamente, sich wieder in die Ausgangsposition zurückzubewegen. Abbildung übernommen von Herrero-Galán E. *et al.* (2019).

Aufgrund des elastischen Anteils kann es innerhalb des Sarkomers als Federung wirken, bei Dehnung des Aktin-Myosin-Komplexes diesen wieder zusammenziehen, und nach Kontraktion eine Erweiterung des Komplexes ermöglichen. Daher vermitteln die Titin-Filamente auch die „passive“ Elastizität des Muskels (Li *et al.*, 2016). Eine Versteifung dieses Federungsproteins erklärt nun, warum eine Korrelation zwischen der Hypophosphorylierung von Titin und einer reduzierten linksventrikulären Compliance während der Diastole festgestellt werden konnte (Zile *et al.*, 2015, Mishra & Kass, 2021).

## 1.6 POTENZIELLE HFPEF THERAPIEN

HFpEF stellt sich als sehr heterogene Erkrankung dar, die eine umfangreiche Zahl an Ursachen und Phänotypen beinhaltet, die zum Teil noch unzureichend erforscht sind. Daher verfolgen auch die Therapieansätze verschiedene Strategien und richten sich gegen unterschiedliche Pathomechanismen. Fakt ist, dass es bislang keine evidenzbasierte Kausaltherapie der HFpEF gibt. Alle hier beschriebenen Ansätze sind bisher entweder unzureichend erprobt oder zeigen in klinischen Studien nicht die erwünschte Wirkung hinsichtlich der Verbesserung der Prognose, beziehungsweise des Aufhaltens des Krankheitsfortschrittes. Die Therapieansätze können dabei in drei Gruppen unterteilt

werden. So stehen eine medikamentöse Behandlung, eine geräteunterstützte Intervention, sowie nicht-pharmakologische Therapieansätze wie beispielsweise Fasten bzw. Kalorienrestriktion und körperliche Aktivität zur Auswahl.

### **1.6.1 Medikamentöse Therapieoptionen**

Erste Versuche der Therapie der HFpEF mit Medikamenten nutzten den gleichen Ansatz wie zur Behandlung der HFrEF, hier hatte in der Vergangenheit der Eingriff in das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) zu wirksamen Medikamenten geführt. Diese, RAAS-Blocker genannten, Pharmaka konnten hingegen bei der Therapie der HFpEF keine zufriedenstellende Wirkung zeigen. Auch die Verwendung von Beta-Blockern, die bei PatientInnen mit HFrEF eine suffiziente Therapie darstellen, führt bei PatientInnen mit HFpEF zu keinem positiven Ergebnis (Komajda *et al.*, 2017, Mishra & Kass, 2021). Experimentelle PDE9-Inhibitoren (z.B. CRD-733) in Kombination mit Neprilysin-Inhibitoren, wurden ebenfalls untersucht. Hierbei stimulieren die Neprilysin-Inhibitoren die Synthese des zyklischen Guanosinmonophosphates (cGMP), zusätzlich inhibieren die PDE9-Inhibitoren die hydrolytische Inaktivierung von cGMP. Beide Vorgänge haben zum Ziel, mehr cGMP zur Verfügung zu stellen und ergänzen sich dahingehend (Mishra & Kass, 2021). Im Jahr 2021 konnten in einem Mausmodell positive Effekte von CRD-733 nachgewiesen werden (Richards *et al.*, 2021). Ein weiterer Ansatz beinhaltet den Wirkstoff Empagliflozin, konnte jedoch in der entsprechenden Studie keine Verbesserung der Belastbarkeit aufzeigen (Mishra & Kass, 2021, Physicians' Academy for Cardiovascular Education, 2020).

### **1.6.2 Geräteunterstützte Intervention**

Mehrere Ansätze zur gerätebasierten Intervention werden erprobt; so wurde versucht, über eine Anlage eines künstlichen Atriumseptumdefektes (ASD) durch Einsatz eines entsprechenden Shunts eine Druckentlastung zu erzielen. Während der Herzaktion kann der erhöhte Druck des linken Atriums entlastet werden, indem Blut aus dem linken Atrium in das rechte Atrium übergeht. In der korrespondierenden Studie konnte auf diese Weise eine Reduktion des Lungenkapillar-Verschlussdrucks um 3-4 mmHg gegenüber einem Kontrollkollektiv gezeigt werden (Feldman *et al.*, 2018, Mishra & Kass, 2021).

Da ein gewisser Anteil der PatientInnen mit HFpEF, wie eingangs erwähnt, zusätzlich Vorhofflimmern aufweist, ist ein weiterer Ansatz der Therapie eine durch Schrittmacher

verbesserte Chronotropie des Herzens. So konnte gezeigt werden, dass eine schrittmacherbedingte Anpassung der Herzaktionen bei PatientInnen mit HFpEF und Vorhofflimmern zu einer Verbesserung der körperlichen Belastungsfähigkeit und Belastungsdauer führt (Serova *et al.*, 2020, Mishra & Kass, 2021).

Als letzte hier beschriebene geräteunterstützte Therapieoption soll die Pericardektomie genannt sein. Hierbei wird der das Herz umgebende Herzbeutel, das Perikard, minimalinvasiv reseziert. Ansatz ist, dass durch den Herzbeutel eine Einengung des Herzmuskels entstehen kann, die die Funktion des Myokards einschränkt. Durch eine entsprechende Entfernung des Perikards soll diese Restriktion entfernt und somit die linksventrikuläre Füllmenge verbessert werden (Borlaug *et al.*, 2017). Dieser Ansatz ist bisher nur an Tieren im Sinne eines Proof of Concept durchgeführt worden und konnte dort eine Verbesserung der linksventrikulären Füllmenge zeigen.

### **1.6.3 Körperliche Aktivität, Kalorienrestriktion und bariatrische Operationen gegen Übergewicht**

Als eine unkomplizierte, nicht pharmakologische Therapie, die eine tatsächliche Verbesserung der Ejektionsfraktion zeigen konnte, hat sich körperliches Training erwiesen (Tucker *et al.*, 2018, Pandey *et al.*, 2015, Mishra & Kass, 2021). Weiterhin konnte auch entweder durch ausschließliche Kalorienrestriktion oder Kalorienrestriktion in Verbindung mit vermehrter körperlicher Aktivität eine deutliche Verbesserung der maximalen Sauerstoffaufnahme nachgewiesen werden. Die Kombination der Maßnahmen aus Restriktion und vermehrter Aktivität zeigten sich dabei hinsichtlich des gemeinsamen Effektes additiv auf den maximalen Sauerstoffverbrauch, einer der wichtigsten klinischen Marker zur Feststellung einer Verbesserung von HFpEF (Kitzman *et al.*, 2016).

Weitere Ansätze haben allesamt ebenfalls zum Ziel, eine Reduktion des Körpergewichts zu erreichen. So wurde die Auswirkung von bariatrischen Operationen bei stark adipösen PatientInnen untersucht. Diese Therapie hat zum Ziel, eine Verkleinerung des Magenvolumens durch entweder eine Einlage eines Magenbandes oder eine dauerhafte Verkleinerung durch Entfernung von Magenteilen zu erreichen. In zwei Studien konnte dieser Ansatz eine Korrelation zwischen dem operationsbedingten Gewichtsverlust und einer Verbesserung der Symptomatik sowie der kardialen Funktion aufzeigen (Rodriguez *et al.*, 2017, Mikhalkova *et al.*, 2018, Mishra & Kass, 2021). Ähnliche Ergebnisse konnten durch

eine andere chirurgische Intervention, die Magenbypass-Operation, erreicht werden. Hier zeigten die PatientInnen nach der Operation und damit einhergehender Gewichtsreduktion eine Verbesserung des linksventrikulären Herzgewichts und relativen Wanddicke sowie eine Verbesserung der linksventrikulären Fülldrücke und Relaxation (Mikhalkova *et al.*, 2018, Mishra & Kass, 2021). Mit diesen Veränderungen ging zudem eine Verbesserung der Lebensqualität einher.

Aus den genannten Beispielen, die die Vielzahl an möglichen Therapieansätzen bei Weitem nicht erschöpfend behandelt haben, wird ersichtlich, dass die HFpEF ein komplexes Erkrankungsbild darstellt. Zeitgleich bietet sich zum aktuellen Zeitpunkt, trotz der unterschiedlichsten Herangehensweisen, keine suffiziente Therapie zur effektiven Behandlung der HFpEF. Aus der hohen Prävalenz der Erkrankung in der Gesamtbevölkerung resultiert ein starker klinischer Bedarf nach Handlungsoptionen, der jedoch bis heute nicht bedient werden kann.

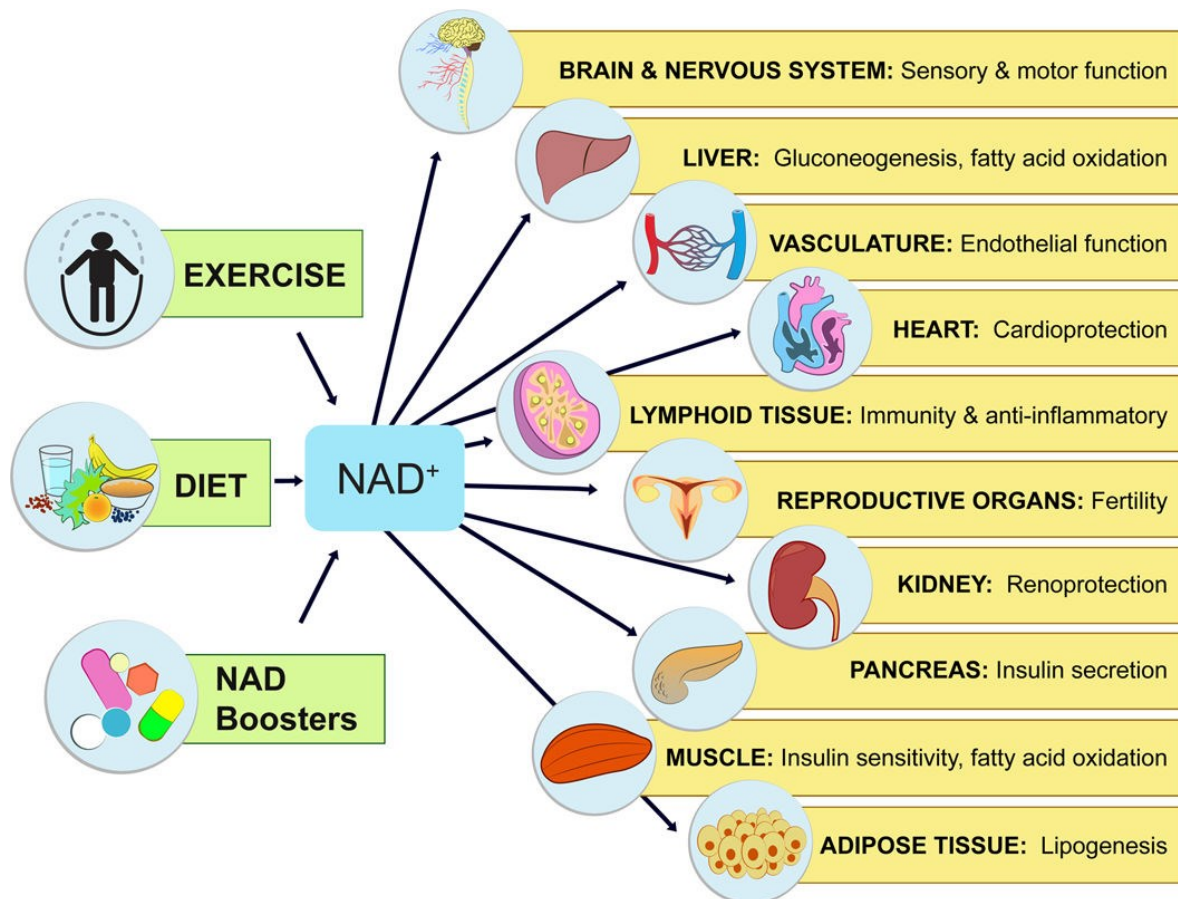
Auf der Grundlage der nachgewiesenen Effektivität einer Kalorienrestriktion bzw. konsequentem körperlichen Training ergibt sich die Fragestellung, inwieweit die Effekte dieser Therapie auch anderweitig nachgeahmt werden können. Es zeigt sich, dass gerade bei dieser Therapieform die Compliance der PatientInnen niedrig ist. Zudem können PatientInnen teilweise nicht in ein solches Programm einbezogen werden, da negative Implikationen einer Kalorieneinschränkung, wie etwa Auswirkungen auf die Knochendichte und auf das Immunsystem für einige PatientInnen eine Kontraindikation für eine solche Intervention darstellen. Dieser Umstand trifft auf viele von HFpEF betroffene PatientInnen zu, da diese häufig an einer Vielzahl an zusätzlichen Komorbiditäten leiden.

Daher werden Kalorienrestriktionsmimetika (oder fastennachahmende Substanzen) erforscht, Medikamente, die die positiven Effekte der Kalorienreduktion oder des Fastens simulieren, ohne die damit einhergehenden negativen Auswirkungen auf die PatientInnen mit sich zu bringen.

## 1.7 NAD<sup>+</sup> UND NIKOTINAMID ALS ZUKÜNFTIGE HFpEF THERAPIE?

Kalorienrestriktion führt u.a. nachweislich zu einer Erhöhung der Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD<sup>+</sup>) Konzentration in der Zelle (Rajman *et al.*, 2018). Zeitgleich konnte ein stetiger Abfall der NAD<sup>+</sup> Konzentration mit zunehmendem Alter und Übergewicht gezeigt werden (Katsyuba *et al.*, 2020). Da Alter und Übergewicht auch zentrale Risikofaktoren der HFpEF sind, stellt sich die Frage, ob der NAD<sup>+</sup>-Spiegel auch bei PatientInnen mit HFpEF gestört ist. Im Jahr 2021 konnte Abdellatif *et al.* zeigen, dass diese Hypothese zutreffend ist. Bei Mäusen mit NAD<sup>+</sup>-Defizienz wurde eine negative Auswirkung des niedrigen NAD<sup>+</sup>-Spiegels auf die diastolische Funktion des Herzens aufgezeigt. NAD<sup>+</sup> erfüllt eine große Anzahl an Funktionen innerhalb verschiedenster Zellen des Organismus und konnte in vielen Fällen mit einer schützenden Funktion für die jeweiligen Organe in Verbindung gebracht werden. So zeigt ein erhöhter NAD<sup>+</sup> Spiegel vermehrte Glukoneogenese, vermehrte Insulinsekretion, hat renoprotektive Eigenschaften sowie kardioprotektive Effekte (Abbildung 7, Rajman *et al.*, 2018). Es stellt dahingehend also einen interessanten Ansatzpunkt in der Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen dar, im Besonderen auch der HFpEF. Ein möglicher Ansatz ist hierbei, den in der Biosynthese stehenden Vorläufer von NAD<sup>+</sup> zu verwenden um in PatientInnen die Konzentration an NAD<sup>+</sup> zu erhöhen. Im Jahr 2021 wurde nachgewiesen, dass die kardiale NAD<sup>+</sup> Konzentration in HFpEF PatientInnen reduziert ist und dass der NAD<sup>+</sup> Vorläufer Nikotinamid die diastolische Funktion in drei verschiedenen Tiermodellen verbessert (Abdellatif *et al.*, 2021).

Einfluss auf die NAD<sup>+</sup> Konzentration kann dabei auf drei Arten genommen werden. So kann etwa durch sportliche Betätigung das NAD<sup>+</sup> Niveau gesteigert werden, ein ähnlicher Effekt lässt sich durch Fasten erzielen. Neben diesen beiden Methoden ist auch die Supplementation von NAD<sup>+</sup> bzw. dem Vorläufer Nikotinamid, Nikotinamid Ribosid und Nikotinamid Mononukleotid ein Weg, den Spiegel von NAD<sup>+</sup> im Körper anzuheben (Rajman *et al.* 2018).



**Abbildung 7: Einfluss von NAD<sup>+</sup> auf Organfunktionen**

Dargestellt sind die verschiedenen Wege, wie zum einen die NAD<sup>+</sup>-Konzentration beeinflusst werden kann, und zum anderen der Einfluss, den NAD<sup>+</sup> auf die nachfolgenden Organsysteme nehmen kann. Übernommen von Rajman L. *et al.* (2018).

### 1.7.1 NAD<sup>+</sup> und Nikotinamid Mangel im Rahmen der HFpEF

NAD<sup>+</sup> nimmt als Cofaktor an enzymatischen Redox-Reaktionen in allen Organsystemen des Körpers teil. Im Rahmen der Atmungskette kommt ihm besondere Bedeutung zu, zusammen mit NADH ist es zentraler Bestandteil des Citratzyklus. Zudem beteiligt es sich auch an der Glykolyse und Beta-Oxidierung von Lipiden. (Katsyuba *et al.*, 2020) Während des Alterungsprozesses nimmt die Konzentration an NAD<sup>+</sup> im Körper ab, es konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass der Mangel an NAD<sup>+</sup> signifikante negative Implikationen für die Gesundheit des Herzmuskels nach sich zieht (Katsyuba *et al.*, 2020). Diese Daten wurden im Rahmen von Tierversuchen erhoben, können also nur bedingt auf die Physiologie menschlicher Herzzellen übertragen werden. In konsequenter Weise kann durch eine Substitution von NR (Nikotinamid Ribosid), eine Vorstufe von NAD<sup>+</sup>, eine protektive Wirkung

(Lee *et al.*, 2016, Katsyuba *et al.*, 2020) bzw. eine Reduktion der Wahrscheinlichkeit für Herzversagen erzielt werden (Xu *et al.*, 2015, Diguët *et al.*, 2018, Katsyuba *et al.*, 2020). Die Relevanz eines ausreichenden intrazellulären NAD<sup>+</sup>-Spiegels für den Erhalt der Herzfunktion zeigt sich anhand der genannten Studien deutlich.

### 1.7.2 NAD<sup>+</sup> als Bestandteil der Signaltransduktion

NAD<sup>+</sup> erfüllt in der zellulären Signaltransduktion zentrale Aufgaben und ist maßgeblich an der Aufrechterhaltung der Zellintegrität und Funktion beteiligt. In Kardiomyozyten, so wie in allen Zellen des Körpers, wird NAD<sup>+</sup> als Co-Enzym im Rahmen der Energieproduktion benötigt. Um eine ausreichende Versorgung mit NAD<sup>+</sup> zu gewährleisten, existieren gleich mehrere Wege der Biosynthese von NAD<sup>+</sup>, so etwa die *de novo* Synthese, als auch die Bereitstellung durch verschiedene *Salvage Pathways* (Abbildung 8). Zudem existiert noch der Preiss-Handler-Pathway, der aus Nikotinsäure Nikotinamid synthetisiert.

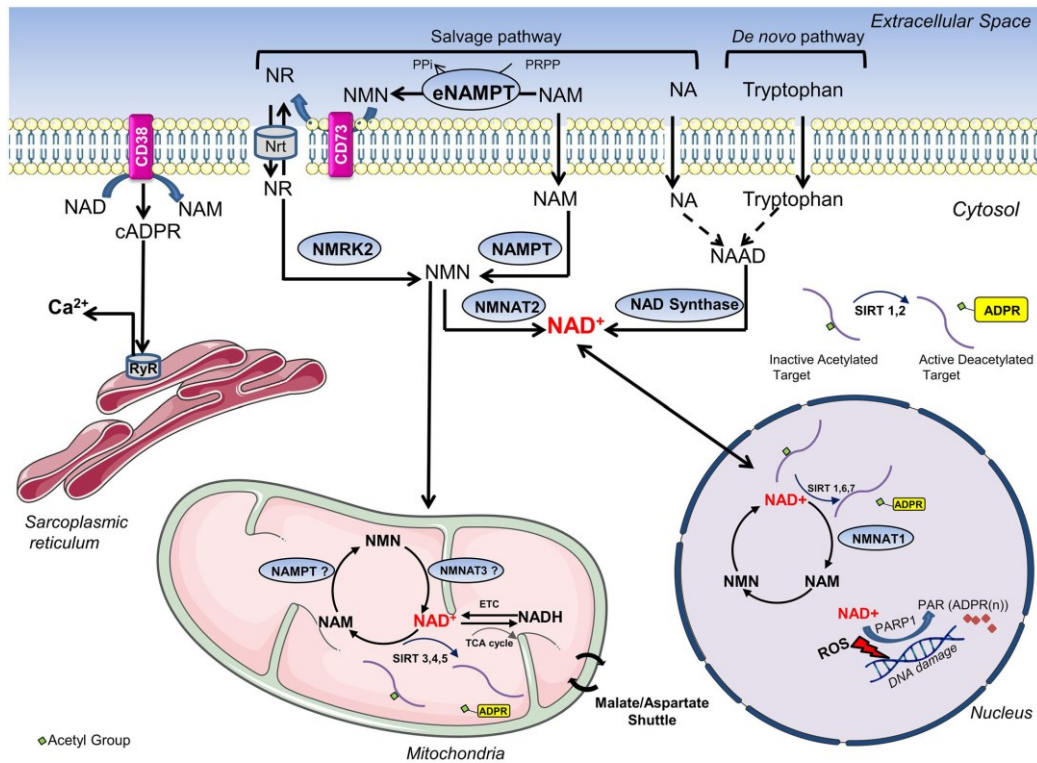
Als Grundlage des *de novo* Synthesewegs dient die essenzielle Aminosäure Tryptophan, diese wird aus dem Extrazellulärraum aufgenommen und in einem mehrschrittigen Prozess in Nikotinsäure-Adenin-Dinukleotid (NAAD) konvertiert und schließlich durch die NAD Synthase in NAD<sup>+</sup> synthetisiert.

Die Synthese durch die *Salvage Pathways* stellt den zentralen Mechanismus zur Bereitstellung von NAD<sup>+</sup> im Herzen dar, da über diesen Weg der Großteil des zellulären Bedarfs der Kardiomyozyten gedeckt wird. Als Ausgangssubstanzen dienen hier Nikotinamid-Ribosid (NR), Nikotinsäure (NA) und Nikotinamid (NAM). Nikotinsäure wird, nach einer ersten Konversion in Nikotinsäure-Mononukleoid (NAMN), ebenfalls über NAAD in NAD<sup>+</sup> überführt, es wird somit in Teilen der gleiche Weg wie in der *de novo* Synthese verwendet. Nikotinamid wird im *Salvage Pathway* über Nikotinamid-Phosphoribosyltransferase (NAMPT) in NikotinamidMononukleotid (NMN) überführt, in einem zweiten Schritt wird NMN nun zu NAD<sup>+</sup> synthetisiert.

Relevant hierbei ist, dass Nikotinamid ein gemeinsames Endprodukt vieler zellulärer Prozesse ist, die NAD<sup>+</sup> benötigen. Die Synthese von NAD<sup>+</sup> aus Nikotinamid durch NAMPT ist somit der bedeutendste Weg, die intrazelluläre NAD<sup>+</sup>-Konzentration aufrecht zu erhalten, NAMPT stellt hierbei das *rate-limiting enzyme* der Synthesekette dar.

Im Rahmen des letzten *Salvage pathway* kann durch Nikotinamid-Ribosid (NR) durch Nikotinamid-Ribosidkinasen ebenfalls NMN erzeugt werden. Auch hier wird in einem letzten

Schritt NMN durch Nikotinamid-Mononukleotidadenylyltransferasen (NMNATs) in NAD<sup>+</sup> konvertiert. Zu den Verbrauchern von NAD<sup>+</sup> gehören unter anderem die Gruppen der Sirtuine (SIRT), Poly-ADP-Ribosen (PARPs) sowie CD38, diese Enzymgruppen verwenden NAD<sup>+</sup> als Substrat für unterschiedlichste zelluläre Prozesse. (Tannous *et al.*, 2021)



**Abbildung 8: Schematische Darstellung des Biosynthesewegs von NAD<sup>+</sup>**

Dargestellt ist der Biosynthese-Weg von NAD<sup>+</sup> sowie die Rolle, die NAD<sup>+</sup> im Rahmen der Signalübertragung einnimmt. Im oberen Teil der Grafik sind die Wege der Erzeugung von NAD<sup>+</sup> dargestellt. NAD<sup>+</sup> kann *de novo* durch die NAD-Synthetase aus Tryptophan als auch im Rahmen des *Salvage Pathways* aus Nikotinamid-Ribosid (NR), Nikotinsäure (NA) sowie Nikotinamid (NAM) erzeugt werden. Übernommen von Tannous *et al.* (2021).

### 1.7.3 NAMPT-Bedeutung und Funktion

Kardiomyozyten mit herunterreguliertem NAMPT zeigen eine reduzierte Aktivität von Autophagie, die eine zentrale Rolle in der Erhaltung der Homöostase von Kardiomyozyten durch Abbau zellschädlicher intrazellulärer Substanzen zukommt. (Hsu *et al.*, 2014). Es konnte gezeigt werden, dass die Regulation von NAMPT einen maßgeblichen Einfluss auf die der Zelle zur Verfügung stehende Menge an NAD<sup>+</sup> hat. Es stellt einen limitierenden Faktor in der NAD<sup>+</sup> Synthese dar und wird aufgrund dessen auch als *rate-limiting enzyme* in der Produktion von NAD<sup>+</sup> angesehen (Hsu *et al.*, 2014).

In einer rezenten Studie (Tong *et al.*, 2021) konnte ein Zusammenhang zwischen NAMPT und der Entstehung von HFpEF aufgezeigt werden. So zeigt sich bei Mäusen mit durch hochkalorische Diät induzierter HFpEF eine deutliche Reduktion der Transkription von NAMPT und eine entsprechend niedrigere Konzentration von NAD<sup>+</sup> in den Kardiomyozyten. Der Effekt der reduzierten Transkription konnte auch im biopsierten Myokard von HFpEF PatientInnen nachgewiesen werden. Weiterhin war es möglich, durch die Gabe von Nikotinamid Ribosid bei HFpEF Mäusen eine Verbesserung der mitochondrialen Aktivität zu erreichen und die phänotypische Ausprägung der HFpEF zu reduzieren. Es verbesserte sich die kardiale Hypertrophie, die diastolische Dysfunktion, vorhandene Lungenstauungen gingen zurück und es konnte eine verbesserte körperliche Leistungsfähigkeit festgestellt werden. Eine Herunterregulation des NAMPT scheint somit wesentlich zu der Entwicklung von HFpEF beizutragen.

## 1.8 HYPOTHESE DER DIPLOMARBEIT

Experimentelle Studien belegen, dass ein reduzierter NAD<sup>+</sup> Spiegel in Myokardzellen mit der Entwicklung von diastolischer Dysfunktion und HFpEF einhergeht (Abdellatif *et al.*, 2021, Tong *et al.*, 2021). Daher wurde in dieser Arbeit folgende Hypothese getestet:

Verminderte NAD<sup>+</sup> Bioverfügbarkeit beeinträchtigt die Kalzium-Homöostase und verlangsamt die Kinetik von Kontraktion und Relaxation in den *Nampt* haploinsuffizienten Kardiomyozyten.

Um diese Hypothese testen zu können, wurden Kardiomyozyten-spezifische haploinsuffiziente *Nampt* Mäuse verwendet, die diastolische Dysfunktion, also eine Relaxationsstörung des Myokardes in Vivo aufweisen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

---

### 2.1 MÄUSE

Im Rahmen dieser Studie wurden Mäuse mit einer *Nampt*<sup>flox/flox</sup> Mutation herangezogen, die von Herrn Prof. Dr. Leo Oberdan (Belgien) zur Verfügung gestellt wurden (Rongvaux *et al.*, 2008). In dieser Mauslinie wurden beide Allele zur Kodierung des NAMPT-Enzyms durch eine loxP-Sequenz am Anfang und am Ende der *Nampt* Gen-Sequenz markiert (*floxed: flanked by loxP*). Diese Mäuse fungieren als parentale Generation und wurden mit *MLC2aCre*-Mäusen verpaart. *MLC2aCre*-Mäuse haben die Stellen für *Nampt* unverändert im Wildtyp vorliegen (*Nampt*<sup>wt/wt</sup>), tragen jedoch an einem Allel des *MLC2a*-Gens (Myosin regulatory light chain 2a) zusätzlich die Information für die Cre-Rekombinase (*Cre*<sup>+/-</sup>). *MLC2a* wird ausschließlich in Kardiomyozyten exprimiert, der Effekt der Mutation beschränkt sich somit spezifisch nur auf Kardiomyozyten, die restlichen Zellen der Maus sind unverändert. Im Rahmen der Verpaarung werden die Allele, den Mendelschen Gesetzen folgend, auf die Nachkommen verteilt. Hierbei entstehen Mäuse, deren Genom für *Nampt* nun *Nampt*<sup>flox/wt</sup> kodiert. Die Hälfte dieser Mäuse tragen das *MLC2aCre*<sup>+</sup> Gen, während die anderen 50% der Mäuse das unveränderte *MLC2a* Gen (*MLC2aCre*<sup>-</sup>) tragen. Mäuse des Genotyps *MLC2aCre*<sup>+</sup> exprimieren in den Kardiomyozyten nun das Cre-Rekombinase Enzym, das an den loxP-Sequenzen des geflochten *Nampt*-Allels ansetzt, und den zwischen den loxP-Sequenzen liegenden DNA-Abschnitt ausschneidet, folglich also die für *Nampt* kodierenden Stellen entfernt. Diese Mäuse sind gegenüber der Expressierung des NAMPT-Enzyms nun haploinsuffizient. Diese nachfolgende Filialgeneration war Gegenstand der Untersuchung. In der Studie verwendeten wir insgesamt 16 *Nampt*<sup>flox/wt</sup> Mäuse, davon waren acht *MLC2aCre*<sup>+</sup> und acht *MLC2aCre*<sup>-</sup>. Von den 16 untersuchten Mäusen exprimierten die acht haploinsuffizienten *Nampt*<sup>flox/wt</sup>-*MLC2aCre*<sup>+</sup> Mäuse (sieben Weibchen und ein Männchen) somit nur die Hälfte der normalen Menge des NAMPT Proteins, und wiesen zirka 15% weniger NAD<sup>+</sup> in den Kardiomyozyten auf. Die andere Hälfte der Mäuse (davon sieben Weibchen und ein Männchen) waren *MLC2aCre*<sup>-</sup> und dienten aufgrund ihrer unveränderten NAMPT Proteinexpression und NAD<sup>+</sup> als Kontrollgruppe. Alle Mäuse wurden in den Räumlichkeiten des Tierstalls der Medizinischen Universität Graz untergebracht, in denen sie nach Belieben Zugang (*ad libitum*) zu Nahrung und Wasser hatten. Der Tierstall weist einen 12h-Tag/Nacht-Lichtzyklus auf.

## 2.2 LÖSUNGEN

Vor Beginn des Isolationsprozesses wurden alle benötigten Lösungen anhand der Tabellen im Anhang (Seite 48 f.) vorbereitet. Nach der Auflösung der Festbestandteile in destilliertem Wasser wurde mithilfe eines pH-Meters der pH-Wert mit 5 M NaOH auf 7,4 bei Raumtemperatur eingestellt. Ziel war das Erreichen eines pH-Wertes von 7,2 bei 37°C, so wie sie unter den Bedingungen des Langendorff-Setups während der Isolation vorherrschen.

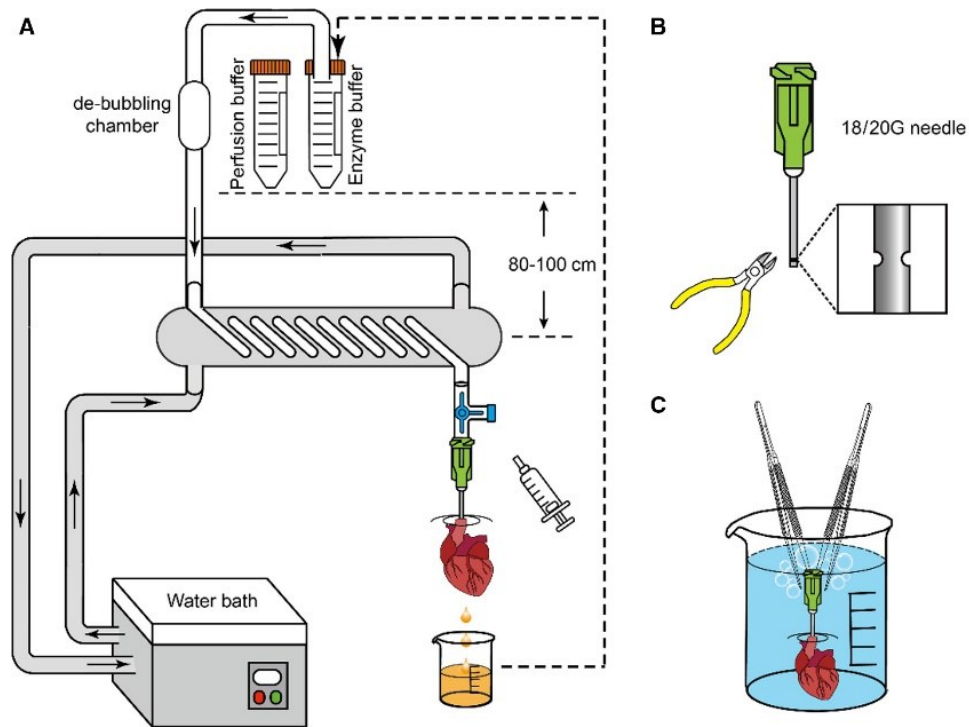
## 2.3 ISOLATIONSPROZESS

### 2.3.1 Herzentnahme und Kanülierung

Kurz vor Beginn der Isolation erfolgte eine Heparinisierung jeder Maus, um Embolisationen der Koronargefäße zu vermeiden. Hierzu wurde die Maus mit Isofluran leicht betäubt, bevor 50 I.E. Heparin (gelöst in 100 µl 0,9% NaCl) intraperitoneal appliziert wurden. Die Maus wurde anschließend für 20 min zurückgesetzt, um eine optimale Verteilung des Heparins zu gewährleisten. 20 min *post injectionem* erfolgte die tiefe Narkotisierung der Versuchsmaus mit Isofluran, auf die ein rascher Genickbruch folgte. Die nunmehr leblose Maus wurde auf einer Styroporplatte fixiert, das obere Abdomen knapp unterhalb des Sternums eröffnet und das Diaphragma vorsichtig durchtrennt. Mit zwei Scherenschnitten in der Länge der linken und rechten Axillarlinie konnte der vordere Anteil des Thorax mobilisiert werden und wurde zwecks besseren Zugangs nach kranial aufgeschlagen und fixiert. Das Herz wurde vorsichtig von Resten des Perikards befreit und die Aorta mit einem einzelnen Scherenschnitt knapp oberhalb der Aortenklappe durchtrennt.

Im Folgenden wurde das Herz in einer Petrischale, die mit Kanülierungslösung gefüllt wurde, unter einem Mikroskop in Position gebracht, mithilfe zweier feiner Pinzetten die Aorta identifiziert und über die stumpfe Spitze einer Kanüle geführt. Nach der Fixierung der Aorta auf der Kanüle mithilfe eines chirurgischen Fadens und doppeltem Knoten konnte das Herz nun durch eine angeschlossene Spritze retrograd über die Koronarien perfundiert werden, das Abblassen der Koronarien war dabei Zeichen für eine erfolgreiche und suffiziente Perfusion. Das Herz konnte nun an das vorbereitete Langendorff-Setup angeschlossen werden (Abbildung 9).

### 2.3.2 Langendorff-Setup und Kalzium Aufbau



**Abbildung 9: Schematischer Aufbau des Langendorff Setups**

Das verwendete Langendorff-Setup besteht aus zwei separaten Glasbehältern, zu befüllen mit Perfusionspuffer sowie Myozytenverdauungslösung, die über zwei Schläuche zu einem Drei-Wege-Hahn zusammengeführt werden. Über einen gemeinsamen weiteren Schlauch werden die Lösungen über eine Peristaltikpumpe mit einer Blasenfalle verbunden, nachgeordnet nach der Blasenfalle befindet sich ein Konnektor zum Anbringen der Kanüle. Glasbehälter und Blasenfalle sind doppelwandig und an einen Wasserkreislauf angeschlossen, sodass die Lösungen durch die Erwärmung des zirkulierenden Wassers auf eine gewünschte Temperatur gebracht werden können. Übernommen von Li *et al.* (2020).

Die Wassertemperatur des Setups musste hierbei so gewählt werden, dass die zur Herzperfusion verwendeten Lösungen am Übergang zur Kanüle 37°C erreichten. Die Geschwindigkeit der Peristaltikpumpe wurde auf 3 ml/min eingestellt.

Nachdem die Kanüle am Setup fixiert wurde, wurde das Herz mit Perfusionspuffer für 90 Sekunden retrograd perfundiert, danach mithilfe des Drei-Wege-Hahns auf die Myozytenverdauungslösung gewechselt und das Herz für weitere 450 Sekunden perfundiert, Letztere enthält die Enzyme Trypsin und Liberase. Ziel war die Verdauung der extrazellulären Matrix des Herzens mithilfe der Enzyme, sodass einzelne Kardiomyozyten aus dem Zellverband gelöst werden konnten.

Nach der erfolgreichen 450-sekündigen Verdauung konnte nun das Herz von der Kanüle gelöst werden und in einem kleinen Messbecher, gefüllt mit Stopplösung I, durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mechanisch aufgelöst werden. Die Stopplösung hat den Zweck, den Verdauungsprozess zu stoppen und eine Nährgrundlage für die Zellen zu bieten. Die entstandene Zellsuspension wurde mithilfe eines Netzfilters (Maschengröße 250  $\mu\text{m}$ ) von unverdauten Herzbestandteilen getrennt und zum Pelletieren in einem *Falcon Röhrchen* aufrecht stehen gelassen.

Um die für eine adäquate Zellkontraktion notwendige Kalziumkonzentration wieder zu erreichen, wurde im Folgenden sukzessive den Zellen wieder Kalzium hinzugefügt. Dies erfolgte über insgesamt vier Schritte, bei denen jeweils der Überstand der im *Falcon Röhrchen* befindlichen Flüssigkeit abpipettiert wurde, ohne das Pellet zu beeinträchtigen, um dann die nächste Kalziumstufe vorsichtig hinzuzugeben. Die Kalziumkonzentration verdoppelte sich schrittweise von 0 mM, 125  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  auf 500  $\mu\text{M}$ . Im letzten Schritt wurde den Zellen Tyrode-Lösung hinzugegeben, mit einer Kalziumendkonzentration von 1 mM.

Nach erfolgtem Kalzium-Aufbau wurde nun ein Teil der Zellen mit dem Kalziumempfindlichen und ratiometrischen Farbstoff Fura-2AM beladen. Das Zellpellet wurde vorsichtig resuspendiert, 400  $\mu\text{l}$  Zellsuspension entnommen und mit 3,6 ml Tyrode-Lösung vermischt, um die Zelldichte zu reduzieren und die gewünschte Fura-2AM Konzentration zu gewährleisten.

Fura-2AM kam nach folgendem Schema in der Färbung zum Einsatz: 50  $\mu\text{g}$  Fura-2AM wurden in 50  $\mu\text{l}$  Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst (1 mM) und aliquotiert. 2  $\mu\text{l}$  des gelösten Fura-2AM konnten nun in 2 ml Zellsuspension vermischt werden um 2  $\mu\text{M}$  Fura-2AM Endkonzentration in der Suspension zu erreichen. Die gewonnenen ventrikulären Kardiomyozyten wurden für 20 min mit Fura-2AM inkubiert, bevor sie nach der abwechselnden Anregung des Farbstoffes mit der Lichtwellenlänge 340 nm und 380 nm bei 500 Hz im nächsten Schritt simultan mit der Sarkomerlänge gemessen wurden. Fura-2AM hat die Eigenschaft, die Wellenlänge der maximalen Absorption zu ändern, abhängig von der Bindung an Kalzium. So hat an Kalzium gebundenes Fura-2AM eine Erregungswellenlänge von 335 nm, das von freiem Fura-2AM eine Wellenlänge von 363 nm. Die Emissionswellenlänge ändert sich ebenfalls leicht, bei an Kalzium gebundenem Fura-2AM beträgt sie 505 nm, bei nicht gebundenem Fura-2AM 512 nm. Der Unterschied zwischen

Erregungs- und Emissionswellenlänge wird als Stokes-Verschiebung bezeichnet und resultiert aus dem Energieverlust, der zwischen Absorption und Emission auftritt. Ein Teil der eintreffenden Energie der Photonen wird hierbei in Schwingungsenergie bzw. Wärme umgewandelt, das emittierte Licht hat somit eine niedrigere Energiedichte und folglich eine größere Wellenlänge (vgl. Overview of Fluorescence Excitation and Emission Fundamentals, Olympus Lifesciences, o.D.). Durch die Messung der Fluoreszenz sowohl des Kalzium-gebundenen als auch des Kalzium-freien Fura2-AM kann im darauffolgenden Schritt das Verhältnis der beiden Werte bestimmt werden. Dieses ratiometrische Verfahren reduziert den Einfluss von ‚Photobleaching‘ sowie einer möglichen ungleichmäßigen Aufnahme von Fura-2AM in die Zellen erheblich (vgl. Ratiometric calcium indicators, EMBL, o.D.).

## **2.4 MESSUNGEN UND PACING-PROTOKOLL**

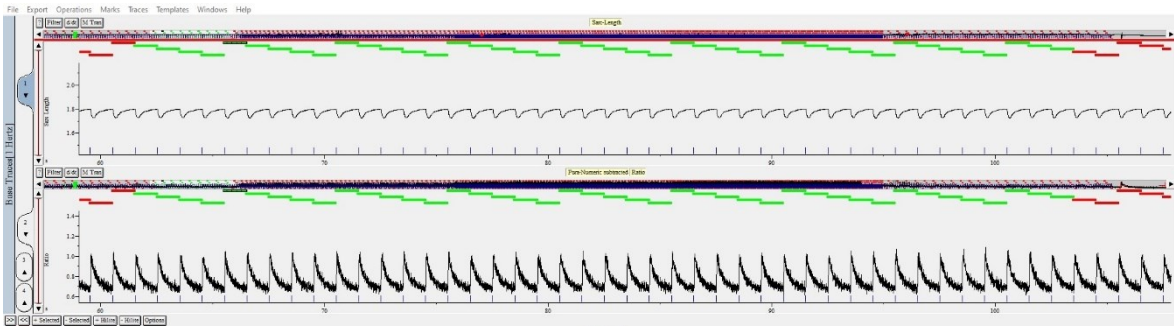
Messungen wurden mithilfe eines Nikon Eclipse Ti2-U Epifluoreszenzmikroskops (Nikon, Tokio, Japan) durchgeführt, zusätzlich wurden zur Messung der Sarkomer- und Kalziumtransienten folgende Geräte eingesetzt: Als Lichtquelle wurde eine ‚HyperSwitch Light Source‘ (IonOptix, Dublin, Irland) benutzt, sowie ein ‚Cell Framing Adapter‘, ‚Myo-Cam‘, ‚Fluorescence System Interface‘, ‚Cell Stimulation Chamber‘ und ‚MyoPacer‘, allesamt ebenfalls von IonOptix. Alle Geräte wurden über die Software IonWizard gesteuert (Version 7.2 revision 2).

Unter beständigem Flow mit Tyrode-Lösung wurden die Zellen mit dem Feldstimulator ‚MyoPacer‘ bei 1 Hz stimuliert und eine quergestreifte und nicht-spontanaktive Zelle ausgewählt. Mithilfe der IonOptix Software und dem Cell Framing Adapter wurde das Auswahlfenster auf die Zelle gelegt und die Messung gestartet.

Das Messprotokoll umfasste 5 Stufen: es wurde jeweils 120 Sekunden mit 1 Hz, 2 Hz, 3 Hz, 4 Hz und wiederum 1 Hz nach Durchlauf des Protokolls stimuliert, die Zellkontraktion und Kalziumtransienten mit der IonWizard Software aufgezeichnet und digital gespeichert. Es wurden abwechselnd mit Fura-2AM beladene und unbeladene Zellen gemessen, um den eventuellen Einfluss vom Farbstoff auf die Kontraktilitätsparameter auszuschließen, sowie ein Bias hinsichtlich der Zeitspanne nach Isolationsbeginn zu vermeiden.

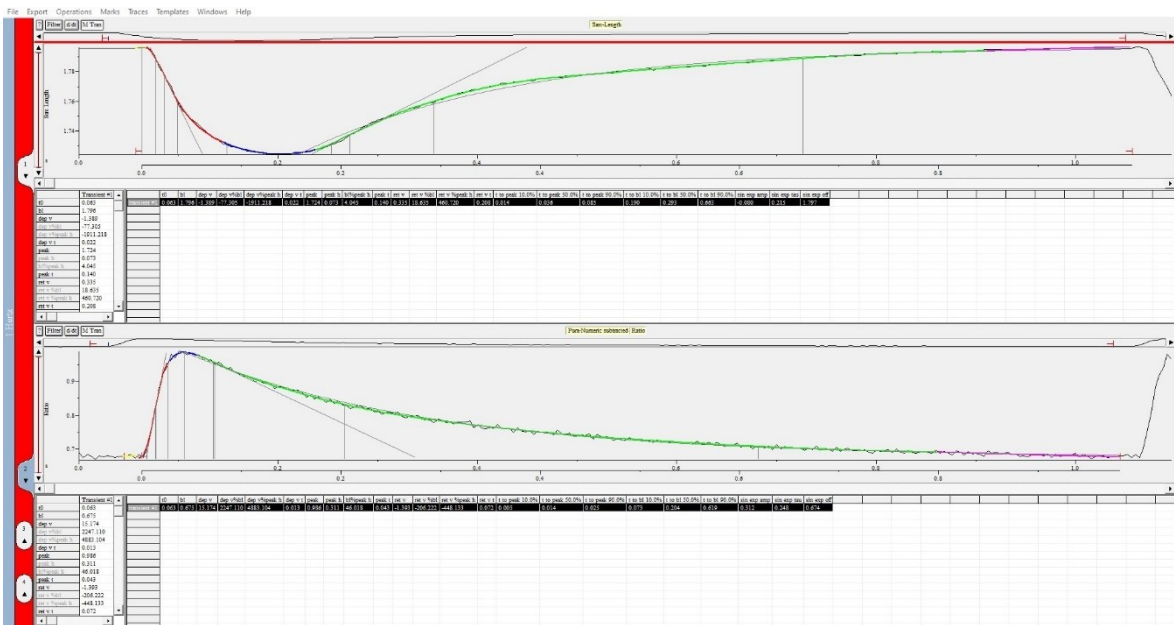
## 2.5 DATENANALYSE

Die Datenauswertung erfolgte ebenfalls mit der Software IonWizard, herangezogen wurde hierbei die Sarkomerlänge sowie für das Kalzium die Ratio zwischen den Fura2-AM Signalen bei 340 nm und 380 nm. Hierbei wurden die Transienten des Sarkomers bzw. des Kalziums jeweils aus 30 Sekunden langen Aufnahmen einer einzelnen Stimulationsfrequenz gemittelt, auf Artefakte überprüft und diese gegebenenfalls aus der Analyse ausgeschlossen. Bei der Auswahl der Transienten wurde darauf geachtet, dass diese einen Steady-State erreicht haben; die einzelnen Kontraktionen sollten hinsichtlich ihrer Baseline nicht voneinander abweichen und keine drastischen Unterschiede hinsichtlich der Stärke der Kontraktionen aufweisen (Abbildung 10). Das Signal wurde jeweils für alle fünf Frequenzen gemittelt. Nach der Mittelung wird mithilfe des Analyseprogramms eine Kurve modelliert, die der Kinetik der Zellkontraktion und Kalziumtransienten folgt (Abbildung 11).



**Abbildung 10: Exemplarische Transientenanalyse/Auswahl**

Im oberen Teil der Abbildung sind die einzelnen Kontraktionen der Zelle bei 1 Hz zu sehen, im unteren Teil die entsprechenden Fluoreszenz-Signale als F340/380 Fura-2AM Ratio.



**Abbildung 11: Exemplarische Transientenanalyse/Kurvenmodellierung**

Abgebildet sind die gemittelten Transienten der Sarkomerlänge (oben) als auch des Fura-2AM Signals als F340/380 Ratio (unten), über diese wird eine Kurve modelliert und die zu untersuchenden Parameter ausgegeben.

Die Datenanalyse erfolgte verblindet. Es war somit nicht ersichtlich, welchem Genotyp die Zelle zuzuordnen war. Die Entblindung erfolgte nach der vollständigen Analyse aller Frequenzen, um den erhobenen Werten für die weitere Datenverarbeitung wieder einen Genotyp zuweisen zu können. Die erhobenen Daten wurden schließlich zur weiteren Bearbeitung in eine Microsoft-Excel-Datei kopiert und sortiert. Diese wird hinsichtlich der im Ergebnisteil beschriebenen Parameter untersucht.

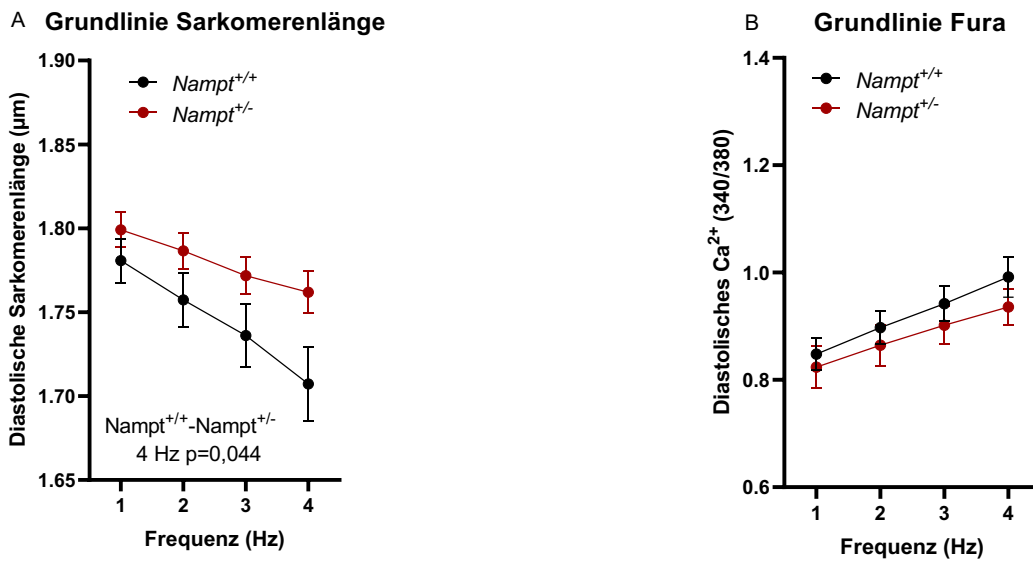
## 2.6 GRAFISCHE INTERPRETATION UND STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die gewonnenen Daten wurden mithilfe von Graphpad 8.4.0. (GraphPad, San Diego, USA) visuell aufbereitet, die einzelnen Analyseparameter wurden zu diesem Zweck über die Zeit von 1 bis 4 Hz aufgetragen, für die einzelnen Frequenzen wurde der Mittelwert der Daten sowie der Standardfehler (SEM) angegeben. Es wurden Ausreißer auf der Grundlage der Kalzium-Baseline-Werte berechnet, und entsprechende Ausreißer außerhalb des 1,5 Interquartil-Bereichs (engl.: interquartile range, IQR) aus der grafischen Auswertung exkludiert. Anschließend wurde ein gemischtes Modell (engl.: mixed-model) erstellt, um die Signifikanz möglicher Unterschiede der einzelnen Gruppen innerhalb der jeweiligen Frequenzen (1-4 Hz) zu bestimmen.

Hierbei wurden drei fixierte Effekte auf Signifikanz untersucht. Diese Effekte sind die Frequenz, folglich die Veränderung des untersuchten Parameters in Abhängigkeit zu 1-4 Hz; der Genotyp (*Nampt<sup>+/+</sup>* versus *Nampt<sup>+/-</sup>*) sowie Frequenz\*Genotyp. Dieser letzte Wert beschreibt, unter der Annahme von Signifikanz, eine Veränderung des Parameters in Abhängigkeit zu beiden Werten (Frequenz und Genotyp), betrachtet also sinngemäß einen Unterschied der Steigung der Kurve zwischen den Genotypen (Tabelle 2). Das Signifikanzniveau zur Ablehnung der Nullhypothese wurde auf  $p=0,05$  gelegt. Ein Auftreten von Signifikanz in diesen fixierten Effekten bedeutet, dass diese Effekte eine Auswirkung auf die Veränderung der Graphen haben.

Um die Aussagekraft zu verbessern, wurde bei allen Parametern mit signifikanten Unterschieden in den fixierten Effekten zusätzlich der Fisher's LSD Post-Hoc-Test durchgeführt, um die beiden Genotypen miteinander zu vergleichen (*Nampt<sup>+/+</sup>* vs. *Nampt<sup>+/-</sup>*; Tabelle 3). Da stets nur zwei Werte miteinander zu vergleichen waren, wurde hierbei auf die Korrektur des Signifikanzniveaus durch Alphafehlerkumulierung bei multiplen Tests verzichtet. Der Fisher's LSD Test konnte bei höheren Frequenzen signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen in einzelnen Parametern aufzeigen (Tabelle 3, Seite 47).

### 3 ERGEBNISSE



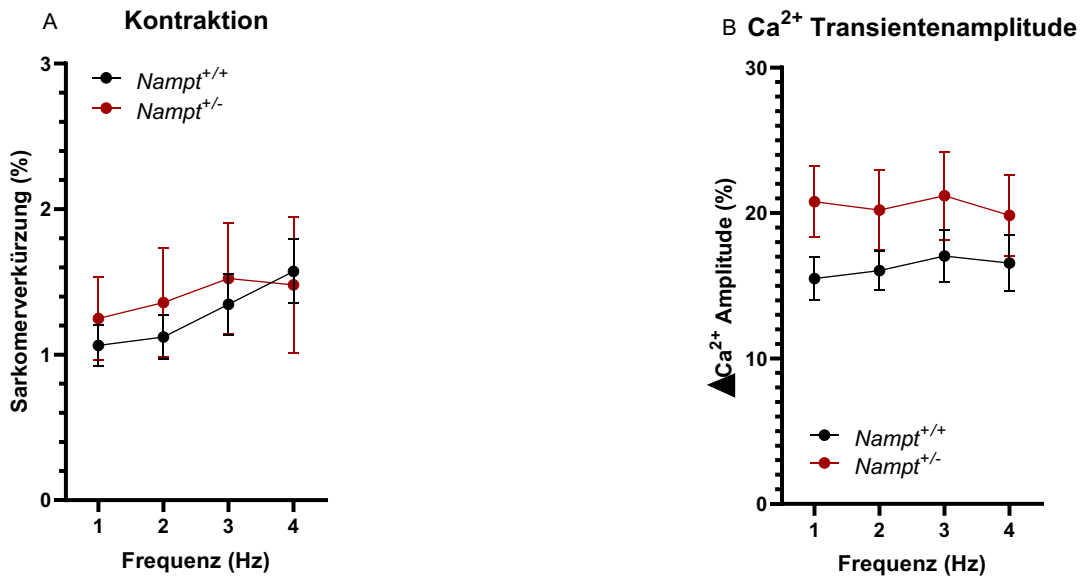
**Abbildung 12: Baseline Sarkomerlänge und diastolisches Ca<sup>2+</sup>**

(A) Baseline Sarkomerlänge: Beschreibt die Sarkomerlänge in der Diastole zum Zeitpunkt vor der Stimulation und ist damit Indikativ für die Gesundheit der Zelle. Werte im Bereich von 1,8 µm deuten laut Literatur auf gute Zellgesundheit hin, Zellen mit Werten deutlich darunter werden aufgrund mangelnder Gesundheit für die Messung nicht in Betracht gezogen.

(B) Baseline diastolisches Ca<sup>2+</sup>

N=15 Zellen für *Nampt*<sup>+/+</sup> und N=19 Zellen für *Nampt*<sup>+/-</sup>.

Die Ergebnisse der Sarkomerbaseline zeigen signifikante Unterschiede hinsichtlich des frequenzabhängigen Abfalls der Baseline: die *Nampt*<sup>+/-</sup> Zellen haben dabei einen schwächeren Abfall der Sarkomerlänge als die Wildtyp Zellen. Bei 4 Hz ist der Unterschied zwischen den Genotypen signifikant mit einem p-Wert von 0,044. Sowohl die Baseline der Sarkomere als auch die der diastolischen Kalziumkonzentration zeigen Signifikanz des Effekts der Frequenz mit einem p-Wert von <0,0001. Zudem ist der Interaktionseffekt Frequenz\*Genotyp der Sarkomerbaseline signifikant mit einem p-Wert von 0,0007.



**Abbildung 13: Relative Kontraktion der Sarkomere und Ca<sup>2+</sup> Amplitude**

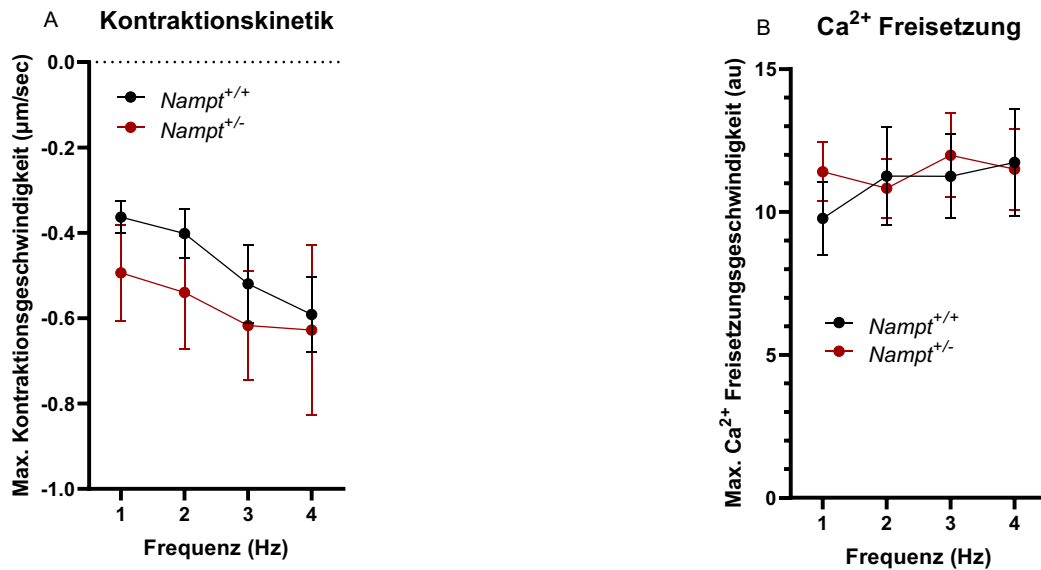
(A) Relative Kontraktion der Sarkomere ist das Verhältnis zwischen dem Baseline-Wert und dem Peak-Wert. Dieser Parameter gibt Auskunft über die prozentuelle Veränderung der Sarkomerlänge bei der Kontraktion.

(B) Relative Ca<sup>2+</sup> Amplitude bei der Kontraktion ist das Verhältnis zwischen dem Baseline-Wert und dem Peak-Wert. Dieser Parameter gibt Auskunft über die prozentuelle Veränderung des Fura-2AM Fluoreszenzsignals innerhalb der Zelle im Rahmen der Kontraktion.

N=15 Zellen für *Nampt*<sup>+/+</sup> und N=19 Zellen für *Nampt*<sup>+/-</sup>.

Die relative Kontraktion der Sarkomere war ähnlich in beiden Genotypen.

Ähnlich verhält es sich mit der relativen Kalziumtransienten-Amplitude. Diese war vergleichbar zwischen *Nampt*<sup>+/+</sup> und *Nampt*<sup>+/-</sup> Kardiomyozyten, zeigte somit zwischen den Genotypen keine signifikanten Unterschiede. Bei 1 Hz konnte zwischen den Genotypen mit einem p-Wert von 0,07 annähernd Signifikanz erreicht werden.



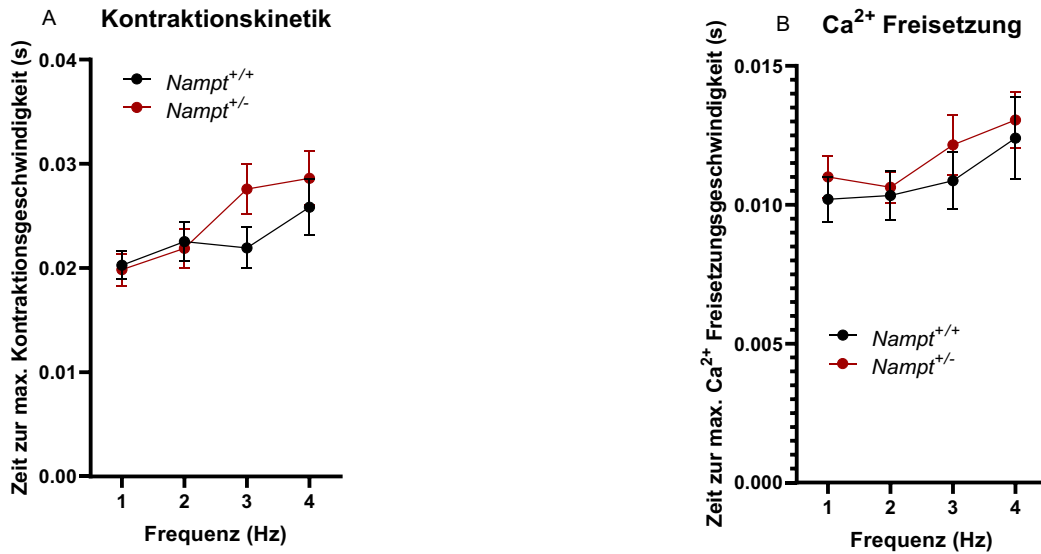
**Abbildung 14: Maximale Geschwindigkeit der Sarkomer-Verkürzung und globalen Ca<sup>2+</sup> Freisetzung**

(A) Maximale Geschwindigkeit der Sarkomer-Verkürzung wird durch das Anlegen einer Geraden an den Punkt mit der höchsten negativen Steigung der Kurve gemessen.

(B) Maximale Geschwindigkeit der globalen Ca<sup>2+</sup> Freisetzung lässt eine Aussage hinsichtlich der Fähigkeit der Zelle zu, bei Stimulation Ca<sup>2+</sup> freizusetzen und damit die Kontraktion der Sarkomere zu ermöglichen. Langsamere Ausschüttung von Ca<sup>2+</sup> resultiert hierbei in der entsprechend langsameren Kontraktion der Sarkomere.

N=15 Zellen für *Namp1*<sup>+/+</sup> und N=19 Zellen für *Namp1*<sup>+/-</sup>.

Die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit der Sarkomere zeigt weder Signifikanz des Frequenzeffekts als auch im Vergleich der Genotypen. Ähnlich verhält es sich mit der maximalen Geschwindigkeit der Kalziumausschüttung aus dem SR, auch hier kann in den Effekten der Frequenz und des Genotyps keine Signifikanz gezeigt werden.



**Abbildung 15: Zeitdauer bis zur maximalen Geschwindigkeit der Sarkomer-Verkürzung und globalen Ca<sup>2+</sup> Freisetzung**

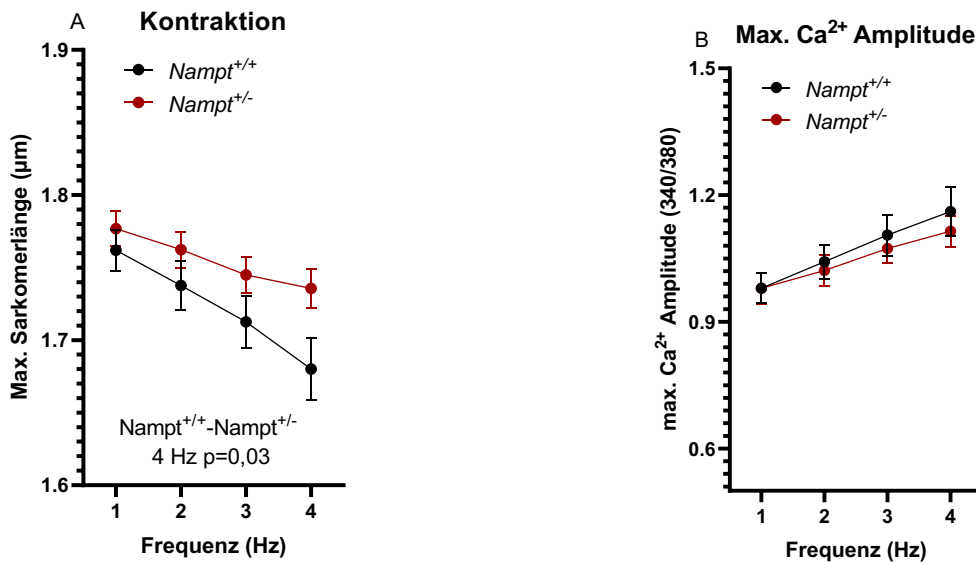
(A) Zeit bis zur maximalen Geschwindigkeit der Sarkomer-Verkürzung. Je kürzer die Dauer der maximalen Kontraktion der Sarkomere nach der elektrischen Feldstimulation, desto besser ist die Kontraktilität der Zelle einzustufen.

(B) Zeit bis zur maximalen Geschwindigkeit der globalen Ca<sup>2+</sup> Freisetzung. Mit diesem Parameter wird die Zeitdauer angegeben, die nach der Stimulation benötigt wird, um den maximalen Ca<sup>2+</sup> Anstieg im Zytosol zu erreichen.

N=15 Zellen für *Nampt*<sup>+/+</sup> und N=19 Zellen für *Nampt*<sup>+/-</sup>.

Die Zeit zur maximalen Kontraktionsgeschwindigkeit der Sarkomere ist zwischen den Genotypen vergleichbar, bei 3 Hz kann mit einem p-Wert von 0,07 annähernd Signifikanz beschrieben werden. Der Effekt der Frequenz ist mit einem p-Wert von <0,0001 signifikant.

Auch hier verhält sich die Kalziumamplitude ähnlich, der Effekt der Frequenz weist Signifikanz mit einem p-Wert von 0,003 aus. Im Vergleich der Genotypen kann jedoch keine Signifikanz gezeigt werden.



**Abbildung 16: Maximale Sarkomer-Verkürzung und Ca<sup>2+</sup> Amplitude**

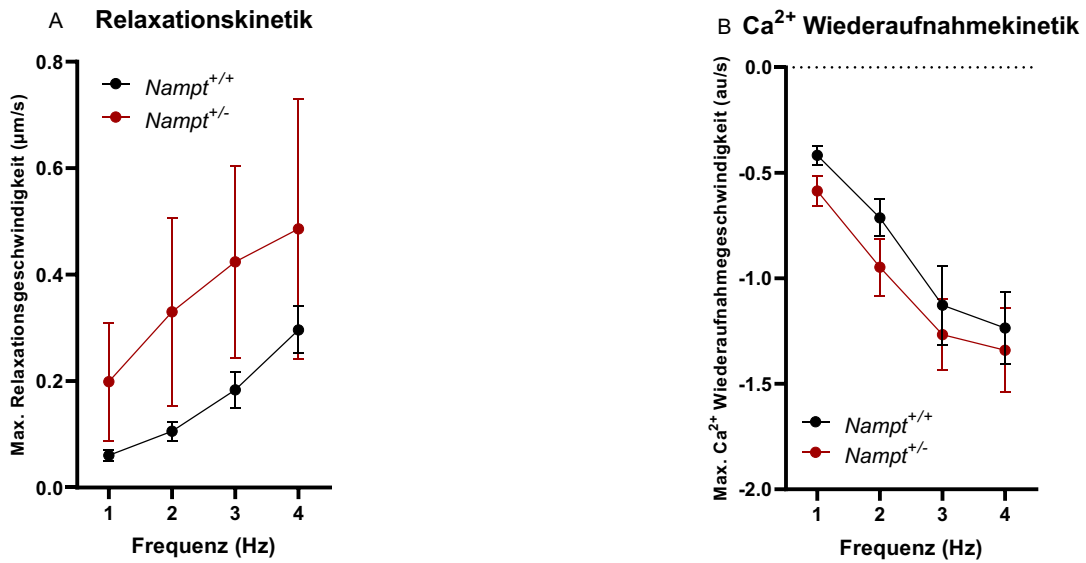
(A) Maximale Sarkomer-Länge zum Zeitpunkt der maximalen Kontraktion.

(B) Maximale Ca<sup>2+</sup> Amplitude innerhalb der Zelle wird durch den Peak Fura-2/AM-Wert (als 340/380 nm Ratio) repräsentiert.

N=15 Zellen für *Nampt*<sup>+/+</sup> und N=19 Zellen für *Nampt*<sup>+/-</sup>.

Die Wildtyp Kardiomyozyten zeigten eine stärkere Kontraktion der Sarkomere im Vergleich zu *Nampt*<sup>+/-</sup> Zellen bei 4 Hz (p=0,03).

Der Effekt der Frequenz zeigt sowohl bei der maximalen Sarkomerkontraktion als auch der maximalen Kalziumausschüttung Signifikanz mit einem p-Wert von <0,0001. Im Interaktionseffekt Frequenz\*Genotyp der maximalen Sarkomerkontraktion konnte ebenfalls Signifikanz mit einem p-Wert von 0,002 festgestellt werden.



**Abbildung 17: Maximale Geschwindigkeit der Relaxation und maximale Geschwindigkeit der Ca<sup>2+</sup> Wiederaufnahme**

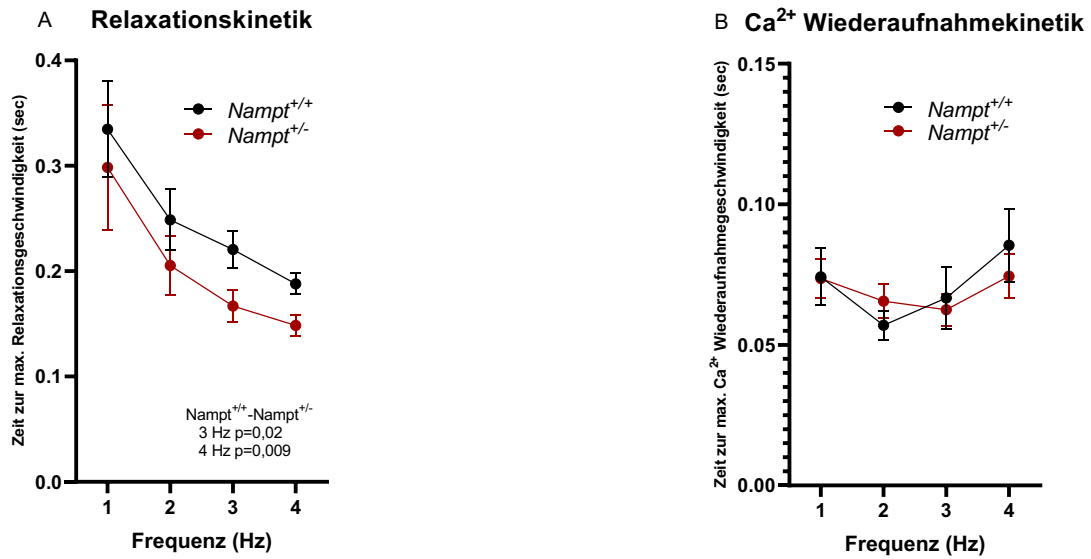
(A) Die maximale Geschwindigkeit, mit der die Zelle nach erfolgter Kontraktion wieder in den relaxierten Zustand übergeht.

(B) Die maximale Geschwindigkeit, mit der die Zelle nach erfolgter Kontraktion das Ca<sup>2+</sup> wieder in das sarkoplasmatische Retikulum aufnehmen kann und wieder bereit ist für die nächste Kontraktion.

N=15 Zellen für *Namp1*<sup>+/+</sup> und N=19 Zellen für *Namp1*<sup>+/-</sup>.

Die maximale Relaxationsgeschwindigkeit der Sarkomere zeigt weder im Frequenzeffekt noch im Vergleich der Genotypen signifikante Unterschiede.

Die Wiederaufnahmegeschwindigkeit des Kalziums ist im Effekt der Frequenz hochsignifikant mit einem p-Wert von <0,0001. Im Vergleich der Genotypen zeigt sich bei 1 Hz ein annähernd signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von 0,056.



**Abbildung 18: Zeitdauer bis zur maximalen Geschwindigkeit der Relaxation und maximalen Geschwindigkeit der Ca<sup>2+</sup> Wiederaufnahme**

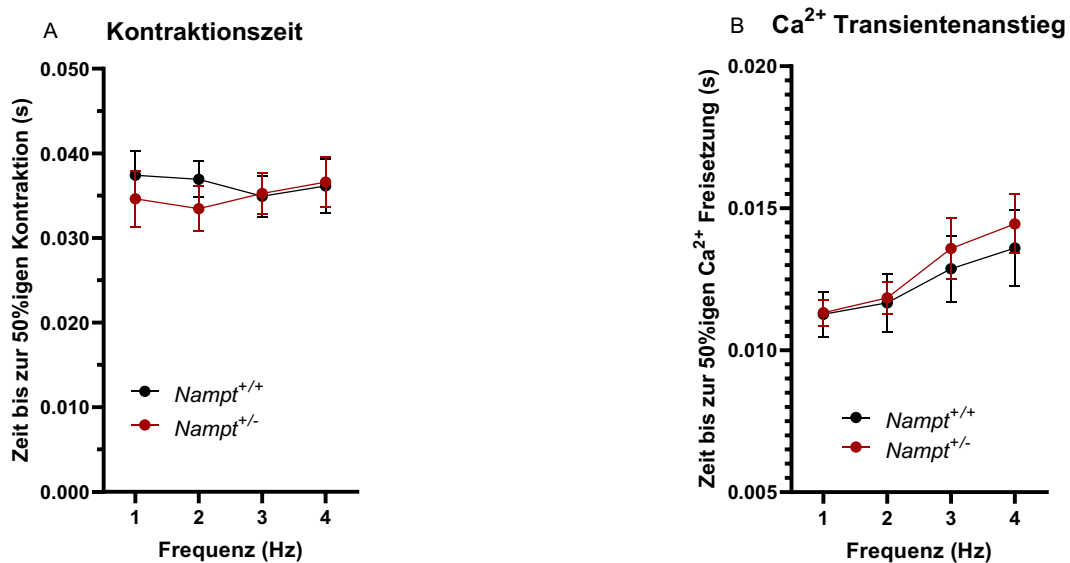
(A) Zeitdauer (time-to-peak) bis zur maximalen Geschwindigkeit der Relaxation.

(B) Zeitdauer bis zur maximalen Geschwindigkeit der Ca<sup>2+</sup> Wiederaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum.

N=15 Zellen für *Nampt*<sup>+/+</sup> und N=19 Zellen für *Nampt*<sup>+/-</sup>.

Die *Nampt*<sup>+/-</sup> Zellen zeigten eine insgesamt kürzere Zeitdauer bis zur Erreichung der maximalen Relaxationsgeschwindigkeit der Sarkomere als die *Nampt*<sup>+/+</sup>-Zellen. Der Vergleich der Genotypen ergab Signifikanz bei 3 Hz (p-Wert 0,02) und 4 Hz (p-Wert 0,009). Im Gegensatz dazu war die Zeitdauer bis zur maximalen Kalziumwiederaufnahme in das SR in beiden Genotypen ähnlich.

Der Effekt der Frequenz war sowohl in der Relaxationskinetik des Sarkomers mit einem p-Wert von 0,0002 als auch der Wiederaufnahmekinetik des Ca<sup>2+</sup> mit einem p-Wert von 0,03 signifikant.



**Abbildung 19: Kinetik bis zu 50% der maximalen Kontraktion und maximalen Ca<sup>2+</sup> Amplitude**

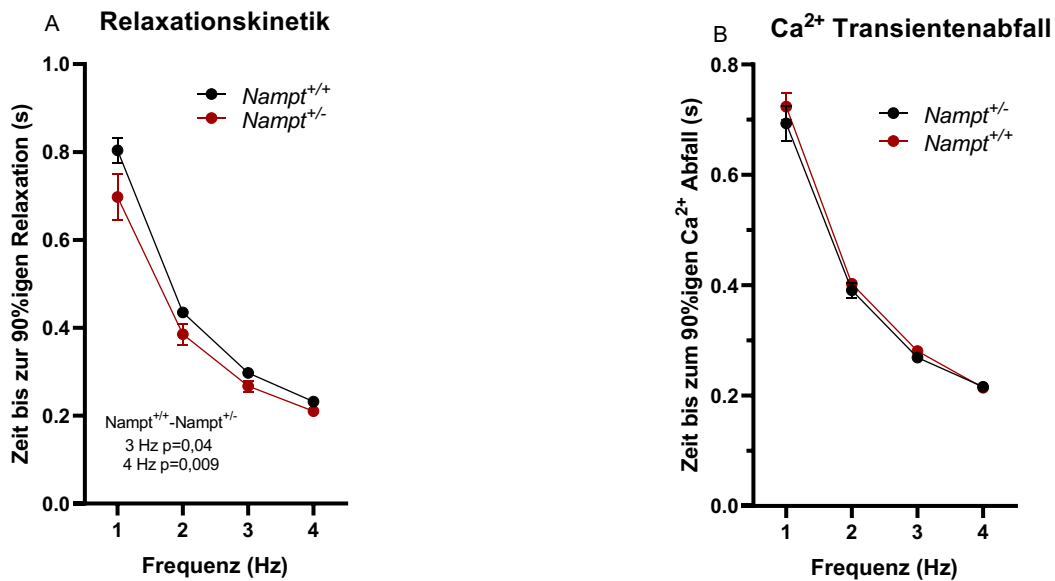
(A) Zeit bis zur 50% der maximalen Kontraktion.

(B) Zeit bis zur 50% der maximalen Ca<sup>2+</sup> Amplitude

N=15 Zellen für *Nampt*<sup>+/+</sup> und N=19 Zellen für *Nampt*<sup>+/-</sup>.

Die Zeitwerte zur 50% der maximalen Kontraktion und maximalen Ca<sup>2+</sup> Amplitude waren in den *Nampt*<sup>+/-</sup> und *Nampt*<sup>+/+</sup> Kardiomyozyten vergleichbar, es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Der Effekt der Frequenz zeigte einen signifikanten Einfluss auf die Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung mit einem p-Wert von 0,0002.



**Abbildung 20: Relaxationskinetik und die Zeitdauer bis zur Ca<sup>2+</sup> Wiederaufnahme in das SR**

(A) Zeitdauer bis zur 90%igen Relaxation der Sarkomere. Während der Relaxationsphase der Sarkomere kommt die Zelle immer näher an den ursprünglichen Baselinewert heran. Dieser Parameter beschreibt den Zeitpunkt des Erreichens von 90% der Differenz zwischen Peak-Wert und Baseline-Wert.

(B) Zeitdauer bis zur 90%igen Rückkehr zur Fura-2AM Baseline. Nach erfolgter Kontraktion kommt zur Ca<sup>2+</sup> Wiederaufnahme in das SR um den ursprünglichen Baseline-Wert wiederherzustellen.  
N=15 Zellen für *Nampt*<sup>+/+</sup> und N=19 Zellen für *Nampt*<sup>+/-</sup>.

Die *Nampt*<sup>+/-</sup> Zellen zeigten insgesamt schnellere Relaxationskinetik der Sarkomere als die *Nampt*<sup>+/+</sup>-Zellen. Der Vergleich der Genotypen ergibt signifikante Unterschiede bei 3 Hz (p-Wert 0,04) und 4 Hz (p-Wert 0,009).

Die Zeitdauer bis zur maximalen (gesamten) Kalziumwiederaufnahme in das SR zeigte im Gegensatz dazu bei allen untersuchten Frequenzen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen.

Der Effekt der Frequenz hatte sowohl bei der Relaxationskinetik als auch der Kalziumwiederaufnahme signifikanten Einfluss mit einem p-Wert <0,0001.

## 4 DISKUSSION

---

Ziel dieser Arbeit war zu testen, ob die Reduktion von NAD<sup>+</sup> Auswirkungen auf die Kalzium Homöostase und Kontraktilität bzw. Relaxation der Kardiomyozyten hat.

Bei Betrachtung der maximalen Kontraktion der Sarkomere zeigt sich in der Kontrollgruppe ein kleinerer numerischer Peak (und damit ein kürzeres Sarkomer am Punkt der maximalen Kontraktion) als bei den *Nampt*<sup>+/-</sup>-Kardiomyozyten. Diese Beobachtung folgt der aufgestellten Hypothese.

Die Sarkomergrundlinie der Kontrollzellen war hingegen kleiner als die der *Nampt*<sup>+/-</sup>-Kardiomyozyten, was auf eine eingeschränkte Funktion der Kontrollzellen hindeutet. Zudem steigt die diastolische Kalziumkonzentration bei zunehmender Frequenz in den Kontrollzellen stärker an als in den *Nampt*<sup>+/-</sup>-Kardiomyozyten. Ein konstantes Konzentrationsniveau auch bei höheren Frequenzen ist grundsätzlich indikativ für gute Zellgesundheit, ist aber bei den haploinsuffizienten Zellen stärker vertreten als in den Kontrollzellen und widerspricht somit der Hypothese. Die benötigte Zeit, um die maximale Relaxationsgeschwindigkeit des Sarkomers zu erreichen, unterscheidet sich signifikant zwischen den Genotypen bei höheren Frequenzen. Die *Nampt*<sup>+/-</sup> Zellen erreichen dabei schneller die maximale Relaxationsgeschwindigkeit als die Zellen des Wildtyps. Zeitgleich findet sich ein klarer Trend, wenn auch nicht signifikant, für eine insgesamt höhere maximale Relaxationsgeschwindigkeit der *Nampt*<sup>+/-</sup> Zellen im Vergleich zum Wildtyp. Zusammengefasst relaxieren die haploinsuffizienten Zellen schneller und erreichen die maximale Relaxationsgeschwindigkeit rascher als die Zellen der Kontrollgruppe. Diese Beobachtung wird weiter unterstützt, da die Zeit zur 90%-igen Relaxation der Sarkomere von den *Nampt*<sup>+/-</sup> Zellen signifikant kürzer ist als die der Wildtypzellen. Die Zellen kehren somit schneller in die Ausgangslage zurück als die Kontrollzellen. Dies widerspricht eindeutig der in der Forschungsfrage aufgestellten Hypothese - gegenteilige Ergebnisse wären hier zu erwarten gewesen.

Auch in anderen untersuchten Parametern finden sich ähnliche Beobachtungen. Die maximale Kalziumkonzentration ist bei den Zellen der Kontrollgruppe größer als bei den *Nampt*<sup>+/-</sup>-Kardiomyozyten, dies ist eine unerwartete Beobachtung. Zu beachten ist jedoch, dass diese Ergebnisse numerische Werte darstellen, und keine relative Veränderung beschreiben. Der maximale Peak wird durch das Niveau der Baseline beeinflusst. Bei

unterschiedlichen Werten der Baseline, wie im vorliegenden Fall, können die Sarkomere beider Zelllinien sich um die gleiche numerische Distanz verkürzen, und trotzdem Unterschiede im maximalen Peak aufweisen.

Die Betrachtung der relativen Kontraktion der Sarkomere zeigt keine Unterschiede, die relative Kalziumkonzentration weist ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zellgruppen auf, es kann nur eine Tendenz beschrieben werden: Die *Nampt<sup>+/-</sup>* Zellen zeigen einen stärkeren relativen Kalziumanstieg als die *Nampt<sup>+/+</sup>* Zellen. *Nampt<sup>+/-</sup>* Zellen müssen daher eine größere Menge an Kalzium ausschütten, um die gleiche Kontraktionsleistung der Wildtypzellen zu erreichen. Dies ist hinweisend auf eine reduzierte Leistungsfähigkeit der *Nampt<sup>+/-</sup>* Zellen. Die Zeit bis zur maximalen Kontraktionsgeschwindigkeit ist bei haploinsuffizienten Zellen nur bei 3 Hz annähernd verlängert, die Kinetik ist demnach nicht unterscheidbar zu den Wildtyp-Zellen und folgt damit ebenfalls nicht den Erwartungen. Ein ähnlicher Effekt ist auch bei den Werten der maximalen Kalziumanstiegsgeschwindigkeit zu beobachten. Die maximale Geschwindigkeit, mit der Kalzium nach erfolgter Kontraktion wieder aus dem Zytoplasma aufgenommen wird, überwiegend durch Wiederaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum, findet in haploinsuffizienten Zellen schneller statt als in den Zellen des Wildtyps. *Nampt<sup>+/-</sup>*-Zellen müssen eine prozentuell größere Menge an  $\text{Ca}^{2+}$  in das Zytosol freisetzen, um die gleiche Kontraktion zu erzielen. Daher wird in der Konsequenz auch die Wiederaufnahmegeschwindigkeit steigen müssen, um die Funktionalität der Zelle zu gewährleisten.

Der Zeitpunkt der maximalen Wiederaufnahme unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Genotypen. Dies bedeutet, dass die haploinsuffizienten Zellen sowohl eine höhere maximale Wiederaufnahmegeschwindigkeit haben als auch diese genauso schnell erreichen wie die Zellen der Kontrollgruppe. Die Zellen beider Genotypen müssen somit gleichermaßen in der Lage sein, SERCA2a und Natrium-Kalzium Austauscher (als Haupttransportmechanismen für  $\text{Ca}^{2+}$  Clearance aus dem Zytosol) zu aktivieren, um eine ähnliche maximale Kalziumaufnahmegeschwindigkeit zu erreichen. *Nampt<sup>+/-</sup>*-Zellen können dabei sogar eine größere Menge an Kalzium aus dem Zytosol in der gleichen Zeit eliminieren wie die Zellen der Kontrollgruppe.

Die Erkenntnis, dass sich weder die Geschwindigkeiten der Kontraktion noch der Relaxation zwischen beiden Genotypen maßgeblich voneinander unterscheiden, legt die Vermutung

nahe, dass die Kinetik der haploinsuffizienten Zellen nur marginal eingeschränkt wurde. Dies wird durch die erhöhte Eliminationsgeschwindigkeit der *Nampt*<sup>+/-</sup>-Zellen unterstützt und widerspricht somit der aufgestellten Hypothese einer eingeschränkten Kinetik der *Nampt*<sup>+/-</sup>-Zellen. Das zentrale Element der Hypothese, die Annahme, dass die Kontraktion der *Nampt*<sup>+/-</sup>-Zellen eingeschränkt ist, kann durch die vorliegenden Ergebnisse nicht gestützt werden.

Im Lichte rezent veröffentlichter Studien muss angenommen werden, dass die vorliegenden Beobachtungen nicht der tatsächlichen Physiologie der haploinsuffizienten *Nampt*<sup>+/-</sup>-Zellen entsprechen, sondern viel eher durch Fehler in der Studiendurchführung erzeugt wurden. Ein potenzieller Selektionsbias könnte die vorliegenden Ergebnisse erklären, auf diesen wird auf der folgenden Seite näher eingegangen.

Weiterhin muss darauf hingewiesen werden, dass die Reduktion von NAD<sup>+</sup> in den haploinsuffizienten Zellen nicht dem erwarteten Ausmaß entsprach. Ausgehend von der Haploinsuffizienz wurde eine Halbierung des zur Verfügung stehenden NAD<sup>+</sup> angenommen, die Messungen des eingefrorenen Zellmaterials haben jedoch gezeigt, dass sich die tatsächliche Reduktion nur im Bereich von 15% befindet. Der potenzielle Effekt einer solchen recht geringen Reduktion von NAD<sup>+</sup> kann durch Messungenauigkeiten verschleiert werden und dahingehend ebenfalls die vorliegenden Ergebnisse plausibel erklären.

#### Zusammenfassung und Ausblick:

Die beobachteten Ergebnisse sind inkonsistent, unterstützen in wenigen Parametern die Forschungshypothese, in einigen anderen Parametern widersprechen sie dieser. Insgesamt kann die Fragestellung weder bewiesen noch abgelehnt werden, dies resultiert mit hoher Wahrscheinlichkeit aus der geringen Reduktion von NAD<sup>+</sup> in den haploinsuffizienten Zellen. Es stellt eine neue Erkenntnis dar, dass haploinsuffiziente Zellen trotz der Halbierung des zur Verfügung stehenden Gens eine Reduktion des verfügbaren NAD<sup>+</sup> um nur 15% aufweisen, nicht wie erwartet um 50%. Weitere Forschung in diesem Bereich ist notwendig, um dieser neuen Beobachtung nachzugehen.

## 4.1 MÖGLICHE EINSCHRÄNKUNGEN/BIAS

Aus den Ergebnissen lässt sich nicht kausal ableiten, inwieweit das vermutete Defizit der NAD<sup>+</sup> Konzentration in *Nampt*<sup>+/-</sup> Kardiomyozyten zur Differenz der untersuchten Genotypen beigetragen hat. Wir wissen, dass die Reduktion der NAMPT Proteinexpression einen in vivo Effekt auf die diastolische Dysfunktion bzw. gestörte Relaxation auslöst. Messungen des NAD<sup>+</sup> Spiegels in isolierten *Nampt*<sup>+/-</sup> Kardiomyozyten zeigten eine Reduktion des NAD<sup>+</sup> um 15%, ein potenzieller Effekt dieser geringen Reduktion kann durch zwangsläufig auftretende Varianzen der Messergebnisse verschleiert werden. Eine höhere Anzahl an Messdaten wäre notwendig, um dem entgegenzuwirken.

### 4.1.1 Systematisches Bias

Ein systematisches Bias der Versuchsreihe ist weitgehend auszuschließen, da wir jede Zelle einem identischen Protokoll unterzogen haben. Selbst bei einer fehlerhaften Messung würde sich dieser Messfehler über alle Werte hinweg manifestieren, und somit das Verhältnis der Genotypen zueinander nicht maßgeblich beeinflussen.

### 4.1.2 Selektionsbias

Während der Durchführung der Messungen zeigte sich ein subjektiver Unterschied in der Qualität der Zellen abhängig vom Genotyp, Zellen des Wildtyps waren durchschnittlich deutlich widerstandsfähiger und überstanden den Isolationsprozess häufiger als haploinsuffiziente *Nampt*<sup>+/-</sup> Zellen. Die Auswahl der zur Verfügung stehenden Zellen zur Messung reduzierte sich in der *Nampt*<sup>+/-</sup> Gruppe dadurch merklich, letztlich kann dies einen starken Bias in der Selektion darstellen. Durch das Vorhandensein von durchschnittlich 80% toter Kardiomyozyten in der Gruppe der *Nampt*<sup>+/-</sup> Zellen und durchschnittlich 40-50% toter *Nampt*<sup>+/+</sup> Kardiomyozyten (Schätzwerte) kann durch die Auswahl ausschließlich der vitalen Kardiomyozyten ein Selektionsbias entstehen und den potenziellen Unterschied der beiden Gruppen auf diese Weise schmälern und folglich verschleiern. Dies würde die unerwarteten Ergebnisse der Messungen erklären, in denen die Zellen des Wildtyps konsequent schlechter abschneiden als *Nampt*<sup>+/-</sup> Zellen. Die engere Selektion der *Nampt*<sup>+/-</sup> Zellen verzerrt dabei aufgrund des hierbei hohen Anteils an toten Zellen das Messergebnis stark ins Positive.

## 5 LITERATURVERZEICHNIS

---

- Abdellatif M. *et al.* Nicotinamide for the treatment of heart failure with preserved ejection fraction. *Sci Transl Med.* (2021).
- Armstrong, A. C. *et al.* Left ventricular mass and hypertrophy by echocardiography and cardiac magnetic resonance: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Echocardiography* 31, 12–20 (2014).
- Bhatia, R. S. *et al.* Outcome of heart failure with preserved ejection fraction in a population-based study. *N. Engl. J. Med.* 355, 260–269 (2006).
- Borbely, A. *et al.* Cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure. *Circulation* 111, 774–781 (2005).
- Borlaug, B. A. *et al.* Percutaneous pericardial resection: a novel potential treatment for heart failure with preserved ejection fraction. *Circ. Heart Fail.* 10, e003612 (2017).
- Boyle, J. P. *et al.* Projection of the year 2050 burden of diabetes in the US adult population: dynamic modeling of incidence, mortality, and prediabetes prevalence. *Popul. Health Metr.* 8, 29 (2010).
- Brouwers, F. P. *et al.* Incidence and epidemiology of new onset heart failure with preserved versus reduced ejection fraction in a community-based cohort: 11-year follow-up of PREVENT. *Eur. Heart J.* 34, 1424–1431 (2013).
- Bursi, F. *et al.* Systolic and diastolic heart failure in the community. *JAMA* 296, 2209–2216 (2006).
- Carbone, S., Lavie, C.J. Disparate effects of obesity on survival and hospitalizations in heart failure with preserved ejection fraction. *Int J Obes* 44, 1543–1545 (2020).
- Cavalera, M., Wang, J. & Frangogiannis, N. G. Obesity, metabolic dysfunction, and cardiac fibrosis: pathophysiological pathways, molecular mechanisms, and therapeutic opportunities. *Transl. Res.* 164, 323–335 (2014).
- Ceia, F. *et al.* Prevalence of chronic heart failure in Southwestern Europe: the EPICA study. *Eur. J. Heart Fail.* 4, 531–539 (2002).
- Chamberlain, A. M. *et al.* Multimorbidity in heart failure: a community perspective. *Am. J. Med.* 128, 38–45 (2015).
- Colby, S. L. & Ortman, J. M. Projections of the size and composition of the U.S. population 2014 to 2060 (2015).
- Diguet, N. *et al.* Nicotinamide riboside preserves cardiac function in a mouse model of dilated cardiomyopathy. *Circulation* 137, 2256–2273 (2018).
- Doi, R. *et al.* Development of different phenotypes of hypertensive heart failure: systolic versus diastolic failure in Dahl salt-sensitive rats. *J. Hypertens.* 18,111–120 (2000).
- Dunlay, S. *et al.* Epidemiology of heart failure with preserved ejection fraction, *Nature Reviews Cardiology* 14, 591-602 (2017).
- Eurostat: Todesursachen - absolute Zahl im Berichtsland und für Einwohner, [https://ec.europa.eu/eurostat/databrowser/view/HLTH\\_CD\\_ARO\\_\\_custom\\_821229/default/table?lang=de](https://ec.europa.eu/eurostat/databrowser/view/HLTH_CD_ARO__custom_821229/default/table?lang=de) (abgerufen 04.06.2021).

Feldman, T. *et al.* Transcatheter interatrial shunt device for the treatment of heart failure with preserved ejection fraction (REDUCE LAP-HF I [Reduce Elevated Left Atrial Pressure in Patients With Heart Failure]): a phase 2, randomized, sham-controlled trial. *Circulation* 137, 364–375 (2018).

Finkelstein, E. A. *et al.* Obesity and severe obesity forecasts through 2030. *Am. J. Prev. Med.* 42, 563–570 (2012).

Fonarow, G. C. *et al.* Characteristics, treatments, and outcomes of patients with preserved systolic function hospitalized for heart failure: a report from the OPTIMIZE-HF registry. *J. Am. Coll. Cardiol.* 50, 768–777 (2007).

Gerber, Y. *et al.* A contemporary appraisal of the heart failure epidemic in Olmsted County, Minnesota, 2000 to 2010. *JAMA Intern. Med.* 175, 996–1004 (2015).

Hahn, V. S. *et al.* Endomyocardial biopsy characterization of heart failure with preserved ejection fraction and prevalence of cardiac amyloidosis. *JACC Heart Fail.* 8, 712–724 (2020).

Herrero-Galán E *et al.* Redox regulation of protein nanomechanics in health and disease: Lessons from titin. *Redox Biol.* (2019).

Ho, J. E. *et al.* Predicting heart failure with preserved and reduced ejection fraction: the International Collaboration on Heart Failure Subtypes. *Circ. Heart Fail.* 9, e003116 (2016).

Ho, J. E. *et al.* Predictors of new-onset heart failure: differences in preserved versus reduced ejection fraction. *Circ. Heart Fail.* 6, 279–286 (2013).

Hsu *et al.* The function of nicotinamide phosphoribosyltransferase in the heart, *DNA Repair* (2014).

Katsyuba, E., Romani, M., Hofer, D. *et al.* NAD<sup>+</sup> homeostasis in health and disease. *Nat Metab* 2, 9–31 (2020).

Kitzman DW, Lam CSP. Obese Heart Failure With Preserved Ejection Fraction Phenotype: From Pariah to Central Player. *Circulation.* (2017).

Kitzman *et al.* Effect of Caloric Restriction or Aerobic Exercise Training on Peak Oxygen Consumption and Quality of Life in Obese Older Patients With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* (2016).

Komajda, M. *et al.* Effect of ivabradine in patients with heart failure with preserved ejection fraction: the EDIFY randomized placebo-controlled trial. *Eur. J. Heart Fail.* 19, 1495–1503 (2017).

Lee, C. F. *et al.* Normalization of NAD<sup>+</sup> redox balance as a therapy for heart failure. *Circulation* 134, 883–894 (2016).

Lee, D. S. *et al.* Relation of disease pathogenesis and risk factors to heart failure with preserved or reduced ejection fraction: insights from the framingham heart study of the national heart, lung, and blood institute. *Circulation* 119, 3070–3077 (2009).

Lee, M. *et al.* Risk Factors for Heart Failure with Preserved or Reduced Ejection Fraction Among Medicare Beneficiaries: Application of Competing Risks Analysis and Gradient Boosted Model. *Clinical epidemiology* 12, 607-616. (2020).

Lenzen, M. J. *et al.* Differences between patients with a preserved and a depressed left ventricular function: a report from the EuroHeart Failure Survey. *Eur. Heart J.* 25, 1214–1220 (2004).

- Li H, *et al.* Optimized Langendorff perfusion system for cardiomyocyte isolation in adult mouse heart. *J Cell Mol Med.* (2020).
- Li, Y., Lang, P. & Linke, W. Titin stiffness modifies the force-generating region of muscle sarcomeres. *Sci Rep* 6, 24492 (2016).
- Luo, M. & Anderson, M. E. Mechanisms of altered Ca<sup>2+</sup> handling in heart failure. *Circ. Res.* 113, 690–708 (2013).
- McMurray, J. J. Clinical practice. Systolic heart failure. *N. Engl. J. Med.* 362, 228–238 (2010).
- Mikhalkova, D. *et al.* Bariatric surgery-induced cardiac and lipidomic changes in obesity-related heart failure with preserved ejection fraction. *Obesity* 26, 284–290 (2018).
- Mishra, S., Kass, D.A. Cellular and molecular pathobiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Nat Rev Cardiol* (2021).
- Nakamura, M. & Sadoshima, J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat. Rev. Cardiol.* 15, 387–407 (2018).
- Overview of Fluorescence Excitation and Emission Fundamentals, Olympus Lifesciences, (o.D.) <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/lightandcolor/fluoroexcitation/> (abgerufen 04.11.2021)
- Owan, T. E. *et al.* Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N. Engl. J. Med.* 355, 251–259 (2006).
- Pandey, A. *et al.* Exercise training in patients with heart failure and preserved ejection fraction: meta-analysis of randomized control trials. *Circ. Heart Fail.* 8, 33–40 (2015).
- Paulus, W. J. & Tschope, C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 62, 263–271 (2013).
- Physicians' Academy for Cardiovascular Education. No Improvement in Exercise Ability with SGLT2i in TwoHF Trials, One in HFREF and One in HFpEF Patients <https://pace-cme.org/2020/01/06/no-improvement-in-exercise-ability-with-sgl2i-in-two-hf-trials-one-in-hfref-and-one-in-hfpEF-patients/> (2020).
- Rajman L. *et al.* Therapeutic Potential of NAD-Boosting Molecules: The In Vivo Evidence. *Cell Metab.* (2018).
- Ratiometric calcium indicators, EMBL, (o.D.), <https://www.embl.de/eamnet/html/calcium/ratio.htm> (abgerufen 04.11.2021)
- Redfield, M. M. Heart failure with preserved ejection fraction. *N. Engl. J. Med.* 375, 1868–1877 (2016).
- Richards, DA *et al.* CRD-733, a Novel PDE9 (Phosphodiesterase 9) Inhibitor, Reverses Pressure Overload-Induced Heart Failure. *Circ Heart Fail.* (2021).
- Rodriguez Flores, M., Aguilar Salinas, C., Piche, M. E., Auclair, A. & Poirier, P. Effect of bariatric surgery on heart failure. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 15, 567–579 (2017).

- Rongvaux A *et al.* Nicotinamide phosphoribosyl transferase/pre-B cell colony-enhancing factor/visfatin is required for lymphocyte development and cellular resistance to genotoxic stress. *J Immunol.* (2008).
- Serova, M. *et al.* A new algorithm for optimization of rate-adaptive pacing improves exercise tolerance in patients with HFpEF. *Pacing Clin. Electrophysiol.* 43, 223–233 (2020).
- Tannous C *et al.* Nicotinamide adenine dinucleotide: Biosynthesis, consumption and therapeutic role in cardiac diseases. *Acta Physiol (Oxf).* (2021).
- Tong, D, *et al.* NAD<sup>+</sup> Repletion Reverses Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *Circ Res.* (2021).
- Tucker, W. J. *et al.* Mechanisms of the improvement in peak VO<sub>2</sub> with exercise training in heart failure with reduced or preserved ejection fraction. *Heart Lung Circ.* 27, 9–21 (2018).
- United Nations, DESA, Population Division, World Population Prospects 2019, <https://population.un.org/wpp/Graphs/Probabilistic/PopPerc/65plus/900>. (abgerufen 04.06.2021)
- van Heerebeek, L. *et al.* Diastolic stiffness of the failing diabetic heart: importance of fibrosis, advanced glycation end products, and myocyte resting tension. *Circulation* 117, 43–51 (2008).
- van Heerebeek, L. *et al.* Myocardial structure and function differ in systolic and diastolic heart failure. *Circulation* 113, 1966–1973 (2006).
- Xiao, Y *et al.* Hippo pathway deletion in adult resting cardiac fibroblasts initiates a cell state transition with spontaneous and self-sustaining fibrosis. *Genes & development* 33, 21-22 (2019)
- Xu, W. *et al.* Lethal cardiomyopathy in mice lacking transferrin receptor in the heart. *Cell Rep.* 13, 533–545 (2015).
- Yamamoto, K. *et al.* Myocardial stiffness is determined by ventricular fibrosis, but not by compensatory or excessive hypertrophy in hypertensive heart. *Cardiovasc. Res.* 55, 76–82 (2002).
- Zakeri, R., Chamberlain, A. M., Roger, V. L. & Redfield, M. M. Temporal relationship and prognostic significance of atrial fibrillation in heart failure patients with preserved ejection fraction: a community-based study. *Circulation* 128, 1085–1093 (2013).
- Zile, M. R. *et al.* Myocardial stiffness in patients with heart failure and a preserved ejection fraction: contributions of collagen and titin. *Circulation* 131, 1247–1259 (2015).
- Zile, M. R. *et al.* Prevalence and significance of alterations in cardiac structure and function in patients with heart failure and a preserved ejection fraction. *Circulation* 124, 2491–2501 (2011).

## 6 APPENDIX

**Tabelle 2: Transientenparameter und statistische Analyse**

<u>Mixed effect analysis p- Werte</u>	<u>Frequenz</u>	<u>Genotyp</u>	<u>Frequenz x Genotyp</u>
Baseline Sarc	<0,0001	0,0927	0,0007
Baseline Fura	<0,0001	0,4465	0,1484
Baseline to Peak % SARC	0,1771	0,7042	0,9273
Baseline to Peak % FURA	0,4925	0,2114	0,617
Dep v SARC	0,1325	0,4766	0,9638
Dep v FURA	0,3978	0,8442	0,3551
Dep v t SARC	<0,0001	0,4904	0,1326
Dep v t FURA	0,0039	0,4943	0,8924
Peak SARC	<0,0001	0,1452	0,0027
Peak FURA	<0,0001	0,619	0,2145
Peak h SARC	0,2137	0,6689	0,9565
Peak h FURA	0,0407	0,5127	0,5554
Ret v SARC	0,0916	0,2739	0,9157
Ret v FURA	<0,0001	0,3926	0,8351
Ret v t SARC	0,0002	0,2268	0,9859
Ret v t FURA	0,032	0,8392	0,4796
Time-to-peak 50% SARC	0,5435	0,6906	0,588
Time-to-peak 50% FURA	0,0002	0,6903	0,8472
Time-to-baseline 90% SARC	<0,0001	0,0745	0,1443
Time-to-baseline 90% FURA	<0,0001	0,4497	0,6617

**Tabelle 3: Mixed-effect Analyse (p-Werte)**

<u>Nicht-korrigierter Fisher's LSD-Test</u>	<u>1 Hz</u>	<u>2 Hz</u>	<u>3 Hz</u>	<u>4 Hz</u>
<u>p-Werte</u>				
<u>Nampt<sup>+/+</sup> vs. Nampt<sup>+/-</sup></u>				
Baseline Sarc	0,2858	0,1461	0,1125	<b>0,0447</b>
Baseline Fura	0,6212	0,5126	0,4125	0,2824
Baseline to Peak % SARC	0,5625	0,5611	0,6827	0,8594
Baseline to Peak % FURA	0,0726	0,1837	0,2469	0,3386
Dep v SARC	0,2817	0,3468	0,54	0,8682
Dep v FURA	0,3323	0,8334	0,7264	0,9198
Dep v t SARC	0,838	0,8114	0,0786	0,4636
Dep v t FURA	0,4779	0,7739	0,3914	0,7199
Peak SARC	0,4351	0,2472	0,1566	<b>0,0377</b>
Peak FURA	0,9971	0,7039	0,596	0,5014
Peak h SARC	0,5517	0,5333	0,6657	0,9363
Peak h FURA	0,1576	0,4337	0,6065	0,789
Ret v SARC	0,228	0,223	0,2065	0,4544
Ret v FURA	0,056	0,156	0,5821	0,6922
Ret v t SARC	0,632	0,2932	<b>0,0273</b>	<b>0,0091</b>
Ret v t FURA	0,9636	0,2903	0,7402	0,4746
Time-to-peak 50% SARC	0,5288	0,316	0,9242	0,9185
Time-to-peak 50% FURA	0,9578	0,8816	0,6549	0,623
Time-to-baseline 90% SARC	0,0883	0,0711	<b>0,0418</b>	<b>0,0092</b>
Time-to-baseline 90% FURA	0,4571	0,4849	0,098	0,6189

## Lösungen zur Isolation von Mauskardiomyozyten

**Tabelle 4: Perfusionslösung, pH =7,4 (bei Raumtemperatur)**

Substanz	Hersteller	Katalognummer	Mol. Gewicht [g/mol]	Finale Konzentration [mM]	Menge für 1 L [g]
NaCl	Roth	3957.1	58,44	135	7,8894
KCl	Roth	P017.1	74,56	4,7	0,3504
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Roth	P018.1	136,09	0,6	0,0817
HNa <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> dibasic	Sigma-Aldrich	S0876	141,96	0,6	0,0852
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	Roth	P037.1	246,48	1,2	0,2958
HEPES	Roth	6763.1	238,31	10	2,3831
Taurin	Sigma-Aldrich	T0625	125,15	30	3,7545

**Tabelle 5: Perfusionspuffer**

Substanz	Hersteller	Katalognummer	Mol. Gewicht [g/mol]	Finale Konzentration [mM]	Menge
Perfusionslösung (Siehe Tabelle 5 für die Zusammensetzung)					333 ml
2,3-Butanedione monoxime	Sigma-Aldrich	B0753	101,1	10	0,337 g
Glukose	Merck	50-99-7	180,16	10	0,6 g

**Tabelle 6: Kanülierungslösung**

Reagens	Hersteller	Katalognummer	Gegebene Konzentration	Finale Konzentration	Menge
Perfusionslösung (Siehe Tabelle 5 für die Zusammensetzung)					150 ml
CaCl <sub>2</sub>	Fluka	21115	1 M	1 mM	150 µl

**Tabelle 7: Myozytenverdauungslösung**

Reagens	Hersteller	Katalognummer	Gegebene Konzentration	Finale Konzentration	Menge
Perfusionslösung (Siehe Tabelle 5 für die Zusammensetzung)					20 ml
Liberase <sup>TM</sup> Research Grade	Roche	05401127001	5 mg/ml		300 µl
Trypsin 10x	GIBCO	15090-046	2,5%		111 µl
CaCl <sub>2</sub>	Fluka	21115	10 mM	12,5 µM	25 µl

**Tabelle 8: Myozyten Stopplösung 1**

Reagens	Hersteller	Katalognummer	Gegebene Konzentration	Finale Konzentration	Menge
Perfusionslösung (Siehe Tabelle 5 für die Zusammensetzung)					2,25 ml
Bovine Calf Serum (BCS)	Sigma	12133C-500ML			0,25 ml
CaCl <sub>2</sub>	Fluka	21115	10 mM	12,5 µM	3,125 µl

**Tabelle 9: Myozyten Stopplösung 2**

Reagens	Hersteller	Katalognummer	Gegebene Konzentration	Finale Konzentration	Menge
Perfusionslösung (Siehe Tabelle 5 für die Zusammensetzung)					19 ml
Bovine Calf Serum (BCS)	Sigma	12133C-500ML			1 ml
CaCl <sub>2</sub>	Fluka	21115	10 mM	12,5 µM	25 µl

**Tabelle 10: Kalziumreihe**

Nr.	Myozyten Stopplösung 2 [ml]	CaCl <sub>2</sub> Konzentration [mM]	Menge 1/10 CaCl <sub>2</sub> [µl]
1	8	0,125	10
2	4	0,25	10
3	8	0,5	40

**Tabelle 11: Tyrode-Lösung**

Substanz	Hersteller	Katalognummer	Mol. Gewicht [g/mol]	Finale Konzentration [mM]	Menge für 1 L [g]
NaCl	Roth	3957.1	58,44	140	8,1816
KCl	Roth	P017.1	74,56	4	0,2982
MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	Roth	HN03.2	203,3	1	0,2033
HEPES	Roth	6763.1	238,31	10	2,3831
CaCl <sub>2</sub>	Fluka	21115	1 M	1	1 ml
Glukose	Merck	50-99-7	180,16	5	0,9007