

Aus dem Herzzentrum der Universität zu Köln  
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. S. Baldus

# **Die Bedeutung von Myeloperoxidase für die funktionelle Kapazität im Modell der dilatativen Kardiomyopathie**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Karen Gerke  
aus Münster

promoviert am 05. November 2024

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln  
Druckjahr 2024

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink  
1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. S. Baldus  
2. Gutachter: Privatdozent Dr. rer. nat. R. Stehle

## Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.<sup>1</sup>

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Frau Anna Klinke und Herr Simon Geißen

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Frau Anna Klinke oder Herr Simon Geißen von mir selbst ausgeführt und ausgewertet worden. Lediglich die Auswertung der Echokardiographien wurde durch Herrn Simon Geißen durchgeführt.

## Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 04.07.2024

Unterschrift:



## Danksagung

Ich bedanke mich bei allen Personen, die mich auf dem Weg zu dieser Promotion begleitet haben. Ich hatte eine wunderbare Zeit in- und außerhalb des Labors und schaue auf viele schöne Erinnerungen zurück.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Baldus, meinem Doktorvater für die Betreuung dieser Arbeit, für die inspirierenden Gespräche und den immer offenen und ehrlichen Austausch.

Insbesondere bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Klinke. Du hast das Interesse an dem Thema dieser Arbeit und die Begeisterung für das experimentelle Arbeiten in mir geweckt und auch aus der Entfernung nie aufgehört mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Herrn Dr. Adam, Herrn Dr. Mollenhauer, Simon Geißen und allen Mitarbeitern der AG Baldus, mit denen ich eine lehrreiche aber auch immer lustige Zeit hatte.

Mein abschließender Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden. Ihr habt mich über die gesamte Zeit, die diese Arbeit umfasst hat, begleitet und auf vielfältigste Art und Weise unterstützt.

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>7</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>9</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>10</b>
2.1 Dilatative Kardiomyopathie	10
2.1.1. Pathophysiologie	12
2.1.2. Klinik	14
2.1.3. Therapie	15
2.1.4. Die Bedeutung der Inflammation für die DCM	17
2.2 Myeloperoxidase	19
2.2.1. Vorkommen und Struktur	19
2.2.2. Pathogenabwehr und katalytische Aktivität	19
2.2.3. Reduktion der NO-Bioverfügbarkeit und der Einfluss auf das Endothel	22
2.2.4. MPO und kardiovaskuläre Erkrankungen	23
2.2.5. Hereditäre DCM im Tiermodell	25
2.3 Belastungstraining	28
2.3.1. Grundlage der reduzierten Belastungsfähigkeit von DCM-Patienten und der Effekte von regelmäßigem Ausdauertraining.	28
2.3.2. Der Einfluss von Belastungstraining auf den inflammatorischen Status	33
2.4 Fragestellungen und Ziel der Arbeit	36
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>37</b>
3.1 Material	37
3.1.1. Reagenzien und Arzneistoffe	37
3.1.2. Puffer und Lösungen	37
3.1.3. Antikörper	38
3.1.4. Reaktionskits	38
3.2 Methoden	38
3.2.1. Arbeiten und Umgang mit Versuchstieren	38
3.2.2. Laufband	39
3.2.3. Echokardiographie	40
3.2.4. Organentnahme und Bestimmung der peripheren MPO-Konzentration	40

3.2.5.	Bestimmung der MPO-Plasmakonzentration	41
3.2.6.	Bestimmung der peripheren MPO-Konzentration	41
3.2.7.	CD31 Färbung der M. soleus Querschnitte	42
3.2.8.	Arbeiten mit RNA	43
3.2.9.	Statistik	44
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>45</b>
4.1	Laufbandbelastungstests	45
4.1.1.	Auswirkungen des Mlp-Knockouts und der MPO-Defizienz auf die Belastungsfähigkeit	45
4.1.2.	Die Entwicklung der Belastungsfähigkeit durch vierwöchiges Training	46
4.1.3.	Der Einfluss des Trainings auf die Belastungsfähigkeit	49
4.1.4.	Überprüfung der Methodik durch Verkürzung der Erschöpfungszone	50
4.2	Echokardiographie	51
4.2.1.	Bedeutung des Mlp-KO und der MPO-Defizienz für die kardiale Funktion	51
4.2.2.	Entwicklung der kardialen Funktion zwischen der 11. und 15. Lebenswoche ohne Training	53
4.2.3.	Entwicklung der kardialen Funktion während der vierwöchigen Trainingsperiode	54
4.3	Die Auswirkung von Belastungstraining auf die Konzentration der Myeloperoxidase	58
4.4	Anpassung der Skelettmuskulatur an das Belastungstraining – Neoangiogenese	60
4.5	Charakterisierung der Expression mitochondrialer Marker in der Skelettmuskulatur und der Einfluss von Belastungstraining	62
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>63</b>
5.1	Bedeutung des Mlp-KO für die kardiale Funktion und Anpassung durch MPO-Defizienz	64
5.2	Auswirkung des Mlp-KO auf die Belastungsfähigkeit	64
5.3	Einfluss von Belastungstraining auf die funktionelle Kapazität	66
5.4	Einfluss von Belastungstraining auf die kardiale Funktion	68
5.5	Die Verteilung der Myeloperoxidase im Gewebe	70
5.6	MLP-Phänotyp der Skelettmuskulatur und Einfluss von Training auf die Neoangiogenese	72

<b>5.7</b>	<b>Bedeutung von Belastungstraining und von MPO für die Mitochondrien</b>	<b>75</b>
<b>5.8</b>	<b>Ausblick für die Zukunft</b>	<b>77</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>79</b>
<b>7.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>88</b>
<b>7.1</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>88</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
ADH	Vasopressin
ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
AEC	3-Amino-9-Ethyl-Carbazol
AICM	Antracyclin induzierten Kardiomyopathie
ARNI	Angiotensin-Rezeptor-Nepriylsin Inhibitor
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
COX4i	Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 4i
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DDAH	Dimethylamino-Dimethylargininhydrolase
EF	Ejektionsfraktion
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
GAG	Heparansulfat-Glykosaminoglykan
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HF	Herzfrequenz
HFrEF	Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion
HI	Herzinsuffizienz
HIF-1 $\alpha$	Hypoxia-inducible factor-1alpha
HOCl	Hypochlorige Säure
HOSCN	Hypothiocyansäure
HZV	Herzzeitvolumen
IL-1	Interleukin-1
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
KHK	Koronaren Herzkrankheit
LDL	Low-density Lipoprotein
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MLP	Muscle Lim Protein
MMP	Matrixmetalloproteinase
MPO	Myeloperoxidase
NO	Stickstoffmonoxid

NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrit
NO <sub>2</sub> -Tyr	Nitrotyrosin
NYHA	New York Heart Association
O <sub>2</sub>	molekularer Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxid-Anionen
PAI-1	Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ-1
q-PCR	Real Time Quantitative PCR
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron System
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SDHA	Succinat-Dehydrogenase-Komplex-Flavoprotein-Untereinheit A
sGC	Lösliche Guanylatzyklase
SV	Schlagvolumen
TGF-β	Transforming-growth-factor-β
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
UQCRC1	Ubichinol-Cytochrom-c-Reduktase-Kernprotein 1
V(O <sub>2</sub> )max	Maximale Sauerstoffkapazität
VEGF	Vascular endothelial growth factor

# 1. Zusammenfassung

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist die häufigste Form der Kardiomyopathien, bei der die Kontraktionsfähigkeit des Myokards eingeschränkt ist und eine systolische Auswurfsschwäche vorliegt. Die daraus folgende reduzierte Ejektionsfraktion löst neurohumorale Kompensationsmechanismen und ein maladaptives kardiales Remodeling aus. Dies führt letztendlich zu einer Herzinsuffizienz (HI), wobei die DCM die häufigste Ursache und Indikation für Herztransplantationen weltweit darstellt.

Die von der Herztransplantation einmal abgesehen derzeit einzige Therapie der DCM ist die Behandlung der Herzinsuffizienz. Doch trotz verbesserter medikamentöser Therapie leiden viele der verhältnismäßig jungen Patienten unter den Folgen der verschlechterten Herzfunktion wie Dyspnoe, Müdigkeit, verminderte körperliche Leistungsfähigkeit und somit einer deutlichen Einschränkung der Lebensqualität.

Die deutsche Gesellschaft für Kardiologie hat innerhalb des Projektes „Klug entscheiden in der Kardiologie“ fünf Positiv-Empfehlungen zu verschiedenen Herzerkrankungen verfasst. Eine dieser fünf Empfehlungen besagt, dass Patienten mit einer stabilen HI ein regelmäßiges Belastungstraining durchführen sollen, um damit ihre körperliche Leistungsfähigkeit und Lebensqualität zu verbessern sowie kardiale Symptome zu verringern. Doch obwohl Training dringend empfohlen wird, ist die Umsetzung und Compliance der Patienten schwach und die Optionen zu medizinisch angeleitet und begleitetem Training sind gering. Weitere Forschung um eine Evidenz-basierte Argumentation zu ermöglichen ist daher unabdingbar.

Zahlreiche Untersuchungen zum Pathomechanismus der Herzinsuffizienz legen nahe, dass Inflammationsprozesse eine maßgebliche kausale Rolle für das maladaptive myokardiale Remodeling bei der DCM spielen. Das leukozytäre Enzym Myeloperoxidase (MPO) zeigt neben seinen bakteriziden Eigenschaften eine zentrale Rolle bei der Initiierung und dem Fortschreiten von akuten und chronischen vaskulär-entzündlichen Erkrankungen. Im Mausmodell wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt, dass Mäuse mit einer durch den Knockout des Muscle Lim Protein (MLP) verursachten DCM und zusätzlicher MPO-Defizienz eine verbesserte funktionelle Herzfunktion haben, als MPO-kompetente Mäuse.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Mlp-KO-Tiere als murines Modell der DCM nicht nur eine deutlich eingeschränkte kardiale Funktion aufweisen, sondern auch in ihrer Belastungsfähigkeit gemessen im Laufbandbelastungstest eingeschränkt sind. Bei fehlender Korrelation zwischen in Ruhe gemessener systolischer Funktion und der Belastungsfähigkeit, fokussiert sich die aktuelle Forschung, wie auch die Untersuchungen dieser Arbeit auf extrakardiale Anpassungsprozesse durch das Training. Die Ergebnisse der Untersuchung des peripheren Gefäßsystems und der Skelettmuskulatur der Tiere zeigten eine signifikant erhöhte Konzentration von peripher abgelagertem MPO bei den Mlp-KO-Tieren, sowie Hinweise auf

~~einen gestörten Energiemetabolismus und einen erhöhten inflammatorischen Status der Muskulatur. Nach Abschluss eines vierwöchigen Laufbandbelastungstrainings konnten Zeichen der Neoangiogenese und der Reduktion der Inflammation nachgewiesen werden. Dies ging einher mit einer Reduktion der peripher abgelagerten MPO Menge. Ein Zusammenhang zwischen diesen Feststellungen wäre mechanistisch denkbar, da die Abwesenheit von MPO unter anderem zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit vasodilatatorisch wirksamer Moleküle führt. Diese wiederum hat positive Anpassungsprozesse wie eine Verbesserung der bestehenden endothelialen Dysfunktion und die Reduktion des peripheren vaskulären Widerstandes zur Folge.~~

~~Diese Daten unterstreichen die Notwendigkeit, die mechanistische Grundlage der vielfach nachgewiesenen positiven Effekte von regelmäßigem Belastungstraining von DCM-Patienten besonders in Bezug auf anti-inflammatorische Anpassungsprozesse in der Skelettmuskulatur weiter zu untersuchen. MPO konnte im Rahmen dieser Arbeit als möglicher Mediator in diesen Prozessen identifiziert werden.~~

## **2. Einleitung**

### **2.1 Dilatative Kardiomyopathie**

Die dilatative Kardiomyopathie ist eine strukturelle Herzerkrankung, welche mit der Erweiterung des linken Ventrikels und einer verminderten Auswurfleistung des Herzens einhergeht. Im Laufe der Zeit wurde die Klassifikation der Kardiomyopathien immer wieder neu definiert. Erste Veröffentlichungen 1980 berücksichtigten lediglich morphologische Aspekte der damals als Herzmuskelerkrankung mit unbekannter Ursache definierten Erkrankung und so gab es nur die Unterteilung in dilatative, hypertrophe und restriktive Kardiomyopathie, welche von anderen Herzmuskelerkrankungen mit bekannter Ursache abgegrenzt wurden<sup>1</sup>.

Mit voranschreitendem Wissensstand vor allem in den Bereichen Pathophysiologie und Ätiologie veröffentlichte die WHO/ISFC 1995 eine neue Definition und Klassifikation der Kardiomyopathien, die bemerkenswerteste Veränderung war die Auflösung der Unterteilung in Herzmuskelerkrankung bekannter und unbekannter Ursache. Im Falle der DCM bedeutete dies unter anderem die Anerkennung genetischer, autoimmuner und viraler Ätiologien<sup>2</sup>.

Eine aktuelle Definition der Erkrankung stammt von der European Society of Cardiology und bezeichnet die DCM als klinische Diagnose, charakterisiert durch Dilatation und eingeschränkte Kontraktion des linken, oder beider Ventrikel, die nicht durch weitere Erkrankungen wie eine Koronare Herzkrankheit zu erklären sind<sup>3</sup>.

Die Beurteilung der Prävalenz der Erkrankung bringt einige Schwierigkeiten mit sich, vor allem die häufige Änderung der Begriffsdefinition sowie scheinbar große ethnische Unterschiede erschweren die Darstellung genauer Zahlen. Eine Studie in Minnesota, USA ermittelte eine

Prävalenz der idiopathischen DCM von 36,5 pro 100 000 Einwohner und Einwohnerinnen\*, etwa zur gleichen Zeit wurden Daten in zwei Regionen in England ausgewertet, welche eine Prävalenz von 8,3 pro 100 000 Einwohner bestimmte, weitere epidemiologische Daten aus Japan ergaben einen Wert von 14 pro 100 000 Einwohner<sup>4,5,6</sup>. Die Bedeutung der Erkrankung trotz dieser uneindeutigen Zahlen wird bei Betrachtung der Folgen der Erkrankung klar. Die DCM ist die häufigste Ursache für Herztransplantationen weltweit<sup>7</sup>.

Die klinische Manifestation der Erkrankung tritt häufig zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr auf, aber auch deutlich frühere Erstdiagnosen, vor allem bei familiärem Auftreten sind nicht ungewöhnlich<sup>7</sup>.

Es sind verschiedenste Ätiologien der Erkrankung bekannt, grundsätzlich kann in erworbene und genetische Ursachen unterteilt werden, wobei dies nicht bedeutet, dass sich beides gegenseitig ausschließt. Erworbene Ursachen umfassen Drogen, vor allem Alkohol, Medikamente und besonders der Begriff der inflammatorischen dilatativen Kardiomyopathie gewinnt zunehmend an Bedeutung<sup>8</sup>. Virale Infektion, autoimmune Erkrankungen wie Sarkoidose und andere Faktoren triggern eine inflammatorische Reaktion des Körpers, beginnend mit einer Kaskade an pro-inflammatorischen Zytokinen, gefolgt von einer Immunantwort die in einigen Fällen zu linksventrikulärer Dysfunktion und Dilatation führt<sup>9</sup>. So wird beispielsweise davon ausgegangen, dass bei 30-70% der Fälle von DCM, der Erkrankung eine virale Myokarditis voran gegangen ist<sup>10</sup>. Des Weiteren konnten bei mehr als der Hälfte der DCM-Patienten virale Bestandteile im Myokard nachgewiesen werden<sup>11</sup>. Die Häufigkeit einer genetischen Veränderung als Ursache der Erkrankung wird mit 20-37% angegeben, wobei bis heute mehr als 50 verschiedene involvierte Gene bekannt sind und bei über 38% der Patienten zwei oder mehr veränderte Genvarianten gemeinsam gefunden wurden<sup>12,13,14-16</sup>. Die in die Entwicklung einer DCM involvierten Gene können anhand der ausgelösten Dysfunktion in mehrere Untergruppen unterteilt werden. Die häufigste Veränderung betrifft das Sarkomer der Kardiomyozyten und somit die kleinste strukturelle Einheit der Herzmuskelzelle. Varianten des größten Proteins des Sarkomers, des Titins werden in 20-25% der familiär auftretenden Fälle der DCM gefunden und folgen hier einem autosomal dominanten Erbgang<sup>17</sup>. Weitere Untergruppen der genetischen Veränderungen betreffen das Zytoskelett der Kardiomyozyten, die für die intrazelluläre Adhäsion verantwortlichen Desmosomen oder die Lamina des Zellkerns der Herzmuskelzellen<sup>18</sup>. Kann weder eine erworbene Ursache, noch eine genetische Veränderung als Auslöser der Erkrankung identifiziert werden, spricht man von idiopathischer DCM.

Die vielen verschiedenen Ätiologie manifestieren sich alle in den charakteristischen phänotypischen Merkmalen der DCM die zu den beiden Hauptdiagnosekriterien führen:

---

\* Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit auf die gleichzeitige Verwendung geschlechtsspezifischer Sprachformen verzichtet. Sämtliche Personenbezeichnungen gelten gleichwohl für alle Geschlechter.

Linksventrikuläre Dysfunktion, dargestellt durch eine verminderte Ejektionsfraktion unter 45% und linksventrikuläre Dilatation, definiert als vergrößerter enddiastolischer Durchmesser auf über 112%, des auf Alter und Körperoberfläche abgestimmten Normwertes<sup>19</sup>. Wichtig ist der Ausschluss von Erkrankungen, die zu chronischer Druck- oder Volumenbelastung des Herzens führen wie die arterielle Hypertonie, Herzklappeninsuffizienz oder ischämische Erkrankungen des Herzens. Goldstandard der Diagnostik ist die Echokardiographie.

### **2.1.1. Pathophysiologie**

Abhängig von der Ätiologie der DCM kommt es aus unterschiedlichen Gründen zu einer verminderten Kontraktionsfähigkeit der Kardiomyozyten, was häufig die initiale pathophysiologische Ursache der Erkrankung ist. Die verminderte Auswurfleistung des Herzens führt zu hämodynamischen Veränderungen wie ein reduzierter systemischer arterieller Druck, reduzierter renaler Blutfluss, Abnahme der Aktivierung von Barorezeptoren im linken Ventrikel, Sinus caroticus und Aortenbogen.

Durch die verminderte Aktivierung der Barorezeptoren werden kardioregulatorische Zentren des zentralen Nervensystems aktiviert, was eine systemische Vasokonstriktion zur Folge hat. Des Weiteren führt es zur Ausschüttung des antidiuretischen Hormons Vasopressin (ADH). In der Niere bewirkt Vasopressin die verminderte Ausscheidung von Wasser über den Urin. Zusammen führen diese Mechanismen zu einem Anstieg des Blutdruckes.

Pathophysiologisch von Bedeutung ist außerdem das Renin-Angiotensin-Aldosteron System (RAAS) welches durch die zuvor bereits erwähnte Minderdurchblutung der Niere aktiviert wird. Das Enzym Renin wird im juxtaglomerulären Apparat der Niere vermehrt ausgeschüttet und katalysiert die Umwandlung von Angiotensinogen in Angiotensin 1. Durch die Spaltung von Angiotensin 1, katalysiert durch das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE), entsteht Angiotensin 2, ein Peptidhormon welches durch Bindung an den Angiotensin-Rezeptor-1 die Vasokonstriktion des Gefäßsystems noch verstärkt. Angiotensin 2 bewirkt außerdem die Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde, ein Kortikosteroid welches die Rückresorption von Natrium und Wasser in der Niere fördert und somit das Blutvolumen und folglich den Blutdruck anhebt.

Diese, initial das verminderte Schlagvolumen kompensierenden Mechanismen begünstigen langfristig, durch eine dauerhafte Druck- und Volumenbelastung des linken Ventrikels die Progression der Herzinsuffizienz.

Den hämodynamischen Veränderungen folgen strukturelle Veränderungen des Myokards die als maladaptives kardiales Remodeling bezeichnet werden. Ursächlich sind, neben der die DCM auslösenden Ätiologie (z.B. Viren/Toxine), die chronische Volumenbelastung des Herzens sowie eine Ischämie des Myokards durch mikrovaskuläre Dysfunktion, dauerhafte neurohumorale Aktivierung, sowie Zytokine. Dem Remodeling unterliegende molekulare

Mechanismen bestehend aus einem hochkomplexen Netzwerk zellulärer Signalkaskaden, die bis heute unvollständig verstanden sind. Zunächst finden strukturelle Veränderungen der Kardiomyozyten selbst statt, die Zellen werden zunehmend hypertroph.

Die Zellen umgebend befindet sich die extrazelluläre Matrix, diese besteht zu einem Großteil aus von Fibroblasten sezerniertem Kollagen Typ 1 und 3. Bei vielen kardialen Erkrankungen und so auch bei der DCM findet sich eine Vermehrung des Anteils an kardialem Interstitium im Vergleich zu dem Anteil an Zellen unter anderem durch zunehmende Ödembildung, Ablagerung von Kollagen und weiterer Protein-Ansammlung. Die Ablagerung besonders von Kollagen Typ 1 fördert die fortschreitende Fibrosierung des Myokards. Die erhöhte Expression von Kollagen geht einher mit der Proliferation von Fibroblasten zu Myofibroblasten. Ein bekannter Mechanismus der Fibrosierung ist die Stimulation der Kollagen 1 und 3 Produktion durch den Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ , welcher wiederum durch das im RAAS System aktivierte Angiotensin 2 stimuliert wird<sup>20</sup>.

Die zunehmende Fibrosierung resultiert in einer Versteifung des Herzens, was zum einen die Relaxation des Myokards stört und zum anderen die Reizweiterleitung zwischen den Kardiomyozyten beeinträchtigt. Nachdem alle Kompensationsmechanismen des kardiovaskulären Systems ausgeschöpft sind, führen die genannten pathophysiologischen Prozesse zur Ausprägung des klinischen Bildes der Herzinsuffizienz.

Im Rahmen dieses Krankheitsbildes spielt der Begriff der endothelialen Dysfunktion eine entscheidende Rolle, anschaulich zu sehen an der Korrelation mit der Morbidität und Mortalität. Die endotheliale Dysfunktion ist charakterisiert durch ein Ungleichgewicht zwischen endothelial vermittelten vasodilatatorischen und vasokonstriktiven Stimuli. Entscheidend in diesem Ungleichgewicht ist die Verringerung der Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO), einem Signaltransduktor mit sehr kurzer Halbwertszeit, welcher in der Lage ist frei durch Zellmembranen zu diffundieren. Über die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (sGC) führt NO zur Relaxation von glatten Muskelzellen und hat so eine enorm vasodilatierende Wirkung. Gebildet wird NO im vaskulären System von der endothelialen NO-Synthase (eNOS), dabei wird unter Verbrauch von NADPH und O<sub>2</sub> aus dem Substrat L-Arginin L-Citrullin und NO gebildet<sup>21</sup>. Der Zusammenhang zwischen NO und der Herzinsuffizienz besteht in der verminderten Auswurfleistung des Herzens im Rahmen der Herzinsuffizienz, dies führt zu einer Reduktion des Blutflusses in der Peripherie, wodurch sich der Scherstress auf die Gefäße reduziert. Da die eNOS-Aktivität abhängig von diesem Scherstress ist, verringert sich bei Verminderung des Blutflusses auch die NO vermittelte Vasodilatation der Gefäße<sup>22</sup>. Ein weiterer Mechanismus über den die Bioverfügbarkeit von NO reduziert wird ist die vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). ROS sind aus molekularem Sauerstoff gebildete toxische Derivate mit einer hohen Reaktivität. Sie werden im vaskulären System unter anderem von der NAD(P)H-Oxidase und der Xanthinoxidase gebildet, beide Enzyme konnten bei Herzinsuffizienz mit

erhöhter Aktivität nachgewiesen werden<sup>23</sup>. Ein Beispiel für die Reaktivität der ROS ist das Superoxid-Anion, es reagiert sehr schnell mit NO unter Bildung von Peroxynitrit. Neben der erhöhten Produktion von ROS ist auch deren Abbau bei der Herzinsuffizienz eingeschränkt. Es konnte bei HI-Patienten eine verminderte Aktivität der Superoxid-Dismutase, welche für den Abbau des Superoxid-Anions verantwortlich ist, festgestellt werden<sup>23</sup>. Da die reaktiven Sauerstoffspezies zu verstärktem oxidativem Stress und somit zu verstärkter Inflammation des Gewebes beitragen, wird den genannten Prozessen in dieser Arbeit eine enorme Bedeutung zukommen und es wird in folgenden Kapiteln noch verstärkt darauf eingegangen werden.

Die Auswirkungen der reduzierten Bioverfügbarkeit von NO auf die Herzinsuffizienz sind vielfältig. Die verminderte Vasodilatation führt zunächst zu koronarer sowie systemischer Minderperfusion des Gewebes. Dies wird noch verstärkt, da die Engstellung der peripheren Gefäße eine Nachlasterrhöhung des Herzens bedeutet, was die Auswurfleistung weiter reduziert.

### **2.1.2. Klinik**

Die klinische Ausprägung der DCM ist beinahe unabhängig von deren Ätiologie und präsentiert sich im fortgeschrittenen Stadium als Herzinsuffizienz, wobei die DCM die dritthäufigste Ursache für chronische Herzinsuffizienz weltweit ist<sup>7</sup>. Symptome sind auf das Vorwärts- und Rückwärtsversagen des Herzens zurückzuführen und umfassen Dyspnoe, Schwellung der Beine, Müdigkeit, Leistungsminderung und Brustschmerzen. Außerdem können Komplikationen wie Herzrhythmusstörungen und Zeichen der Dekompensation bis hin zum kardiogenen Schock auftreten.

Die Herzinsuffizienz wird nach der New York Heart Association Klassifikation in vier Stadien eingeteilt. Ursprünglich von der New York Heart Association bereits 1928 veröffentlicht, ist diese Klassifikation auch im deutschsprachigen Raum in den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie zu finden. Hervorzuheben im Kontext dieser Arbeit ist, dass die Einteilung durch Ermittlung der Belastungsfähigkeit der Patienten erfolgt, was die Bedeutung von regelmäßigem Ausdauertraining für die Entwicklung der Erkrankung bereits in der Basisdiagnostik unterstreicht. Die Stadien werden wie folgt definiert:

Stadium I: Herzerkrankung ohne körperliche Limitation. Alltägliche körperliche Belastung verursacht keine inadäquate Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris.

Stadium II: Herzerkrankung mit leichter Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe. Alltägliche körperliche Belastung verursacht Erschöpfung, Luftnot oder Angina pectoris.

Stadium III: Herzerkrankung mit höhergradiger Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit bei gewohnter Tätigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe. Geringe körperliche Belastung verursacht Erschöpfung, Luftnot oder Angina pectoris.

Stadium IV: Herzerkrankung mit Beschwerden bei allen körperlichen Aktivitäten und in Ruhe, Bettlägerigkeit.

Interessant ist außerdem die Betrachtung der Lebensqualität von Patienten mit Herzinsuffizienz. Die Lebensqualität spiegelt die klinische Ausprägung einer Erkrankung sowie deren Therapieoptionen in einer außergewöhnlich multidimensionalen Weise wider, außerdem ist eine niedrige Lebensqualität assoziiert mit erhöhter Hospitalisierungs- und Mortalitätsrate<sup>24</sup>.

Ein progressiver Verlauf der Erkrankung ist charakteristisch, frühere Studien gaben an, dass 50% der Patienten innerhalb von fünf Jahren nach Diagnosestellung ohne Herztransplantation versterben, davon die Hälfte an plötzlichem Herztod und die andere Hälfte an Pumpversagen<sup>25</sup>. Längeres Überleben konnte in den letzten Jahren durch verbesserte Therapiemöglichkeiten der Herzinsuffizienz erreicht werden. So konnten neuere Studien ein Überleben von 80% der Patienten ohne Herztransplantation nach achtjährigem Follow-up nachweisen<sup>26</sup>.

### **2.1.3. Therapie**

Die medikamentöse Therapie der DCM entspricht mit wenigen Ausnahmen der Therapie der Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion (HFrEF), wobei zwischen prognose- und symptomverbessernden Medikamenten unterschieden wird. Eine Studie von Merlo et al. untersuchte den Erfolg der Therapie der idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie im Verlauf der letzten 30 Jahre und konnte bemerkenswerte Erfolge, gerade in Bezug auf die prognoseverbessernden Medikamentengruppen der ACE-Inhibitoren (beziehungsweise alternativ die Angiotensin-Rezeptor-Blocker) und Betablocker darstellen. Patienten wurden retrospektiv in drei Gruppen eingeteilt. Gruppe 1 bezieht sich auf den Diagnosezeitpunkt zwischen 1978 bis 1987, Gruppe 2 auf die Jahre von 1988 bis 1997 und Gruppe 3 auf 1998 bis 2007. ACE-Inhibitoren/Angiotensin-Rezeptor-Blocker wurden bei 34%, 93% und 93% der Patienten verteilt auf Gruppe 1, 2 und 3 verschrieben. Bei Betablockern lag die Verteilung bezogen auf die genannten Gruppen bei 11%, 82% und 86%. Das Überleben nach 8-jährigem Follow-up ohne Herztransplantation zeigt mit den Ergebnissen von 55%, 71% und 87% für Gruppe 1, 2 bzw. 3 die enormen Auswirkungen der verbesserten medikamentösen Therapie<sup>26</sup>.

Die genannten Medikamente modulieren das unter Abschnitt 2.1.1. beschriebene veränderte Renin-Angiotensin-Aldosteron System und das Sympathische-Nervensystem. Außerdem zu nennen ist der in der ESC-Leitlinie von 2021 als Ersatz für ACE-Inhibitoren aufgeführte Wirkstoff der Angiotensin-Rezeptor-Nepriylsin Inhibitoren (ARNI), denn er wird nicht nur als Ersatz, sondern eventuell sogar als Mittel der Ersten Wahl genannt. ARNIs sind eine Fixkombination aus einem das RAAS beeinflussenden Angiotensin-Rezeptor-Blocker und einem Nepriylsin-Inhibitor. Nepriylsin ist ein Enzym, das vasoaktive Peptide wie ANP und BNP abbaut, diese Peptide haben eine vasodilatierende Wirkung und fördern die Natriurese und Diurese in der

Niere. Hemmung von Neprilysin verstärkt also diese Effekte, außerdem werden maladaptive kardiale Umbauvorgänge gehemmt<sup>27</sup>.

Studien zufolge senkt der Wirkstoff Sacubitril/Valsartan die Mortalität von Patienten mit einer LVEF unter 40% im Vergleich zur Therapie mit ACE-Inhibitoren signifikant. Außerdem verbesserten sich Symptome und die Lebensqualität der Patienten<sup>27</sup>. Derzeit empfohlen wird die Umstellung der ACE-Inhibitor Therapie von ambulanten Patienten mit HFrEF auf den Wirkstoff Sacubitril/Valsartan, bei Patienten mit unzureichender Symptomkontrolle trotz optimaler Therapie.

Weitere, ebenfalls prognoseverbessernde Mittel der ersten Wahl, welche in Kombination mit ACE-Inhibitoren und Betablockern eingesetzt werden sollten, sind Mineralkortikoidrezeptor-Antagonisten und SGLT-2 Inhibitoren. SGLT-2 Inhibitoren gehören zu der Gruppe der Antidiabetika, sie hemmen insulinunabhängig den renalen Glukosetransporter SGLT-2 im proximalen Tubulus und konnten nachgewiesenermaßen die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten der primären Endpunkte Hospitalisierungsrate und Tod senken<sup>28</sup>.

In der Gruppe der symptomverbessernden Medikamente gilt es insbesondere die Diuretika zu nennen. Es ist keine Morbiditäts- oder Mortalitätsverbessernde Wirkung nachgewiesen und Ziel der Therapie sollte die Einnahme der geringsten möglichen Dosis sein, um eine Euvolämie zu halten<sup>29</sup>.

Interessant ist die Möglichkeit der zielgerichteten medikamentösen Therapie der DCM bei einigen bekannten Ätiologien. Eine der Empfehlungen der ESC beschreibt in diesem Zusammenhang konkret, dass nach Diagnose von nicht infektiöser inflammatorischer DCM eine immunmodulatorische und/oder immunsuppressive Therapie in Betracht gezogen werden sollte<sup>30</sup>. Bei Patienten mit nicht infektiöser Myokarditis und Herzinsuffizienz konnte nach immunsuppressiver Therapie eine signifikante Verbesserung der linksventrikulären Ejektionsfraktion sowie des enddiastolischen Volumens nachgewiesen werden<sup>31</sup>. Zugrundeliegende Mechanismen dieser bemerkenswerten Feststellung bedürfen definitiv weiterer Abklärung.

Trotz enormer Fortschritte, die in den letzten Jahren in der Diagnostik und besonders in der medikamentösen Therapie der DCM eingetreten sind, wird die 5-Jahres-Mortalität der Erkrankung mit 15-25% angegeben<sup>32</sup>. Es gilt außerdem zu unterstreichen, dass DCM-Patienten sich deutlich von anderen Patienten mit Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion unterscheiden. Sie sind im Durchschnitt jünger und weisen so häufig auch weniger Komorbiditäten auf. Trotzdem erhalten sie genau dieselbe medikamentöse Therapie und das, wegen des früheren Erstdiagnosezeitpunktes über einen noch längeren Zeitraum hinweg. Diese Tatsache hebt die Notwendigkeit hervor, eine zielgerichtetere Therapie der Erkrankung zu etablieren, welche nicht nur das symptomatische Endstadium der DCM behandelt, sondern in die Entwicklung der Erkrankung einzugreifen vermag. Eine Möglichkeit hierfür könnte regelmäßiges Ausdauertraining der Patienten sein. Die positiven Effekte sind vielfach nachgewiesen,

zugrundeliegende Mechanismen, insbesondere im Zusammenhang mit inflammatorischen Prozessen benötigen weiterer grundlagenwissenschaftlicher Abklärung.

#### **2.1.4. Die Bedeutung der Inflammation für die DCM**

Inflammation ist ein wichtiger Aspekt in der Pathophysiologie vieler kardiovaskulärer Erkrankungen, wobei die klassische Rolle der Entzündung in der Reaktion auf Schädigung der Zellen oder des Gewebes liegt. Kontrollierte, lokale Entzündungsreaktionen fördern die Heilung, überschießende oder fehlregulierte Entzündungsreaktionen können zu weiteren Schäden und Krankheitsprogress führen.

Der Rolle der Inflammation für die Pathophysiologie der dilatativen Kardiomyopathie wird immer mehr Bedeutung beigemessen, besonders der Zusammenhang zwischen Myokarditis und DCM steht häufig im Fokus. Die Myokarditis wird teilweise als Vorläufer der idiopathischen DCM diskutiert, wobei eine erste Phase der Infektion und primären Entzündungsreaktion, eine zweite Phase, geprägt von autoimmun vermittelter ventrikulärer Dysfunktion und die dritte Phase mit der Entwicklung zur DCM unterschieden wird<sup>33,34</sup>.

Außerdem untersucht wird die Kombination aus genetischer Disposition und zusätzlich erworbenem Auslöser. Grundlage der Diskussion ist, dass Studien zufolge bei einem von vier Patienten mit diagnostizierter DCM mehr als ein Auslöser für die DCM gefunden werden konnte. Bei 76% der DCM-Patienten konnten virale Bestandteile und bei 41% verstärkte Inflammation des Myokards nachgewiesen werden. Obwohl 90% der Menschen den untersuchten Viren im Laufe ihres Lebens ausgesetzt sind, entwickeln nur wenige von ihnen eine DCM<sup>35</sup>. Zusätzlich zu einer bereits bestehenden genetisch bedingten Kardiomyopathie könnten erworbene Auslöser wie Autoimmunerkrankungen, virale Infektionen oder Toxine, die den Entzündungsstatus des Myokards weiter verschlechtern also zur Entwicklung der DCM führen. Verbessertes Wissenstand über diese Zusammenhänge könnten Erkrankungen verhindern.

Pathophysiologisch betrachtet ist die dauerhafte Stimulation der Adrenozeptoren des Myokards, welche in erster Linie die eingeschränkte kardiale Funktion der Herzinsuffizienz durch Erhöhung der Herzfrequenz und Verstärkung der Inotropie kompensieren soll, ein grundlegendes Problem. Die dauerhafte Überbelastung des Myokards führt langfristig zu apoptotischem Zelltod und maladaptem Remodeling<sup>36</sup>. Außerdem zeigen in vivo Untersuchungen, dass eine Stimulation der  $\beta$ -Adrenozeptoren zu erhöhter Expression und Protein-Konzentration des Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Interleukin-6 (IL-6) im Myokard führt<sup>37</sup>. Über die  $\beta_2$ -Adrenozeptoren wird außerdem das RAAS-System vermehrt aktiviert, Folgen sind bereits genannte Prozesse wie periphere Vasokonstriktion und Antinatriurese, aber auch proinflammatorische Prozesse wie die Superoxid-Produktion und die lokal verstärkte Expression von TNF- $\alpha$ , IL-6 und TGF- $\beta$ <sup>38,39</sup>. Umgekehrt konnte klinisch nachgewiesen werden, dass die

Behandlung mit Betablockern die verstärkte Expression von TNF- $\alpha$  und IL-6 bei HI-Patienten hemmt<sup>40</sup>.

Die genannten pro-inflammatorischen Zytokine sind Proteine, welche als Botenstoffe dienen und bei Reaktionen des Immunsystems ausgeschüttet werden, unter anderem, um Abwehrzellen anzulocken und zu aktivieren. Diese pathophysiologisch eigentlich positiven Effekte scheinen im Rahmen der Herzinsuffizienz von negativen Auswirkungen begleitet zu sein. In vivo konnte gezeigt werden, dass intravenöse Injektion von rekombinanten humanen TNF- $\alpha$  zu reversibler linksventrikulärer systolischer und diastolischer Dysfunktion führt<sup>41</sup>. Pro-inflammatorische Zytokine verstärken nicht nur die Bildung von atherosklerotischen Plaques und die Progression der Plaqueinstabilität, dauerhafte Überexpression von TNF- $\alpha$ , Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-8 (IL-8) korrelieren auch mit der Progression der DCM<sup>42,43</sup>. Der IL-6-Plasmaspiegel konnte außerdem als unabhängiger Vorhersagewert für die kombinierten Endpunkte der Herzinsuffizienz: Tod, kardiale Dekompensation und Notwendigkeit einer Herztransplantation identifiziert werden<sup>44</sup>.

Unklar bleibt bislang die Art und Weise wie die pro-inflammatorische Zytokine ihren negativen Einfluss ausüben. Es wurden bereits direkte und indirekte Wege beschrieben, über die Zytokine den Metabolismus der Kardiomyozyten beeinflussen, ein direkter ist die Inhibition von Phospholamban, einem Schlüsselregulator der kardialen Kontraktilität, durch IL-1<sup>45</sup>. Außerdem gilt es die Induktion der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) durch IL-1 und TNF- $\alpha$  zu nennen<sup>46</sup>. Die iNOS ist, im Gegensatz zu der endothelialen NO-Synthase, eine nicht konstitutiv vorkommende Isoform des Enzyms, welche in Makrophagen und Mikrogliazellen induziert werden kann und dann in der Lage ist weit höhere NO-Konzentrationen zu generieren, welche unter anderem der Pathogenabwehr dienen. Erhöhte iNOS-Konzentrationen konnten im Myokard von Herzinsuffizienzpatienten festgestellt werden und erhöhte NO-Konzentrationen des Myokards mit einem negativen Effekt auf die Inotropie in Verbindung gebracht werden<sup>47,48</sup>.

Ein weiterer mechanistischer Zusammenhang zwischen Inflammation und kardialer Funktion könnte durch das leukozytäre Enzym Myeloperoxidase (MPO) vermittelt sein. MPO spielt eine maßgebliche Rolle in der primären Immunantwort, gleichzeitig vermittelt es vermehrten oxidativen Stress und erhöhten peripheren Gefäßwiderstand. Wie genau MPO Einfluss auf die kardiale Funktion im Rahmen der DCM, besonders in Verbindung mit Belastungstraining nimmt, soll im folgenden Abschnitt erläutert werden.

## **2.2 Myeloperoxidase**

### **2.2.1. Vorkommen und Struktur**

Das Enzym Myeloperoxidase stellt mit ungefähr 5% einen Hauptbestandteil des Proteingehalts polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten dar<sup>49</sup>. Es wird in azurophilen Granula gespeichert und bei Aktivierung der Zelle in Phagosomen und den extrazellulären Raum freigesetzt. Synthetisiert wird das Enzym während der Reifung myeloischer Zellen im Knochenmark, wobei die Synthese beendet ist, bevor die Granulozyten in den Blutkreislauf entlassen werden.

MPO ist außerdem in deutlich geringeren Mengen nachweisbar in Monozyten sowie Gewebsmakrophagen. Monozyten verlieren ihren MPO-Gehalt während der Ausreifung zu Makrophagen, sodass Makrophagen MPO lediglich durch Phagozytose polymorphkerniger Granulozyten oder freien MPOs aufnehmen können<sup>50</sup>. Außerhalb der myeloischen Zellreihe ist MPO außerdem in den Kupferzellen der Leber, in Mikroglia und in den Pyramidenzellen des Hippocampus nachweisbar<sup>51,52</sup>.

MPO ist ein ca. 150 kDa schweres Hämprotein und weist eine homodimere Struktur auf, wobei jedes Monomer aus einer schweren und einer leichten Kette zusammengesetzt ist<sup>53</sup>. Die charakteristische funktionelle Häm-Gruppe befindet sich kovalent gebunden an die große Kette des Enzyms, sie ist unter anderem verantwortlich für die typische grüne Färbung<sup>54</sup>. Von Bedeutung ist außerdem der hohe Arginin- und Lysin-Gehalt des MPO, dadurch wird es zum stark kationisch geladenen und basischen Protein.

### **2.2.2. Pathogenabwehr und katalytische Aktivität**

Das Hauptvorkommen von MPO in neutrophilen Granulozyten legte anfänglich den Rückschluss nahe, dass MPO seine Hauptaufgabe in der Abwehr von Pathogenen hat. Neutrophile Granulozyten spielen eine essenzielle Rolle in der angeborenen Immunantwort. Sie gehören zu den ersten Immunzellen, die betroffene Regionen infiltrieren und dort entsprechende Noxen phagozytieren, oder mikrobizide Bestandteile unschädlich machen. Stimuli für die Aktivierung der Granulozyten sind unter anderem Pathogene wie Bakterien oder apoptotische körpereigene Zellen.

Die Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten aus der passiven Zirkulation im Blutkreislauf heraus an den Ort des Geschehens erfolgt durch sogenannte Chemotaxine, welche in Form von Komplement-Faktoren, Leukotrienen, Chemokinen oder N-formulierten Peptiden auftreten können, wobei vor allem die CXC-Chemokine wie IL-8 eine entscheidende Rolle spielen<sup>55</sup>. Der Vorgang der Migration setzt sich aus den einzelnen Prozessen Adhäsion, Aktivierung, Transmigration und Chemotaxis der PMN zusammen. Im extraluminale Raum angelangt, folgt die Fortbewegung der Zelle entlang eines Konzentrationsgradienten von Chemotaxinen, wobei PMN in der Lage sind, einen Gradienten von <1% pro Zelllänge wahrzunehmen<sup>56</sup>.

Bemerkenswerterweise konnte bereits gezeigt werden, dass auch freies MPO in der Lage ist in den intrazellulären Raum zu gelangen. Bei Berührung der Gefäßwand, interagiert das positiv geladene MPO mit dem negativ geladenen Heparansulfat-Glykosaminoglykan (GAG) und kann durch Transzytose in die Endothelzelle und den subendothelialen Raum gelangen.

Am Ort des Geschehens folgt die Pathogenabwehr der neutrophilen Granulozyten durch oxidative und nicht-oxidative Strategien. Erstere besteht aus dem sogenannten oxidativen Burst. Dieser wird mithilfe der NADPH-Oxidase ausgeübt. Es handelt sich um einen Multiprotein-Oxidase-Komplex, welcher nach Stimulation aktiviert wird und darauffolgend die Reduktion von molekularem Sauerstoff ( $O_2$ ) zu Superoxid ( $O_2^{\cdot-}$ ) und davon abgeleitet weiteren reaktiven Sauerstoff Spezies, wie Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), katalysiert<sup>57</sup>.

Die nicht-oxidative Strategie beinhaltet verschiedene antimikrobielle Peptide und Proteine, welche vornehmlich in den azurophilen Granula gespeichert sind und nach Aktivierung in die Phagolysosomen entlassen werden<sup>58</sup>.

In Bezug auf die katalytischen Eigenschaften der Myeloperoxidase, soll besonders auf den Halogenierungs-Zyklus und den Peroxidase-Zyklus eingegangen werden. Die bakterizide Wirkung von MPO beruht auf der Fähigkeit des Enzyms, oxidierbare Kosubstrate wie Halogenide (Chlorid, Bromid, Iodid) oder Pseudohalogenide (Thiocyanat) in der Anwesenheit von Wasserstoffperoxid zu oxidieren. Das  $H_2O_2$  stammt unter anderem aus den Reaktionen des bereits beschriebenen oxidativen Bursts.  $H_2O_2$  wird zunächst zu Wasser ( $H_2O$ ) reduziert wobei MPO in einen intermediären, radikalischen Komplex überführt wird, welcher als Compound-1 bezeichnet wird. Die Compound-1 kann nun durch den Transfer von zwei Elektronen in einer direkten Reaktion zum ursprünglichen MPO zurück reagieren, wobei die bereits erwähnten Kosubstrate Halogenide, Pseudohalogenide oder Nitrit ( $NO_2^-$ ) als Reaktionspartner dienen<sup>50</sup>. Es ist anzunehmen, dass Chlorid hierbei hauptsächlich als Substrat dient, da es physiologisch in großer Menge vorhanden ist<sup>59</sup>. Chlorid wird in diesem Reaktionsschritt demnach oxidiert und es entsteht hypochlorige Säure (HOCl). Die direkte bakterizide Wirkung der MPO besteht zunächst in der Rolle als Katalysator der toxischen Chlorierung mittels HOCl direkt am Pathogen. Unabhängig davon reagiert die gebildete HOCl mit einer Vielzahl körpereigener Strukturen, unter anderem Lipide, DNA, Amine und Tyrosin und es entsteht Halohydrin, 5-Chlorouracil, Chloramin und 3-Chlorotyrosin<sup>60</sup>. Diese Reaktionen sind in der Lage die Tertiärstruktur zelleigener Proteine zu verändern und somit Einfluss auf die Proteinfunktion zu nehmen, ein Prozess der bereits in Erkrankungen wie der Herzinsuffizienz, koronaren Herzkrankheit (KHK) und pulmonalen Hypertonie nachgewiesen werden konnte<sup>61</sup>.

Eine weitere Möglichkeit der Rückreaktion der Compound-1 zu der Grundform des MPOs ist der Peroxidase-Zyklus. Hierbei oxidiert die Compound-1 verschiedene organische oder anorganische Substanzen und es entsteht die MPO Form Compound-2, welche nicht mehr fähig

ist, Reaktionen mit Halogeniden einzugehen<sup>50</sup>. In einem weiteren Schritt wird die Compound-2 zurück in die ursprüngliche MPO-Form reduziert.

Reduktionsmittel sind unter anderem die Aminosäure Tyrosin, Phenol- und Indol-Varianten sowie Ascorbate, aus ihnen gehen Radikalintermediate hervor, die weiter reagieren können<sup>62</sup>. Außerdem kann Superoxid sowie Stickstoffmonoxid und Nitrit für die Reduktion genutzt werden. Hierbei wird Stickstoffmonoxid zu Nitrit und Nitrit weiter zu Stickstoffdioxid oxidiert, einem reaktiven Radikal, welches die Nitrierung von Lipiden und Proteinen induziert<sup>63</sup>. Ein Beispiel ist das durch Nitrierung von Tyrosinresten entstehende Nitrotyrosin (NO<sub>2</sub>-Tyr) welches als Indikator für oxidativen Stress dient und pathophysiologisch relevant ist. Zu unterstreichen im Rahmen dieser Arbeit gilt außerdem der genannte Verbrauch von Stickstoffmonoxid. Die Reduktion der Bioverfügbarkeit von NO hat eine relevante Bedeutung in der Homöostase von gefäßphysiologischen und inflammatorischen Abläufen.

Wie einleitend bereits erwähnt, wurde die Hauptaufgabe der Myeloperoxidase lange Zeit in der Pathogenabwehr gesehen. Diese Theorie wird vor allem durch in-vitro Experimente sowie tierexperimentell gestützt. MPO-defiziente Mäuse weisen eine eingeschränkte Abwehrfähigkeit unter anderem gegenüber der Erreger *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Klebsiella pneumoniae* auf<sup>64,65,66</sup>. Gegenüber anderen Pathogen wie beispielsweise *Staphylococcus aureus* zeigte sich hingegen eine ähnliche Abwehrstärke wie bei MPO-kompetenten Wildtyp Tieren, was wiederum nahelegt, dass der Pathogenabwehr-Effekt der Myeloperoxidase von der Pathogen-Spezies abhängig ist<sup>65</sup>.

MPO-Defizienz bei Menschen, erstmals beschrieben 1954, ist eine autosomal-rezessive Erkrankung, verursacht durch eine Mutation des MPO-Gens auf Chromosom 17. Bis 1979 gibt es nur 17 bestätigte Fälle, heutzutage wird in Europa und den USA von einer Inzidenz von 1:200 bis 1:4000 ausgegangen. Interessanterweise ist in Japan eine Inzidenz von 1:57000 beschrieben<sup>67</sup>. Trotz der bereits beschriebenen Wirkung der Myeloperoxidase ist die MPO-Defizienz bei Menschen eine meist asymptomatische verlaufende Erkrankung, die nicht zwingend zu erhöhter Infektanfälligkeit führt. Lediglich bei zusätzlicher Diabetes mellitus Erkrankung, konnte eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber *Candida albicans* Infektionen beschrieben werden<sup>68</sup>. Diese Erkenntnisse lenkten die Aufmerksamkeit auf weitere, insbesondere extramikrobizide Eigenschaften der Myeloperoxidase.

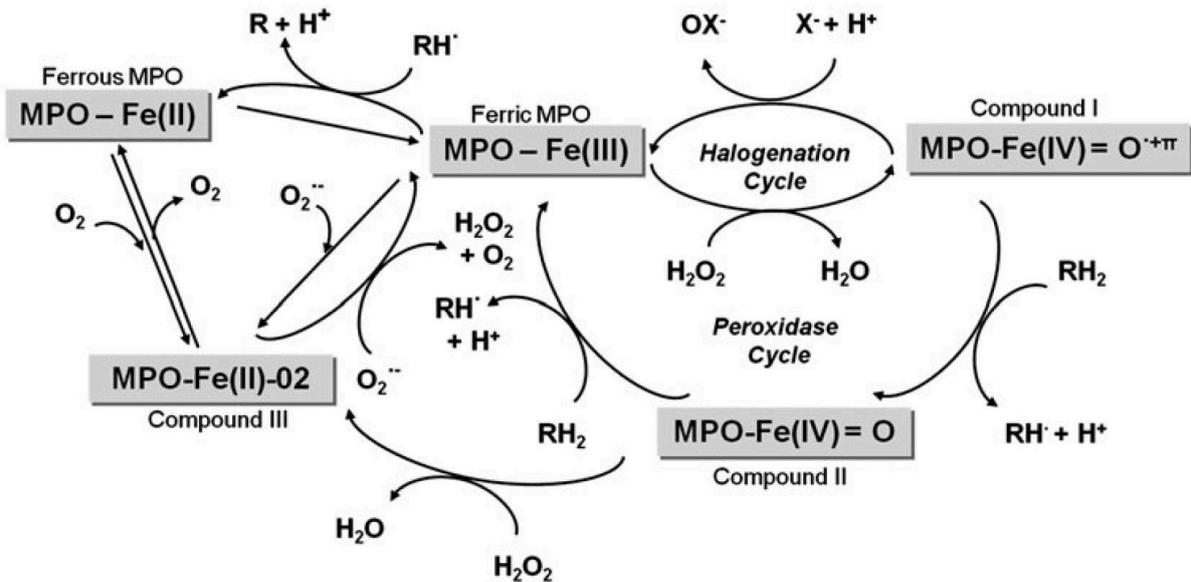


Abb. 1: Katalytische Aktivität der Myeloperoxidase

Die Grundform des MPO (MPO-Fe(III)) kann mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reagieren, dabei entsteht die Compound-1. Die Compound-1 wird über den Halogenierungs- oder Peroxidase-Zyklus zurück in die Grundform des MPO reduziert. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Wasserstoffperoxid; O<sub>2</sub><sup>•-</sup>: Superoxid; O<sub>2</sub>: Dioxygen; X: Halogenide (z.B. Chlorid, Bromid); OX<sup>•</sup>: hypohalogenide Säuren (z.B. HOCl); RH<sup>•</sup>: Substratradikal; RH<sub>2</sub>: oxidierbares Substrat<sup>61</sup>.

### 2.2.3. Reduktion der NO-Bioverfügbarkeit und der Einfluss auf das Endothel

Eine bedeutende extramikrobizide Eigenschaft der Myeloperoxidase ist die Fähigkeit, in relevantem Ausmaß die Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid herabzusetzen. Dies zeigt sich im Tiermodell ex-vivo, in-vivo sowie im Patienten nach myokardialer Ischämie und Reperfusion<sup>69,70,71</sup>. Relevant ist die herabgesetzte NO-Bioverfügbarkeit, da sie ein typisches Merkmal der endothelialen Dysfunktion ist, ein bekanntes Phänomen der akuten Inflammation sowie verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen, wie auch der Herzinsuffizienz.

Zum einen oxidiert MPO NO unter Bildung von Nitrit. Indirekt wird NO verbraucht, durch Oxidation von, durch die Myeloperoxidase gebildeten, Radikalintermediaten wie Ascorbyl- oder Tyrosyl-Radikalen<sup>69</sup>. Ein weiterer indirekter Mechanismus ist die Hemmung der endothelialen NO-Synthase über mehrere Wege. Zum einen konnten Untersuchungen zeigen, dass von MPO gebildete HOCl mit L-Arginin reagiert und chlorinierte Produkte entstehen, welche die eNOS inhibieren<sup>72</sup>. Außerdem führt Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>) zu Hemmung der NO-Produktion durch die eNOS, infolgedessen werden statt NO Superoxid-Anionen (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) synthetisiert. Ein weiterer potenter Inhibitor der eNOS ist das methylierte Derivat der Aminosäure Arginin: asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA). Das im Plasma vorkommende ADMA wiederum wird durch die Dimethylamino-Dimethylargininhydrolase (DDAH) metabolisiert. Studien konnten zeigen, dass die Aktivität der DDAH stark abhängig von oxidativem Stress ist und weiterführend, dass durch MPO gebildete HOCl die DDAH inhibiert. Diese Inhibition führt folglich zu

einer erhöhten ADMA-Konzentration im Plasma und somit zu einer verstärkten eNOS-Inhibition<sup>73</sup>. Ebenfalls relevant ist die Modifizierung von Low-density Lipoprotein (LDL) durch, von MPO synthetisierter, HOCl und Hypothiocyansäure (HOSCN). Dieses modifizierte LDL wiederum führt zu einer Entkopplung der eNOS<sup>74</sup>.

Der Zusammenhang zwischen der durch MPO herabgesetzten NO-Bioverfügbarkeit und dem Gefäßstatus wurden in einer tierexperimentellen Studie veranschaulicht. Eine signifikant herabgesetzte Relaxationsfähigkeit der A. mammaria interna und des Ramus interventricularis anterior war Folge einer Injektion von freiem MPO und auch im Patienten zeigte sich ein negativer Zusammenhang zwischen dem MPO-Plasmaspiegel und der Relaxationsfähigkeit der Gefäße<sup>70</sup>.

#### **2.2.4. MPO und kardiovaskuläre Erkrankungen**

Der Zusammenhang zwischen der Myeloperoxidase und dem Auftreten und Verlauf kardiovaskulärer Erkrankungen ist ein immer stärker in den Fokus aktueller Forschung rückendes Thema. Wong et al. untersuchten den Zusammenhang in Bezug auf die Endpunkte Myokardinfarkt, Koronarrevaskularisation, Schlaganfall und Tod durch kardiovaskuläre Erkrankung bei asymptomatischen Patienten ohne Hinweise auf kardiovaskuläre Erkrankungen. Erhöhte MPO-Plasmaspiegel korrelierten mit den genannten Endpunkten, der Zusammenhang blieb auch nach Anpassung der Werte an Alter, Geschlecht und Risikofaktoren der Patienten signifikant<sup>75</sup>. Aktuell bekannte Zusammenhänge und pathophysiologische Vorgänge sollen im Folgenden genauer dargestellt werden.

Hozwirth et al. konnten anhand von 120 Patienten mit Vorhofflimmern zeigen, dass MPO-Plasmaspiegel bei Vorhofflimmern langfristig erhöht sind. Dabei war vor allem bemerkenswert, dass der Spiegel im linken Vorhof zehnmal so hoch war, wie in der Peripherie, woraus der Rückschluss gezogen wurde, dass das MPO aus dem linken Vorhof stammt<sup>76</sup>.

In einer Studie von Rudolph et al. wurde im MPO-defizienten Maus Modell der mechanistische Zusammenhang untersucht. Pathophysiologisch spielt der bindegewebige Umbau des Vorhofmyokards, dargestellt durch den Grad der atrialen Fibrose eine entscheidende Rolle. Es kommt zur vermehrten Ablagerung von Kollagen- und Fibronektinfasern, was die elektrischen Leitungseigenschaften des Vorhofgewebes verändert und zu gestörter Erregungsausbreitung im Rahmen des Vorhofflimmerns führen kann. Im murinen MPO-Knockout Modell führte die Stimulation von Leukozyten zu geringerer Aktivität der Matrixmetalloproteinase (MMP) 2 und 9 und weniger Fibrose im rechten Atrium, als bei MPO kompetente Tiere, da MMPs durch HOCl, einem Produkt der MPO aktiviert werden. Eine im Anschluss an die Leukozyten Stimulation im rechten Vorhof durchgeführte Elektrostimulation zeigte einen Schutz der MPO-defizienten Tiere vor dem Auftreten von Vorhofflimmern<sup>77</sup>.

Auch der Einfluss der Myeloperoxidase auf das ventrikuläre Myokard wurde untersucht und es konnten auch hier einige bemerkenswerte Feststellungen gemacht werden. Es besteht ein Zusammenhang zwischen dem akuten Koronarsyndrom und erhöhten MPO-Plasmaspiegeln, wobei MPO als unabhängiger Marker für eine frühe Diagnose des akuten Koronarsyndroms identifiziert werden konnte<sup>78</sup>. Baldus et al. konnten weiterführend zeigen, dass Patienten mit akutem Koronarsyndrom und einem MPO-Plasmaspiegel über 350 µg/l ein höheres Risiko für die beiden Endpunkte Tod und nicht letalen Myokardinfarkt aufwiesen, als Patienten mit niedrigeren Werten<sup>79</sup>.

Im Anschluss an einen Myokardinfarkt findet im ventrikulären Myokard ein Remodeling der Kardiomyozyten statt welches unter anderem zu einer linksventrikulären Dilatation mit daraus resultierenden Erkrankungen wie chronischer Herzinsuffizienz führen kann. Neutrophile Granulozyten und Monozyten werden rekrutiert und setzen ihre pro-inflammatorischen und proteolytischen Inhalt frei, unter anderem die Myeloperoxidase<sup>80</sup>. Im murinen Modell konnten bemerkenswerte echokardiographische Unterschiede nach Verabreichung eines MPO-Inhibitors festgestellt werden. Es zeigten sich signifikant bessere Werte der linksventrikulären Ejektionsfraktion, der Fraktionellen Verkürzung und des Schalgvolumens<sup>81</sup>. Bereits durch die Reduktion der Neutrophilenzahl in Plasma, hervorgerufen durch die Applikation eines Ly6G-Antikörpers konnte an einem murinen Modell an dem durch kurzzeitige Ligatur einer Koronararterie eine Myokardischämie hervorgerufen wurde eine deutlich besser ventrikuläre Funktion gemessen werden, als bei Tieren mit normaler Neutrophilenzahl. Dies wurde in Verbindung gebracht mit einer geringeren Neutrophileninfiltration in die Kardiomyozyten, niedrigeren MPO-Plasmaspiegeln und verminderten fibrotischen Umbauprozessen. Letztendlich zeigte sich in der genannten Studie eine verbesserte linksventrikuläre Funktion nach Reduktion der Neutrophilenzahl.<sup>82</sup> MPO ist zum einen dafür verantwortlich, weitere Leukozyten an den Ort des Geschehens zu locken und zu aktivieren, zum anderen übt MPO den beschriebenen negativen Einfluss auf das Remodeling über die Generierung von zytotoxischen reaktiven Aldehyden, welche bei der Oxidation von alpha-Aminosäuren entstehen, aus<sup>83</sup>. Ein weiterer im murinen Modell nachgewiesener Mechanismus ist die Hemmung der Aktivität des Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ-1 (PAI-1) durch von MPO generierte Oxidanten. Im Infarktgebiet von Mpo-KO Tieren zeigt sich eine verminderte Plasmin-Aktivität, dies konnte in Verbindung gebracht werden mit verringerter Leukozyten Infiltration, verminderter linksventrikuläre Dilatation, einer verbesserten systolischen Funktion und verzögerter Myokardruptur<sup>84</sup>.

Ein weiteres klinisches Beispiel für den Einfluss der Myeloperoxidase ist der erhöhte MPO-Plasmaspiegel und erhöhte MPO-Gehalt der Leukozyten bei Patienten mit Koronarer Herzkrankheit<sup>85</sup>. In aufbauenden Studien konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Myeloperoxidase-Konzentration mit einer schlechteren Prognose einhergeht<sup>86</sup>. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass der MPO-Plasmaspiegel sogar bei scheinbar gesunden Patienten,

welche innerhalb von acht Jahren eine Koronare Herzkrankheit entwickelten, bereits im gesunden Zustand erhöht war. MPO kann also als prädiktiver Marker für diese Erkrankung herangezogen werden<sup>87</sup>.

Auch in Bezug auf die Kardiomyopathie gibt es einige interessante Zusammenhänge mit der Myeloperoxidase. Tierexperimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass ein genetischer MPO-Knockout oder die medikamentöse Inhibition von MPO vor einer Antracyclin induzierten Kardiomyopathie (AICM) zu schützen vermag. Andersherum korrelierten erhöhte MPO-Plasmaspiegel mit dem Risiko der Entstehung einer AICM.<sup>88</sup>

Auch im Rahmen der für diese Arbeit besonders interessanten Herzinsuffizienz fällt der Myeloperoxidase eine wichtige Rolle zu. Bei Patienten mit herabgesetzter linksventrikulärer systolischer Funktion (EF<50%) konnten erhöhte MPO-Plasmakonzentrationen nachgewiesen werden, außerdem korrelierten die Werte mit der EF und dem linksventrikulären enddiastolischen Durchmesser<sup>89</sup>. Hervorzuheben gilt insbesondere die positive Korrelation mit den NYHA-Stadien der chronischen Herzinsuffizienz, sowie der positive Zusammenhang mit der Vorhersage zukünftiger schwerer Komplikationen wie Herztransplantation, Hospitalisierung und Tod<sup>90,91</sup>. Interessanterweise konnte die Cardiovascular Health Study den prognostischen Wert des Myeloperoxidase-Spiegels für das Auftreten einer chronischen Herzinsuffizienz vor allem bei Patienten ohne klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren darstellen<sup>92</sup>.

### **2.2.5. Hereditäre DCM im Tiermodell**

Um den Einfluss der Myeloperoxidase auf die Entwicklung der dilatativen Kardiomyopathie untersuchen zu können, wird in dieser Arbeit ein murines Knockout Modell benötigt: die Muscle Lim Protein (MLP) Knockout Maus. MLP spielt eine entscheidende Rolle im kontraktilen Apparat der Kardiomyozyten des Herzens. Die Kardiomyozyten bilden die quergestreifte Muskulatur des Myokards und sind in der Lage chemische Energie in mechanische Kraft umzuwandeln und so eine Kontraktion zu bewirken, welche das Herz-Kreislauf-System des Organismus mit Blut versorgt.

Obwohl beide zur quergestreiften Muskulatur gehören, unterscheidet sich der Aufbau der Kardiomyozyten von dem Aufbau der Skelettmuskulatur entscheidend. Kardiomyozyten besitzen ein oder zwei längliche Zellkerne (Nuclei) welche in der Mitte der langen, verzweigten Zelle liegen. Die kleinste funktionelle Einheit der Zelle ist das Sarkomer. Dieses wiederum besteht aus zwei verschiedenen kontraktilen Proteinen, den dünnen Aktinfilamenten und den dicken Myosinfilamenten welche parallel zueinander angeordnet sind. Die Aktinfilamente sind über das Verankerungsprotein Aktinin mit der sogenannten Z-Scheibe verbunden, welche wiederum aus einer bestimmten Anordnung verschiedenster Proteine besteht. Das Verankerungsprotein Titin stellt eine elastische Verbindung zu der jeweils benachbarten Z-Scheibe her. Mehrere Sarkomere nebeneinander bilden eine Myofibrille. Zwischen den Myofibrillen befindet sich

das Sarkoplasma, dieses enthält die übrigen Zellorganellen unter anderem eine hohe Zahl Mitochondrien, welche den erhöhten Energiebedarf der Zellen bedienen.

Das Muscle Lim Protein, auch Cystein- und Glycin-reiches Protein 3 (CSR3 oder CRP3) genannt, gehört zusammen mit CRP1 und CRP2 zu der Familie der Cystein reichen Proteine. CRP1 und CRP2 sind in glatten Muskelzellen zu finden, CRP3 in quergestreiften Muskelzellen wie dem Myokard<sup>93</sup>. Das Muscle Lim Protein ist ein kleines Protein, bestehend aus 194 Aminosäuren. Charakteristischerweise beinhaltet es zwei LIM-Domänen, diese bestehen aus ungefähr 50-60 Aminosäuren und präsentieren jeweils zwei Zink-Finger Domänen, welche in der Lage sind, zwei Zink Ionen zu binden<sup>94</sup>. Das MLP konnte bereits an verschiedensten Orten im Zytoplasma nachgewiesen werden, wobei es in der Lage ist mit vielen unterschiedlichen Proteinen zu interagieren. Auf Ebene der Sarkomere der Kardiomyozyten bindet MLP unter anderem an die Z-Scheiben Proteine Telethonin, alpha-Aktinin, Cofilin-2, Calcineurin HDAC4, MLP und MLP-b, die entscheidenden Aufgaben des Proteins an dieser Stelle ist die Ausbildung der physiologischen Struktur der Z-Scheibe<sup>95,96,97,98,99,100</sup>. Ein weiterer Mechanismus über den MLP zu der Zytoarchitektur von Kardiomyozyten beiträgt, ist die selbstständige Bündelung und Verknüpfung von Aktinfilamenten<sup>101</sup>.

Des Weiteren spielt MLP eine Rolle in der Mechanosensorik der Kardiomyozyten, der zugrundeliegende Mechanismus hierfür ist noch nicht ausreichend geklärt. Die initial angenommene Rolle als Mechanosensor wird immer häufiger hinterfragt, mittlerweile wird eher davon ausgegangen, dass MLP eine Rolle in der Signalkaskade der Übermittlung des Dehnungszustandes spielt<sup>102</sup>. Eine weitere Interaktion des Proteins besteht mit den Proteinen Spektrin und Zyxin, welche wiederum eine wichtige Rolle in der lateralen Kraftübertragung vom Sarkomer auf das die Muskelfasern umgebende Sarkolemm und die extrazelluläre Matrix spielen. Neben der Kraftübertragung vermitteln sie myofibrilläres Wachstum und Kontraktion<sup>103</sup>. Eine weitere identifizierte Aufgabe des MLP ist die Förderung der Muskelzelldifferenzierung, welche es durch eine verstärkte Differenzierung der Myotuben, eine Vorstufe der definitiven Muskelzelle, ausübt. Wirkort des MLP ist in diesem Fall der Zellkern, nicht wie bei den zuvor genannten Funktionen das Zytoplasma der Zelle<sup>104</sup>.

Die soeben beschriebenen Vorgänge können gut anhand des Mlp-KO Modells funktionell dargestellt werden. Histologisch konnte eine dramatische Störung der Zytoarchitektur gezeigt werden, insbesondere bedingt durch myofibrilläre Dysorganisation, gestörte Organisation der Z-Scheibe und signifikant verstärkte Fibrose. Bereits kurz nach der Geburt weisen die Mäuse einen verminderten Tonus des Myokards auf, unfähig eine bestimmte Spannung aufzubauen führt dies im Verlauf zu kardialer Dilatation und weiter zu Hypertrophie der Muskulatur<sup>105</sup>.

Direkt nach der Geburt liegt bei den Mlp-KO Tieren noch keine Veränderung des Herzgewichtes im Vergleich zu Wildtyp-Tieren vor<sup>105</sup>. Weder Ejektionsfraktion noch Schlagvolumen zeigen nach zwei Wochen einen Unterschied zu den Werten von Wildtyp-Tieren, allerdings

verschlechtern sich beide Messgrößen in den folgenden Lebenswochen kontinuierlich<sup>106</sup>. Lorenzen-Schmidt et al. untersuchten rechtsventrikuläre Trabeculae carneae, rundlichen Muskelbälkchen, von ebenfalls zwei Wochen alten Mäusen, bei denen Herzgewicht, FS und EF noch unverändert zu den Werten gleichaltriger Wildtyp Tiere waren. Es zeigte sich, dass bereits ohne messbare Ausprägung eines pathologischen kardialen Phänotyps, Beeinträchtigungen der passiven Eigenschaften des Myokards und der Relaxationszeit vorhanden sind. Gleichzeitig konnte keine Einschränkung der systolischen Funktion dargestellt werden, was in Zusammenschau darauf hinweist, dass die Ausbildung der Herzinsuffizienz dieses Mausmodells eher durch gestörte diastolische als systolische Funktionen zustande kommt<sup>107</sup>.

Echokardiographische Studien zeigen im Verlauf eine Dilatation des linken Ventrikels, eine verdünnte Ventrikelwand und daraus resultierend eine verminderte fraktionelle Verkürzung. Trotz des dünneren Myokards ist das Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht der Mäuse erhöht, was ebenfalls auf eine Hypertrophie hinweist. Retrograde Katheterisierung des linken Ventrikels konnte eine Reduktion des maximalen linksventrikulären Druckes darstellen, ein Indikator für die herabgesetzte myokardiale Kontraktionskraft. Auch der enddiastolische Druck im linken Ventrikel ist erhöht, was zusammen mit erhöhtem totalen Lungengewicht, hinweisend auf Flüssigkeitsakkumulation, als Zeichen für eine linksventrikuläre Herzinsuffizienz zu sehen ist<sup>105</sup>.

Folgende Studien zu MLP-defizienten Mäusen konnten den zeitlichen Ablauf der Entwicklung einer DCM genauer beschreiben: Acht Wochen alte Mlp-KO Mäuse weisen bei gleichem Körpergewicht ein erhöhtes Herzgewicht auf, wobei durch Untersuchung des Verhältnisses zwischen trockener und feuchter Herzmasse ein ursächliches Ödem ausgeschlossen werden konnte und von einer Erhöhung des Gewichts durch Muskelhypertrophie ausgegangen wird. Nach 15 Wochen erreicht die linksventrikuläre Masse sein Maximum und von da an eine Plateauphase<sup>106</sup>. Die Entwicklung der Ejektionsfraktion, als bedeutender Marker für die funktionelle Herzleistung gestaltet sich wie folgt: Nach zwei Wochen gibt es noch keine Unterschiede zu den Werten von Wildtyp-Tieren. Nach sechs Wochen zeigen sich bereits deutliche Abweichungen und nach 15 Lebenswochen haben WT Tiere eine EF von etwas weniger als 60% wohingegen Mlp-KO Tiere nur eine EF von etwas unter 30% aufweisen<sup>106</sup>.

Interessanterweise steigert sich das Schlagvolumen der Mlp-KO Tiere nach der 15. Lebenswoche wieder, aus diesem Grund wurden für diese Arbeit Tiere in dem Zeitraum von 11-15 Lebenswochen beobachtet.

Das MLP spielt allerdings nicht ausschließlich im Mausmodell eine Rolle, bemerkenswerterweise konnte in klinische Studien ein Zusammenhang zwischen humanem MLP und der DCM gezeigt werden. Zolk et al. untersuchten Herzen von Patienten, welche an idiopathischer DCM oder ischämischer Kardiomyopathie litten. Das Myokard wurde nach erfolgter Herztransplantation untersucht und es konnte gezeigt werden, dass die Expression von MLP im Endstadium

der Erkrankungen, herabreguliert ist<sup>108</sup>. Ein weiterer in den Fokus gerückter Wirkort des MLPs ist der Komplex aus MLP mit Telethonin, ein Protein welches wiederum mit dem bereits beschriebenen Verankerungsprotein Titin an der Z-Scheibe der Sarkomere interagiert. Genetische Analysen an Patienten mit diagnostizierter DCM zeigten eine Mutation im MLP codierenden Genabschnitt, welche zu einer Veränderung des N-terminalen Endes des MLP führt und somit die Bindung an Telethonin beeinträchtigt, was wiederum zu Störung an der Z-Scheibe führt und mit der Entstehung einer DCM in Verbindung steht<sup>95</sup>.

## **2.3 Belastungstraining**

### **2.3.1. Grundlage der reduzierten Belastungsfähigkeit von DCM-Patienten und der Effekte von regelmäßigem Ausdauertraining.**

In dieser Arbeit soll ein möglicher Zusammenhang zwischen regelmäßigem Ausdauertraining, inflammatorischen Prozessen bezogen auf die Myeloperoxidase und die kardiale Funktion in Rahmen der DCM überprüft werden. In diesem Abschnitt wird daher zunächst die pathophysiologische Grundlage der herabgesetzten funktionellen Kapazität (klinisch sichtbar als Belastungsintoleranz) von DCM-Patienten dargestellt und der Effekt von regelmäßigem Ausdauertraining beschrieben.

Zunächst soll nun erläutert werden, welche physiologischen Prozesse bei Herzgesunden unter Belastung stattfinden: es wird eine 4-6fache Erhöhung des Herzzeitvolumens (HMV) verzeichnet, dies geht einher mit einer 2-4fachen Erhöhung der Herzfrequenz (HF) und einer Steigerung des Schlagvolumens (SV) um 20-50%. Die Erhöhung des Schlagvolumens wird zum einen erreicht durch den Frank-Starling Mechanismus, welcher bei erhöhter Vorlast, also einer erhöhten enddiastolischen Füllung ein höheres Schlagvolumen durch eine Vergrößerung der isovolumetrischen und isobaren Maxima des Myokards generiert. Außerdem findet eine periphere Vasodilatation statt, was eine Senkung der Nachlast des Herzens, sowie eine stärkere Muskelperfusion bewirkt<sup>109</sup>.

Diese Anpassungsprozesse des Körpers sind bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie eingeschränkt, was zu dem typischen Symptom einer Belastungsintoleranz führt.

Herzinsuffiziente Patienten erreichen weniger als 50% des Herzzeitvolumens Herzgesunder unter maximaler Belastung. Und auch das Schlagvolumen, welches wie bereits beschrieben schon in Ruhe vermindert ist, erhöht sich nur unzureichend bis zu einem Maximum von 50-65ml im Vergleich zu bis zu 100ml bei Herzgesunden. Ursache für das verminderte Schlagvolumen ist zum einen die Unfähigkeit des linken Ventrikels seine Vorlast, also das enddiastolische Volumen zu erhöhen. Grund hierfür ist, dass der Ventrikel durch die Herzinsuffizienz bereits dilatiert ist und ohnehin schon an der Grenze zum maximal möglichen Volumen arbeitet<sup>109</sup>. Die zweite Ursache für das verminderte SV ist die Unfähigkeit des Ventrikels die

Ejektionsfraktion, definiert als Anteil des SV am enddiastolischen Volumen, zu erhöhen. Gründe hierfür sind eine beeinträchtigte Kontraktilität des Myokards, reduzierte  $\beta$ -Adrenozeptor Sensibilität, erhöhter systemischer vaskulärer Widerstand durch eine vermehrte Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems und eine eingeschränkte vasodilatatorische Reaktion auf Trainingsbelastung in der Peripherie<sup>109</sup>. Mit dieser Einschränkung des Schlagvolumens bleibt die Steigerung der Herzfrequenz als hauptsächliche Anpassung an eine Belastungssituation des Herzens. Nichtsdestotrotz sind 25-70% der Herzinsuffizienzpatienten von einer beeinträchtigten Anpassung der Chronotropie betroffen, Gründe hierfür sind eine Herabregulierung und Desensibilisierung der  $\beta$ -Adrenozeptor sowie ein negatives Remodeling des Sinus Knotens<sup>110</sup>.

Immer weiter in den Fokus aktueller Forschung gerückt sind extrakardiale Ursachen für die Belastungsintoleranz von Patienten mit Herzinsuffizienz. Hierfür gibt es zwei Gründe, zum einen korreliert die linksventrikuläre systolische Funktion in Studien nur wenig mit der tatsächlichen Belastbarkeit von Patienten<sup>111</sup>. Des Weiteren wurde festgestellt, dass die raschen zentralhämodynamischen Verbesserungen, welche durch eine medikamentöse Therapie erreicht werden, erst nach Wochen oder Monaten zu einer verbesserten Belastungsfähigkeit führen<sup>112,113</sup>.

Studien zufolge ist in erster Linie eine Unterversorgung der Skelettmuskulatur und erst in zweiter Linie ein vermindertes Herzzeitvolumen ursächlich für eine schlechtere Belastbarkeit von Herzinsuffizienzpatienten<sup>114</sup>. Diese Unterversorgung konnte dargestellt werden durch Messung von schwächerer Durchblutung und erhöhtem peripheren vaskulären Widerstand der Beinmuskulatur in Ruhe sowie unter Belastung im Vergleich zu Herzgesunden, bei denen jeweils gegenteilige Vorgänge, also eine Verstärkung der Durchblutung zusammen mit Verringerung des peripheren vaskulären Widerstand zu beobachten sind<sup>115</sup>. Die beiden Faktoren zusammen werden durch Vasodilatation der Gefäße ermöglicht. Hervorzuheben ist, dass Studien gezeigt haben, dass es einen Zusammenhang zwischen der eingeschränkten, endothelial vermittelten Vasodilatation und dem Grad der Belastungsintoleranz sowie dem NYHA-Stadium von Patienten gibt<sup>116</sup>.

Gründe für die eingeschränkte Vasodilatation sind eine Überstimulation des Sympathikus, Aktivierung des RAAS und erhöhte Endothelin Spiegel<sup>117,113</sup>. Ein weiterer Mechanismus ist eine erniedrigte Konzentration des vasodilatierend wirkenden Moleküls NO, klinisch nachgewiesen durch eine verminderte Dilatation der A. radialis nach intravenöser Acetylcholin-Stimulation von Patienten mit Herzinsuffizienz im Vergleich zu Herzgesunden<sup>118</sup>. Die Ursache der erniedrigten Konzentration ist noch nicht ausreichend geklärt, diskutiert werden Veränderungen der enzymatischen Aktivität, eine veränderte Bereitstellung von Substraten und Kofaktoren sowie Interaktionen mit Superoxid-Anionen<sup>119</sup>.

Ein weiterer Grund für die erniedrigte Belastungsfähigkeit ist das frühe Einsetzen anaerober Muskelarbeit, unabhängig von der bereits beschriebenen verminderten Durchblutung<sup>120</sup>.

Die positiven Auswirkungen von Belastungstraining auf kardiologisch vorerkrankte Patienten sind vielfach durch Studien belegt. In der HF-Action Studie wurde Anhand von 2331 Patienten mit einer EF unter 35% gezeigt, dass regelmäßiges körperliches Training zu einer 11-prozentigen Reduktion der primären Endpunkte, definiert als Hospitalisierung oder Tod führen kann<sup>121</sup>. In einer weiteren Studie wurde speziell der Trainingseffekt auf DCM-Patienten untersucht. Nach einer Trainingsperiode von acht Wochen wurde ein durchschnittlicher Anstieg der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) in Ruhe von 39% auf 44% festgestellt. Unter Belastung kam es zu einem Anstieg der LVEF von 44% auf 49%, wobei es interessanterweise vor der Trainingsperiode zu keiner Steigerung der EF unter Belastung kam. Außerdem konnte ein negativer Zusammenhang zu dem Aktivitätsstatus vor der Teilnahme an der Studie hergestellt werden, die Patienten mit der initial geringeren körperlichen Aktivität haben also am meisten von dem Training profitieren können<sup>122</sup>.

Myers et al. konnten durch zwei monatiges Training von DCM-Patienten eine Steigerung der maximalen Sauerstoffkapazität ( $V(O_2)_{max}$ ) von 17% feststellen<sup>123</sup>. Die  $V(O_2)_{max}$  ist einer der am häufigsten untersuchten Parameter, um Trainingseffekte zu verdeutlichen, sie kann zuverlässig und nichtinvasiv bestimmt werden und lässt Rückschlüsse auf die aerobe Leistungsfähigkeit zu. Sie stellt die maximale Menge an Sauerstoffe dar, welche bei körperlicher Belastung aufgenommen werden kann und gilt als „Bruttokriterium“ der kardio-pulmonal-metabolischen Kapazität, da sie die Gesamtheit der für Belastungssituationen wichtigen Prozesse des Körpers, wie z.B. die Atmung, den Gasaustausch in der Lunge, das Herzzeitvolumen und die Sauerstoff Aufnahme in die Muskulatur erfasst. Weiterer Ergebnisse der genannten Studie waren eine Steigerung der Belastungsdauer um 14%. Keine signifikanten Veränderungen konnten hingegen in Bezug auf linksventrikuläres enddiastolisches Volumen und linksventrikuläre Ejektionsfraktion festgestellt werden<sup>123</sup>. Eine Studie derselben Arbeitsgruppe konnte vier Jahre später allerdings darstellen, dass sich die LVEF zwar erneut nach zwei Monaten Training nicht verändert hatte, nach acht Monaten hingegen eine Steigerung von 30+-15% auf 37+-15% in Ruhe festzustellen war<sup>124</sup>. Ähnliche Ergebnisse konnten Holloway et al. hingegen bereits nach zweimonatigem Training nachweisen. In dieser Studie zeigte sich ein Anstieg der LVEF von 44% auf 49% unter Belastung<sup>122</sup>.

Die LVEF ist also ein durchaus umstrittener Wert, um Trainingseffekte und Leistungsfähigkeit von DCM-Patienten zu bestimmen.

Gudjonsson et al. veröffentlichten die Feststellung, dass die Belastungsfähigkeit von DCM-Patienten, gemessen an der  $V(O_2)_{max}$  nicht mit der linksventrikulären Funktion des Herzens in Ruhe korreliert. Der Studie nach ist der Grund für die starke Variation die

belastungsinduzierte inotropische Reserve des Herzens, also die Fähigkeit des Myokards die Leistung unter Belastung zu steigern. Diese Reserve wurde echokardiographisch durch Veränderungen der Herzwandbewegung, gemessen an 16 verschiedenen Punkten des linken Ventrikels in Ruhe und unter Belastung, bestimmt. Bei ähnlichen Werten der LVEF in Ruhe konnten erheblichen Unterschiede in der inotropischen Reserve der Patienten festgestellt werden, welche mit der  $V(O_2)_{max}$  und der Ausdauerleistung korrelierten<sup>125</sup>.

Obwohl man also scheinbar nicht von der LVEF direkt auf die Belastungsfähigkeit von Patienten rückschließen kann, ist die LVEF dennoch ein Parameter, welcher durch regelmäßiges Belastungstraining gesteigert werden kann und welcher mit den positiven Auswirkungen von Belastungstraining in Verbindung steht.

Stolen et al. untersuchten Patienten mit DCM im NYHA-Stadium I-III über eine Trainingsperiode von fünf Monaten hinweg. Es zeigte sich eine Steigerung der  $V(O_2)_{max}$  um 27%, Schlagvolumen und Ejektionsfraktion verbesserten sich ebenfalls signifikant. Außerdem konnte durch das Training der ventrikuläre oxidative Stoffwechsel reduziert werden, der Sauerstoffverbrauch des Myokards wurde also gesenkt und somit die Effizienz der systolischen Funktion verbessert<sup>126</sup>. Ein weiterer untersuchter Faktor ist das Verhältnis von Phosphokreatin (PC) zu ATP. Beide Moleküle sind energiereiche Phosphatverbindungen, welche die Energie für die Muskelkontraktion liefern und deren Verhältnis zueinander bei DCM-Patienten erniedrigt ist. Außerdem korreliert das Verhältnis mit dem NYHA-Stadium sowie der LVEF, es kann sogar nachgewiesenermaßen als Vorhersagewert für die kardiovaskuläre Mortalität von DCM Patienten herangezogen werden<sup>127,128</sup>. Nach einer achtwöchigen Trainingsphase konnte jedoch kein Unterschied in dem PC/ATP Verhältnis gemessen werden, diese Feststellung kann als Hinweis darauf gesehen werden, dass der Verbesserung der LVEF vor allem extrakardiale Ursachen zugrunde liegt<sup>122</sup>.

Da die Studienlage zu extrakardialen Trainingseffekten bei DCM-Patienten sehr begrenzt ist, beziehen sich die nun folgenden Studien auf Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz wobei in der Rekrutierung der Patienten nicht zwischen unterschiedlichen Ätiologien der Erkrankung unterschieden wurde. Ein Ziel dieser Arbeit ist es daher, bereits nachgewiesene Mechanismen anhand des murinen Modells der DCM zu überprüfen.

Einer der wichtigsten extrakardialen Anpassungsvorgänge ist die Verbesserung der bereits beschriebenen endothelialen Dysfunktion. NO wird physiologisch vermehrt generiert durch endokrine Stimuli wie Acetylcholin oder Bradikinin, oder durch mechanische Stimuli wie eine erhöhte Strömungsgeschwindigkeit des Blutes<sup>129,130,131</sup>. Nach sechsmonatigem Training zeigten Herzinsuffizienzpatienten eine verbesserte Belastbarkeit, welche mit einer erhöhten Bereitstellung von NO durch das Endothel assoziiert werden konnte. Bei den Patienten, die das Training absolviert hatten, konnte eine stärkere Durchblutung in den unteren Extremitäten nach Stimulation mit Acetylcholin gemessen werden als bei untrainierten Patienten.

Weiterführend verminderte sich die Durchblutung bei Gabe des NO-Synthase-Inhibitors N<sup>G</sup>-monomethyl-L-Arginin. Die Bedeutung des positiven Zusammenhangs zwischen gesteigerter NO-Bereitstellung und der V(O<sub>2</sub>)max wird vor allem dadurch unterstrichen, dass die V(O<sub>2</sub>)max stark mit der Prognose der Herzinsuffizienz korreliert<sup>132</sup>. Als weiterer Nachweis dafür, dass die Verbesserung der Durchblutung tatsächlich auf eine erhöhte Bioverfügbarkeit von NO zurückzuführen ist, wurde gezeigt, dass die glatten Muskelzellen der peripheren Widerstandsgefäße trainierter Patienten keine veränderte Reaktion auf gleiche Mengen NO zeigten, im Vergleich zu Zellen von untrainierten Patienten<sup>133</sup>.

Nach vier Wochen langem Training von Ratten konnte durch Vergleich von Mesenterial- und Skelettmuskelgefäßen gezeigt werden, dass lediglich die Gefäße des Skelettmuskels mit einer erhöhten Bioverfügbarkeit von NO auf die Trainingsperiode reagiert hatte. Dies impliziert die Vermutung, dass der Grund für die erhöhte Verfügbarkeit der sogenannten „shear stress“, also die Wirkung des erhöhten Blutflusses auf das Endothel ist, da dieser während des Trainings in der Skelettmuskulatur stärker ist als in den Mesenterialgefäßen<sup>134</sup>. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in vitro, zusätzlich wurde eine Hochregulierung der eNOS mRNA in Endothelzellen nachgewiesen<sup>135</sup>. Dies konnte auch durch weitere tierexperimentelle Studien bestätigt werden, bereits eine kurze Trainingsdauer von einer Woche führte zu einer erhöhten eNOS-Expression in Endothelzellen eines porcinen Modells<sup>136</sup>.

Im Gegensatz zu den genannten Studien, konnten Ennezat et al. keine Veränderung der eNOS-Expression nach Belastungstraining von Patienten feststellen, es wurde stattdessen die Beobachtung gemacht, dass Training die Expression der zwei antioxidativ wirkenden Enzyme Glutathion-Peroxidase und Kupfer/Zink enthaltende Superoxiddismutase im Skelettmuskel erhöht<sup>137</sup>.

Interaktionen mit freien Sauerstoffradikalen, wie dem Superoxid sind auch in anderen Studien vermehrt im Fokus aktueller Diskussionen. Superoxid und NO reagieren sehr schnell zu einem Peroxynitrit-Anion, ohne dass NO vasodilatatorisch wirken kann, daher ist die Superoxid Konzentration relevant für die Bioverfügbarkeit von NO. Die Konzentration von Superoxid wiederum wird durch die Aktivität der Superoxiddismutase begrenzt. Studien haben gezeigt, dass unter Belastungstraining NO selbst die Expression der extrazellulären Superoxiddismutase von vaskulären, glatten Muskelzellen erhöht und somit die eigene Bioverfügbarkeit weiter steigert<sup>138</sup>.

Ein weiterer wichtiger Mediator ist die NADPH-Oxidase. Diese wird aktiviert durch Angiotensin II. Angiotensin II ist ein Peptidhormon mit einer Schlüsselfunktion im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System. Bei Patienten mit Herzinsuffizienz ist das RAAS überaktiv, dies führt durch eine erhöhte Angiotensin II Konzentration, direkt vermittelt über den Angiotensin-Rezeptor-Typ 1 zu verstärkter Vasokonstriktion der Gefäße sowie zu einer Aktivierung der NADPH-Oxidase und vermehrter ROS-Produktion. Training von Patienten mit HI verringert die Expression

der NADPH-Oxidase-Komplex Untereinheiten sowie deren enzymatische Aktivität signifikant, sodass weniger Superoxid-Anionen entstehen. Außerdem reduziert es die mRNA- und Protein-Expression des AT1-Rezeptors, dies verringert das Verhältnis von AT1- zu AT2-Rezeptoren, was wiederum die vasokonstriktive Wirkung von Angiotensin II reduziert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass beide Effekte, die vermehrte Expression der eNOS sowie der gesenkte Abbau von NO durch weniger reaktive Sauerstoffspezies ihren Anteil an einer erhöhten Bioverfügbarkeit von NO bei trainierten Patienten mit Herzinsuffizienz haben.

Verstärkte Angiogenese im Skelettmuskel ist ein schon lange bekannter und häufig nachgewiesener Effekt von regelmäßigem Belastungstraining bei gesunden Probanden. Die Versorgung der Muskulatur mit Sauerstoff wird gesteigert und die aerobe Ausdauerleistung verbessert. Vermittelt wird die Angiogenese unter anderem über den vascular endothelial growth factor (VEGF)<sup>139,140</sup>. Eine Steigerung der mRNA- und Protein-Expression von VEGF konnte auch bei Herzinsuffizienzpatienten nach reinem Krafttraining der Knieextension, sowie nach hochintensivem Intervalltraining (HIIT) festgestellt werden<sup>141,142</sup>. Das Verhältnis von Kapillaren zu Muskelfasern hingegen, konnte nur durch Ausdauertraining in Kombination mit Krafttraining signifikant gesteigert werden<sup>142</sup>.

### **2.3.2. Der Einfluss von Belastungstraining auf den inflammatorischen Status**

Der komplexe Zusammenhang zwischen Inflammation und Manifestation beziehungsweise Progression der DCM wurde unter Abschnitt 2.1.4 bereits beschrieben. Im folgenden Abschnitt soll auf den aktuellen Stand der Forschung eingegangen werden, inwiefern ein regelmäßiges Belastungstraining den inflammatorischen Status verändert, ob es einen Zusammenhang zwischen diesem veränderten Status und der Manifestation der DCM gibt und wie sich ein Belastungstraining auf die Myeloperoxidase auswirkt.

Serra et al. stellten den Zusammenhang von Inflammation, Training und negativem Myokard Remodeling tierexperimentell dar. Sie ließen Ratten 13 Wochen lang auf einem Laufband trainieren und behandelten sie ab der letzten Trainingswoche mit Isoprenalin, um über eine verstärkte  $\beta$ -Adrenorezeptor-Stimulation ein negatives Myokard Remodeling auszulösen.

Untrainierte Tiere, welche lediglich dem Isoprenalin ausgesetzt waren, entwickelten eine Myokardhypertrophie sowie eine deutliche diastolische Insuffizienz. Außerdem konnte eine signifikante Erhöhung der TNF- $\alpha$  und IL-6 mRNA-Expression im Myokard nachgewiesen werden. Bemerkenswerterweise waren die negativen Entwicklungen der kardialen Funktionsparameter bei den zuvor trainierten Tieren nicht zu beobachten und auch der Anstieg der pro-

inflammatorischen Zytokine blieb aus, das Training wirkte also präventiv auf das negative Remodeling<sup>143,144</sup>.

Der pathophysiologische Zusammenhang zwischen erhöhten pro-inflammatorischen Zytokin-Spiegeln und der Herzinsuffizienz wurde durch die Feststellung, dass Zytokine als katabole Faktoren im Kontext des peripheren Muskelabbaus und der kardialen Kachexie wirken, weiter spezifiziert<sup>145</sup>. Erhöhte TNF- $\alpha$  Werte konnten außerdem bei Patienten mit HI und verminderter peripherer Muskelkraft, gemessen an der Kraft des M. quadriceps femoris, festgestellt werden<sup>146</sup>.

Ein Grund für die lokal verstärkte Inflammation ist die wiederauftretende, zeitweise Hypoxie des Skelettmuskels, ausgelöst durch die Kombination aus vermindertem Herzzeitvolumen und endothelialer Dysfunktion<sup>147</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass zeitweise Hypoxie zu vermehrter Generierung reaktiver Sauerstoffspezies führt, welche wiederum die Expression pro-inflammatorische Zytokine induzieren<sup>148</sup>.

Gielen et al. untersuchten den systemischen und lokalen anti-inflammatorischen Effekt von sechsmonatigem, regelmäßigen Ausdauertraining auf Patienten mit HI. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der TNF- $\alpha$ -, Interleukin-1 und -6 Expressionen im Skelettmuskel der Patienten nach der Trainingsperiode, Serum-Zytokin-Spiegel hingegen blieben unverändert. Außerdem konnte eine Reduktion der iNOS-Expression im Skelettmuskel um 50% nachgewiesen werden, welche mit einer Reduktion der Nitrotyrosin-Konzentration, einherging. Die Studie legte nahe, dass die erhöhten Inflammationsmarker, welche bei fortgeschrittenen Herzinsuffizienzstadien nachzuweisen sind, zuerst lokal in der Peripherie und danach systemisch auftreten.

Mechanistisch konnte der anti-inflammatorische Effekt dadurch begründet werden, dass Belastungstraining zu einer verstärkten Expression antioxidativer Enzyme wie der Superoxiddismutase und der Gluthation-Peroxidase führt<sup>137</sup>. Diese Enzyme sind dazu in der Lage, die erhöhte ROS-Produktion abzufangen, was wiederum die lokale Produktion pro-inflammatorischer Zytokine senkt<sup>149</sup>.

Ein weiterer Effekt, der bereits beschriebenen erhöhten intrazellulären NO-Spiegel ist die Hemmung der Cytochrom-c-Oxidase (COX), einem wichtigen Enzymkomplex der mitochondrialen Atmungskette und somit Katalysator der Reduktion von Sauerstoff zu Wasser und dem Transport von Protonen<sup>150</sup>. Mitochondrien sind unter physiologischen Bedingungen verantwortlich für über 90% der zellulären ATP-Produktion der meisten Gewebe, dabei sind sie jedoch auch die Hauptquelle der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies<sup>151</sup>. Sauerstoff und NO kompetieren um dieselbe Bindungsstelle der COX. Erhöhte NO-Konzentrationen senken also den Sauerstoffverbrauch, verschiedene Studien haben daher die Vermutung nahegelegt, dass NO, durch Hemmung der COX Gewebe vor Hypoxie schützt. Andererseits wird durch die Hemmung der COX durch NO die ROS-Produktion gesteigert. Das durch die folgende

Reaktion von NO und Superoxid gebildete Peroxinitrit modifiziert Proteine der Mitochondrien und beschädigt das Fe-S-Zentrum<sup>152</sup>.

Eine klinische Studie zeigte, dass die Oberflächendichte der COX-positiven Mitochondrien bei Patienten mit HI um 45% reduziert ist und somit die oxidative Kapazität des Skelettmuskels einschränkt<sup>153</sup>. Die Ursache für diese Tatsache ist noch nicht abschließend geklärt, ein möglicher Mechanismus ist die bereits erwähnte Hemmung der COX durch NO, welches durch die bei Patienten mit HI ebenfalls verstärkt exprimiert iNOS generiert wird<sup>150</sup>.

Sechsmonatiges Training von führt zu einer Erhöhung der COX-Aktivität im Skelettmuskel um 27%. Die Steigerung war negativ korreliert mit der iNOS-Expression und Protein-Konzentration<sup>154</sup>. Dies zeigt also den Zusammenhang, dass Training über die verminderte iNOS-Konzentration zu verminderter intrazellulärer NO-Konzentration führt, dies resultiert wiederum in einer verminderten Hemmung der COX und einer gesteigerten oxidativen Kapazität des Skelettmuskels.

Die Feststellung, dass der Anstieg der lokalen Expression pro-inflammatorischer Zytokine dem systemischen Anstieg voraus geht, könnte dadurch begründet werden, dass lokale Faktoren wie Hypoperfusion und oxidativer Stress der initiale pro-inflammatorische Stimulus sind. Die Tatsachen, dass Belastungstraining nachweislich in der Lage ist diesen Stimulus zu minimieren und eine, vor allem lokal anti-inflammatorische Wirkung ausübt zusammen mit der Feststellung, dass erhöhte pro-inflammatorische Zytokinspiegel mit einem negativen Outcome bei DCM-Patienten korrelieren, unterstreicht die Relevanz des in dieser Arbeit untersuchten Themas.

Wichtig bei der Betrachtung der Myeloperoxidase in Bezug auf Training ist zum einen die Unterscheidung der MPO-Spiegel in verschiedenen Geweben, unter anderem Kardiomyozyten, Skelettmuskelzellen und Plasma sowie die unterschiedlichen Effekte von einmaliger, intensiver Belastung und regelmäßigem Ausdauertraining über einen längeren Zeitraum hinweg auf diese MPO-Spiegel.

Eine klinische Studie zeigte eine Verringerung der Plasma-MPO-Konzentration nach 12-wöchigem Ausdauertraining um 28,5  $\pm$  7,5%. Diese Veränderung war negativ korreliert mit der Erhöhung der Konzentration des cyclischen Guanosinmonophosphats (cGMP), welche repräsentativ für die vaskuläre NO-Bioverfügbarkeit gemessen wurde<sup>155</sup>.

Belastungstraining reduziert außerdem die Konzentration des Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktors (GM-CSF), einem Wachstumsfaktor, der die Differenzierung und Proliferation myeloischer Progenitorzellen fördert. Weitere Effekte von GM-CSF sind die Regulation der Leukozyten Adhäsion, Generierung von Superoxid-Anionen und Induktion der Zytokin-Produktion. Außerdem senkt Training die Konzentration des Zytokins MCP-1 welches Leukozyten anlockt und die Expression der Adhäsionsmoleküle sICAM-1 und sVCAM-1

welche auf aktivierten Endothelzellen exprimiert werden nach Monozyten-Endothelzell-Interaktion<sup>156</sup>.

## **2.4 Fragestellungen und Ziel der Arbeit**

Die Fragestellung und somit Ziele dieser Arbeit sind in zwei große Unterpunkte zu unterteilen. Zum einen geht es darum, eine mögliche Rolle der Myeloperoxidase in Bezug auf die Belastungsintoleranz, die im Rahmen der dilatativen Kardiomyopathie besteht zu untersuchen. Insbesondere geht es darum, die Bedeutung der Myeloperoxidase in Bezug auf den bei der DCM vorliegenden erhöhten inflammatorischen Status im Bereich der Skelettmuskulatur zu untersuchen und mögliche damit verknüpfte Veränderungen, wie eine verminderte Angiogenese oder Beeinträchtigung der Mitochondrienfunktion in einem genetischen Modell der DCM zu charakterisieren.

Der zweite Unterpunkt beruht auf der Tatsache, dass regelmäßiges moderates Belastungstraining nicht nur die eingeschränkte Belastungsfähigkeit von Patienten und ihre kardiale Funktion verbessert sowie ihre Lebenszeit verlängert, sondern auch anti-inflammatorisch wirkt. Es ergibt sich somit die Fragestellung, ob die unter anderem pro-inflammatorisch wirkende Myeloperoxidase durch Training in ihrer Konzentration beeinflusst werden kann und welche weiteren Veränderungen sich daraus im Bereich der Skelettmuskulatur ergeben.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1. Reagenzien und Arzneistoffe

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Argatra	accord
3-Amino-9-Ethyl-Carbazol (AEC)	Sigma
Alkohol 70%/80%/90%	Th. Geyer
Ampuwa	Merck
Dako Pen	Sigma
Dako-Einbettmedium	Sigma
Eindeckmittel für Fluoreszenzfärbungen	Dako Fluorescence Mounting Medium
Formalin	Thermo Scientific (16%-ige L.sung)
Hämalaun-Lösung nach Meyer	Sigma
Heparin	accord
Isofluran	Linde (CONOXIA GO2X)
PBS	Life Technologies Limited
Tetramethylbenzidin	Sigma
Triton X-100	Sigma Life Sciences
Ziegenserum	Sigma

##### 3.1.2. Puffer und Lösungen

<i>Bezeichnung</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Homogenisierungslösung	20ml Standart-Homogenisierungspuffer, 100µl Triton X-100, 2 Tablette PhosStop Roche, 200µl Heparin (5000/ml)
Blockierlösung Immunhistochemie	200µl GS, 200µl BSA, 1600µl TBS
Homogenisierungspuffer	0,121g Tris HCL, 4,28g Saccharose, 0,057g EGTA, 0,292g EDTA

### 3.1.3. Antikörper

Primäre Antikörper	Spezifität	Spezies des Spendertiers	Hersteller
CD31	monoklonal	Ratte	BD Bioscience
MPO	monoklonal	Hase	Calbiochem

Sekundäre Antikörper	Konjugat	Spezies des Spendertiers	Hersteller
Alexa Fluor 488 anti-rabbit	Alexa Fluor 488	Ziege	BioLegend
IgG, anti-rat	Meerrettichperoxidase	Ziege	Nichirei Histofine Simple Stain

### 3.1.4. Reaktionskits

Bezeichnung	Hersteller
Precellys Lysing Kit	Qiagen
BCA Assay Kit	Qiagen
MPO ELISA, Maus	Hycult Biotech
Rneasy Mini Kit	Qiagen
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen
QuantiTect PCR Kit	Qiagen

## 3.2 Methoden

### 3.2.1. Arbeiten und Umgang mit Versuchstieren

Alle tierexperimentellen Versuche wurden unter dem Versuchsantrag 2017.A464 durchgeführt und durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) genehmigt.

Verwendete Mauslinien:

Wildtyp (WT)	MLP-WT Nachkommen
MLP <sup>-/-</sup>	Muscle LIM Protein defiziente Maus <sup>105</sup>
MLP <sup>-/-</sup> /MPO <sup>-/-</sup>	Muscle LIM Protein/Myeloperoxidase-defiziente Maus
MPO <sup>-/-</sup>	MLP <sup>+/+</sup> /MPO <sup>-/-</sup> -Nachkommen

Die Tiere wurden mit einem Alter von 9 Wochen (Trainingskohorte) beziehungsweise 14 Wochen (Vergleichskohorte) aus dem Zentrum für Molekulare Medizin (ZMMK) der Uniklinik Köln exportiert, es wurden ausschließlich männliche Tiere verwendet und maximal fünf Tiere pro Käfig gehalten. Nach dem Export wurden die Tiere sieben Tage lang an einen inversen Lichtzyklus mit 12:12h Tag/Nacht Rhythmus gewöhnt. Dies sollte sicherstellen, dass die Tiere sich während der Laufbandversuche in ihrer aktiven Phase befinden. Die Temperatur betrug 20-24°C bei einer Luftfeuchtigkeit von 50-70%.

### **3.2.2. Laufband**

Das für diese Arbeit verwendete Laufband (Panlab/Harvard Apparatus) ist ein Trainingsgerät speziell für Mäuse mit fünf getrennten Laufbahnen. Am Anfang jeder Bahn befindet sich die Erschöpfungszone. Fällt eine Maus in diese Zone zurück löst sie dadurch einen kurzen Luftstoß aus, durch welchen sie zum Weiterlaufen angeregt wird.

Die Mäuse wurden durch eine dreitägige Adaptationsphase an das Gerät gewöhnt. Zu Beginn jeder Eingewöhnung wurden sie drei Minuten auf ihre Bahn gesetzt, ohne dass das Laufband sich bewegt. Am ersten Tag folgt dann ein 20-minütiger Lauf mit einer sich kontinuierlich steigenden Geschwindigkeit von 8 auf 12 cm pro Sekunde. Am zweiten Tag liefen die Mäuse 25 Minuten lang zwischen 10 und 14 cm pro Sekunde und am letzten Tag 30 Minuten zwischen 12 und 16 cm pro Sekunde. Am vierten Tag folgt dann der Belastungstest. Bei diesem wurde die Geschwindigkeit des Laufbandes, beginnend mit einer Aufwärmphase von 5 Minuten bei 10 cm/s, kontinuierlich gesteigert bis eine Maus die Stopp Konditionen erfüllt. Diese waren entweder erfüllt, sobald die Maus länger als 5s in der Ruhezone sitzen blieb, oder wenn sie in 3 aufeinander folgenden Minuten mehr als 10-mal pro Minute die Erschöpfungszone erreicht hatte. Der zweite Punkt soll verhindern, dass sehr lange Laufzeiten erreicht werden, obwohl die Maus nicht mehr kontinuierlich läuft, sondern nur von der Erschöpfungszone nach vorne rennt und wieder zurück zur Erschöpfungszone befördert wird<sup>157</sup>.

Die Vergleichskohorte nahm lediglich an der Adaptation und dem Belastungstest teil. Die Trainingskohorte startete nach dem oben beschriebenen Programm das Training. Der auf den Belastungstest folgende Tag war der zweite Tag der ersten Trainingswoche, wobei die Mäuse in der ersten Woche insgesamt 30 Minuten pro Tag liefen, in der zweiten 40, in der dritten 50 und in der vierten 60 Minuten. Das Training fand an 5 aufeinanderfolgenden Tagen pro Woche statt. Die Geschwindigkeit des Laufbands während der Trainingstage wurde individuell für jede Maus bestimmt, sie lag bei 65% der während des Belastungstest am Anfang der Woche maximal erreichten Geschwindigkeit<sup>158</sup>. In Studien konnte gezeigt werden, dass bei 65% der maximal möglichen Geschwindigkeit die Tiere ein moderates Ausdauertraining durchführen, welches vor allem aus aerober Muskelarbeit besteht<sup>158</sup>.

Tiere, die am dritten und letzten Tag der Adaptation noch unverhältnismäßig oft in der Erschöpfungszone waren und somit Luftstöße auslösten, wurden von dem Versuch ausgeschlossen.

### **3.2.3. Echokardiographie**

Die transthorakale Echokardiographie wurde unter kontinuierlicher Isofluran Narkose (2%) mit Hilfe des Vevo 3100 Systems (VisualSonics, Toronto, Canada) durchgeführt, dafür wurde die Maus auf einer Wärmeplatte in Rückenlage fixiert. Unter kontinuierlicher Überwachung der Vitalparameter erfolgten parasternale Längs- und Querschnittaufnahmen in B-Mode, M-Mode, pulsed-wave- und tissue-Doppler. Die Auswertung erfolgte verblindet mithilfe der Software Vevo Lab v5 (VisualSonics).

### **3.2.4. Organentnahme und Bestimmung der peripheren MPO-Konzentration**

30 Minuten vor Beginn der Narkose wurde der Maus zunächst das Analgetikum Buprenorphin in einer Konzentration von 100µl pro 10g Körpergewicht subkutan gespritzt. Dann folgte die Narkoseeinleitung in einer Narkosekammer mittels Isofluran (initial 5%). Die Maus wurde auf einer Wärmeplatte befestigt und mit einer Erhaltungsdosis von 2% Isofluran weiterhin in Narkose gehalten. Sobald keine Reaktion auf einen Schmerzreiz (Toe pinch Reflex) mehr zu erkennen war, wurde der Maus Argatra in einer Konzentration von 35mg pro kg Körpergewicht intraperitoneal gespritzt. Nach weiteren 10 Minuten Wartezeit beginnt die eigentliche Organentnahme. Das Peritoneum wurde kurz unterhalb des Rippenbogens quer eröffnet. Durch das Zwerchfell hindurch wurde der linke Ventrikel mit einer 1ml Spritze punktiert und es wurden 0,8ml Blut abgenommen. Das Blut wurde direkt in ein Heparinröhrchen überführt, 10 Minuten lang bei 4,4g zentrifugiert und der Überstand bei -80°C gelagert. Nun erfolgte die Eröffnung des Zwerchfells auf der gesamten Breite, sowie des Brustkorbes lateral auf beiden Seiten und die Fixierung mithilfe von zwei kleinen, gebogenen Klemmchen nach oben und unten hin. Zur Gewinnung der Perfusate, welche der Bestimmung der peripheren MPO-Konzentration (also des an den Endothelzellen der peripheren Gefäße anhaftenden MPOs) dient, wurde zunächst ein Perfusor mit reinem PBS vorbereitet. Der linke Ventrikel wurde mit einem Butterfly punktiert und der Perfusor gestartet. Der rechte Vorhof wurde mit einer spitzen Schere eröffnet, sodass das kontinuierlich insgesamt 10ml PBS aus dem Blutkreislauf durch den rechten Vorhof ausgespült wurde. Anschließend wurden beide Lungenflügel direkt am Hilus abgetrennt und entfernt und der Thorax wurde mit 5ml PBS gründlichen von allem restlichen Blut gereinigt und anschließend trocken getupft. Es folgte die Perfusion mit 3ml der zweiten Perfusionslösung welche aus 3ml PBS und 0,03ml Heparin (PBS + 50 EI/1ml Heparin = 0,2 ml Heparin pro 20ml PBS) besteht. Das Perfusat durchfließt beginnend am linken Vorhof einmal den kompletten Blutkreislauf und durch das enthaltene Heparin löst sich das an der Endothelwand

gebundene MPO. Anschließend wurde die aus dem rechten Vorhof austretende Flüssigkeit mit einer 2ml Spritze kontinuierlich aufgefangen, direkt im Anschluss 4 Minuten lang bei 5g zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abpipettiert, auf zwei 1,5ml Eppis aufgeteilt und bei -80°C gelagert.

Nun erfolgte die Entnahme des Musculus soleus und gastrocnemius des rechten Hinterlaufes der Maus. Hierzu wurde die Haut des Unterschenkels ab präpariert, die Achillessehne durchtrennt und der Musculus gastrocnemius nach kranial gezogen. Aufliegend auf dem M. gastrocnemius stellt sich so der M. soleus dar, welcher in ganzer Länge entnommen, in der Mitte durchtrennt und in Cryomedium eingebettet wurde. Anschließend wurde der M. gastrocnemius ebenfalls in ganzer Länge entnommen, in drei Teile zerteilt und bei -80°C gelagert.

### **3.2.5. Bestimmung der MPO-Plasmakonzentration**

Das entnommene Plasma wurde auf Eis aufgetaut und anschließend für 15 Minuten bei 5,1 rpm zentrifugiert, um ganz sicher zu gehen, dass keine Zellreste mehr vorhanden sind. Es wurden 60µl des Überstandes abpipettiert und mit 180µl Probenpuffer verdünnt. Die Bestimmung der MPO-Konzentration erfolgte mittels Hycult Biotech ELISA KIT nach Angaben des Herstellers:

Die Probe wurde zusammen mit dem Standard auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen, auf der bereits der monoklonale Maus MPO-Antikörper immobilisiert war. Während der einstündigen Inkubationszeit bindet das in der Probe vorhandene MPO an den Antikörper. Anschließend wurde die Platte mehrfach mit einem vorgesehenen Puffer gewaschen, um die nicht gebundene Probe zu entfernen. Im nächsten Schritt wurde ein biotinylierter MPO-Antikörper auf die Titerplatte aufgetragen welcher ebenfalls an das nun gebundene MPO bindet. Nach erneuter Inkubationszeit und Waschung folgte das Auftragen der Streptavidin-Peroxidase welche wiederum an den biotinylierten Antikörper bindet, gefolgt von erneutem Inkubieren und Waschen. Das nun aufgetragene Tetramethylbenzidin (TMB) reagiert mit der Streptavidin-Peroxidase und entwickelt dabei eine blaue Farbe. Die Reaktion wurde für 30 Minuten unter Lichtschutz zugelassen und anschließend durch das Auftragen der Stop-Lösung, genauer gesagt durch die darin enthaltene Oxalsäure gestoppt, wobei ein Farbumschlag nach gelb stattfand. Die Intensität der Färbung der einzelnen Proben wurde durch Messung der Absorption bei 450 und 560nm bestimmt. Mit den gemessenen Werten des Standards wurde eine Standardkurve ( $x$ = Konzentration,  $y$ =Absorption) erstellt und mit ihrer Hilfe die MPO-Konzentration der einzelnen Proben bestimmt.

### **3.2.6. Bestimmung der peripheren MPO-Konzentration**

Die während der Organentnahme gewonnenen Perfusate wurden für 24 Stunden bei 45°C evaporiert bis alle Flüssigkeit verdampft war. Anschließend wurden die Eppis mit jeweils 200µl

Ampuwa aufgefüllt und geschüttelt, bis sich die gesamte feste Substanz gelöst hatte. Zur MPO-Konzentrationsbestimmung wurden die Proben mit 40µl Probenpuffer verdünnt und auf die gleiche Art und Weise wie die Plasma-Proben mithilfe des ELISA KIT weiterverarbeitet.

### **3.2.7. CD31 Färbung der M. soleus Querschnitte**

Aus den in Cryomedium gebetteten Hälften den M. soleus wurden mittels Kryotom 4µm dicke Schnitte angefertigt, sodass sich auf jedem Objektträger zwei Schnitte mit jeweils zwei Anschnitten des M. soleus befanden. Das folgende Protokoll diente der Anfärbung der Kapillaren, die die einzelnen Muskelfasern umgeben mit Hilfe des CD31-Antikörpers. CD31 ist ein Thrombozyten-Endothelzell-Adhäsionsmolekül, auch bekannt als PECAM-1 und ist auf der Oberfläche von Endothelzellen zu finden.

Die Objektträger wurden 5 Minuten lang bei Raumtemperatur aufgetaut und die Schnitte mit einem Dako Pen umkreist. Nach 15-minütiger Fixierung mit 4% Formaldehyd wurde dreimal 3 Minuten lang mit 300µl TBS pro Schnitt gewaschen.

Zur Reduktion der Hintergrundfärbung erfolgte ein Peroxidase-Block mit TBS und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (125µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 50ml TBS) für 15 Minuten, gefolgt von einem weiteren Waschschrift mit TBS. Nun wurde jeder Schnitt mit 100µl einer Lösung aus 10% Ziegen Serum, 1%BSA und TBS (200µl GS, 200µl BSA, 1600µl TBS) geblockt, um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu vermeiden. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurde die Lösung abgeklopft und alle Flüssigkeitsreste mit einer Vakuum Pumpe entfernt. Nun folgen die eigentlichen Färbeschritte: Die Schnitte wurden über Nacht mit dem Primärantikörper CD31 (BD, Host=rat), 1:100 verdünnt in der oben beschriebene Blockierlösung (Ziegen Serum, BSA, TBS) bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBS folgt die Inkubation mit anti-rat Meerrettichperoxidase (Nichirei Histofine Simple Stain) für eine Stunde. Es folgt erneut ein Waschschrift, anschließend wurde zur Farbentwicklung das Meerrettichperoxidase Substrat 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol (AEC) aufgetragen (Ready to use KIT). Unter dem Mikroskop wurde die Farbentwicklung beobachtet und nach 5 Minuten durch zweimaliges Waschen in VE-Wasser gestoppt. Nun wurde das Gewebe mittels Hämalun-Lösung nach Meyer für 1 Minute gegen gefärbt. Die Färbung wurde durch 5-minütiges Spülen unter laufendem Leitungswasser beendet. Die Schnitte wurden mithilfe von Dako-Einbettmedium von einem Deckglas bedeckt, 30 Minuten getrocknet und anschließend in 40facher Vergrößerung unter dem Mikroskop fotografiert.

Zur Auswertung wurden 10 Bilder pro Objektträger in der 40fachen Vergrößerung zufällig ausgewählt und verblindet ausgewertet. Hierzu wurden die auf dem Bild abgebildeten Muskelfaserquerschnitte und anschließend die Zahl an angeschnittenen und angefärbten Kapillaren gezählt, und die Kapillardichte pro Muskelfaser errechnet.

### 3.2.8. Arbeiten mit RNA

Für die Isolation der RNA aus dem Gewebe des *M. gastrocnemius* wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen) verwendet, das in dem beigefügten Protokoll beschriebene Vorgehen wurde genau befolgt.

Zunächst wurde von jedem Muskel eine Gewebeprobe von 25mg abgewogen und homogenisiert. Hierzu wurde das Precellys Lysing Kit (Qiagen) verwendet. Die Gewebeprobe wurde zusammen mit 600µl RLT Puffer (1ml RLT Puffer + 10µl β-mercaptoethanol) in die entsprechenden Röhrchen gegeben und 3-mal für 20 Sekunden in dem Tissue Lyser homogenisiert. Nach 3 Minuten zentrifugieren bei 14000rpm wurden 500µl des Überstandes abpipettiert und mit 500µl 70% Ethanol vermischt. 350µl der so entstandenen Probe wurden in eine RNeasy Mini spin Säule, welche in einem 2ml Auffangröhrchen stand, gegeben. Anschließend wurde 1 Minute lang bei 14000 rpm zentrifugiert, hierbei bindet die RNA, unterstützt durch das Ethanol an die Membran in der Säule. Dieser Schritt wurde mit den restlichen 350µl der Probe wiederholt, um eine maximale RNA-Konzentration zu gewinnen. Das erste Auffangröhrchen wurde mitsamt Inhalt verworfen und die Säule, welche die RNA enthält in einem neuen zweiten platziert. Es folgten einige Waschschriffe, während derer die Membran von allen unerwünschten Verunreinigungen wie Proteine und Zellreste gesäubert wurde. Hierzu wurden 700µl RW1 hinzugefügt und wie im Schritt zuvor zentrifugiert. Dasselbe Vorgehen wurde zweimal mit 500µl RPE Puffer wiederholt, anschließend wurde 3 Minuten lang ohne Puffer zentrifugiert, um die Membran zu trocknen. Im nächsten Schritt wurde die Säule in einem 1,5ml Röhrchen platziert und es wurde zweimal mit je 30µl RNase freiem Wasser zentrifugiert, um die RNA aus der Membrane zu lösen.

Direkt im Anschluss an die RNA Isolation wurde eine Bestimmung der RNA-Konzentration mittels Photometer durchgeführt. Die Absorption wurde bei 260nm gemessen. Mithilfe des Extinktionskoeffizienten, abgeleitet von dem Lambert-Beerschen-Gesetz, für RNA: 40 ng-cm/µl konnte die RNA-Konzentration bestimmt werden. Durch Messung der Absorption bei 280nm und Berechnung des Quotienten  $A_{260}/A_{280}$  konnte die Reinheit der RNA dargestellt werden.

Um die gewonnene RNA weiter untersuchen zu können wurde sie in die komplementäre DNS (cDNA) umgeschrieben. Hierzu wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) verwendet, das beigefügt Protokoll wurde genau befolgt.

Der erste Schritt dient der Elimination jeglicher noch vorhandener DNA, welche in der später folgenden q-PCR die Ergebnisse verfälschen könnte.

Hierzu wurden die gewonnenen Proben mit dem gDNA Wipeout Puffer und RNase freiem Wasser in unterschiedlichen Mengenverhältnissen vermischt. Für alle Proben, bei denen die RNA-Konzentrationen über 50ng/µl betrug, wurden folgenden Mengen verwendet: 12µl der RNA-Probe, 6µl RNase freies Wasser und 3µl Puffer. Proben mit einer RNA-Konzentration

unter 50ng/μl wurden lediglich mit 3μl Puffer, ohne die Zugabe von Wasser vermischt. Die Proben wurden anschließend 2 Minuten lang bei 42°C inkubiert und direkt auf Eis gestellt.

Nun wurde der Reverse-Transkriptase Mastermix erstellt (1μl Quantiscript Reverse Transkriptase, 4μl Quantiscript RT Puffer und 1μl RT Primer Mix), dieser enthält alle Komponenten, die zur Synthetisierung der cDNA benötigt werden, mit Ausnahme der RNA-Probe. 14μl der RNA-Puffer Mischung wurden im folgenden Schritt mit 6μl des Reverse-Transkriptase Mastermix vermischt und nach folgendem Schema inkubiert:

42°C	15 Minuten
95°C	3 Minuten
-20°C	Aufbewahrung bis zur Weiterverarbeitung mittels q-PCR

Die Real Time Quantitative PCR (q-PCR) ist eine Methode, bei der die Menge an cDNA die in einer Probe vorhanden ist mit Hilfe spezifischer Primer quantifiziert werden kann. Die Amplifikation, der zu dem ausgewählten Primern gehörigen Zielsequenz kann durch Zugabe eines spezifisch an doppelsträngige DNA Abschnitte bindenden Farbstoffes sichtbar gemacht werden. Durch Bindung des Farbstoffes erhöht sich dessen Fluoreszenzaktivität, diese Aktivität ist proportional zu der Konzentration der vorhandenen dsDNA in der Probe und sie wird nach jedem Amplifikationszyklus gemessen.

Für diese PCR wurde das QuantiTect RT-PCR Kit (Qiagen) genutzt, welches den SYBR Green I Farbstoff enthält.

Das Pipettierschema der q-PCR sieht wie folgt aus:

5μl 2xGoTaq qPCR Master Mix
1μl 100pmol forward primer
1μl 100pmol reverse primer
0,1μl 30μM CXR Reference Dye
0,9μl Aqua dest.

Das Schema der qPCR wurde wie folgt programmiert:

95°C	2 Minuten	
95°C	15 Sekunden	40 Zyklen
60°C	1 Minute	40 Zyklen
60-90°C	Dissoziationskurve	

### 3.2.9. Statistik

Die Daten wurden mit Hilfe des Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung geprüft. Es erwiesen sich alle generierten Daten als normal verteilt. Die Ergebnisse werden präsentiert als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Dabei wird als statistisches Verfahren zur Ermittlung

der Signifikanz die Varianzanalyse (ANOVA) mit einem LSD Post-hoc-Test verwendet. Ist dabei  $p \leq 0,05$  wird von einer Signifikanz ausgegangen und dies wird in den Abbildungen mit \* gekennzeichnet. Ist  $p \leq 0,01$  wird dies mit \*\* gekennzeichnet. Bei einem p-Wert von  $\leq 0,001$  wird die Signifikanz mit \*\*\* dargestellt, bei p-Wert von  $\leq 0,0001$  \*\*\*\*.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Laufbandbelastungstests**

#### **4.1.1. Auswirkungen des Mlp-Knockouts und der MPO-Defizienz auf die Belastungsfähigkeit**

Eines der charakteristischen Merkmale der dilatativen Kardiomyopathie ist die Belastungstoleranz der Patienten. Um dieses Merkmal auch bezogen auf das murine Modell der DCM zu etablieren, wurden Belastungstests mit Mlp-KO und WT Tieren auf einem Laufband durchgeführt. Mit 11-15 Wochen ist der kardiale Phänotyp der Mlp-KO Tiere bereits vollständig ausgeprägt, daher ist dieses Alter ideal um ihre Belastungsfähigkeit, dargestellt durch die maximal erreichte Laufzeit im Belastungstest, zu untersuchen. Vor Durchführung des Belastungstest fand eine dreitägige Eingewöhnung der Tiere an das Gerät statt. Am vierten Tag folgte der Belastungstest. Bei diesem wurde die Geschwindigkeit des Laufbandes, beginnend mit einer Aufwärmphase von 5 Minuten bei 10 cm/s, kontinuierlich gesteigert bis eine Maus die Stoppkonditionen erfüllt. Diese waren entweder erfüllt, sobald die Maus länger als fünf Sekunden in der Erschöpfungszone am Ende des Laufbandes sitzen bleibt, oder wenn sie in drei aufeinander folgenden Minuten mehr als 10-mal pro Minute die Erschöpfungszone erreicht.

Die Mlp-KO Tiere erreichten eine signifikant niedrigere Laufzeit als die WT Tiere (Mlp-KO vs WT:  $21,33 \pm 1,49$  Minuten vs  $25,82 \pm 1,38$  Minuten ( $p=0,0147$ )).

Da sich diese Arbeit mit einem möglichen therapeutischen Effekt einer MPO-Defizienz auf die dilatative Kardiomyopathie befasst, sollte außerdem überprüft werden, inwiefern ein zusätzlicher Mpo-Knockout Einfluss auf die Belastungsfähigkeit der Mlp-KO Tiere hat. Bei den DKO Tieren war jedoch keine signifikante Veränderung der Laufzeit nach einmaligem Belastungstest nachzuweisen (Laufzeit der DKO Tiere:  $22,39 \pm 0,89$  Minuten,  $p=0.5535$ ) (Abb. 2A).

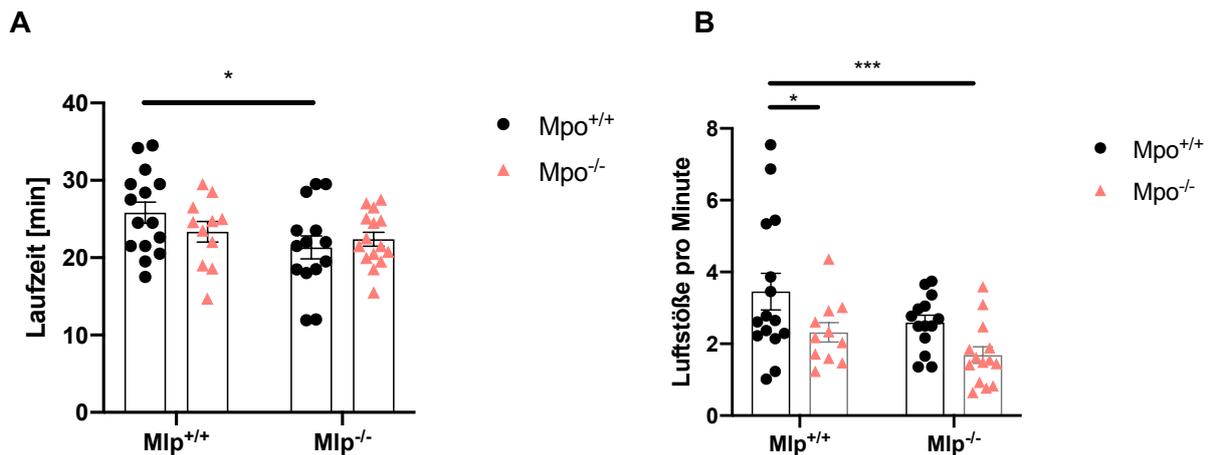


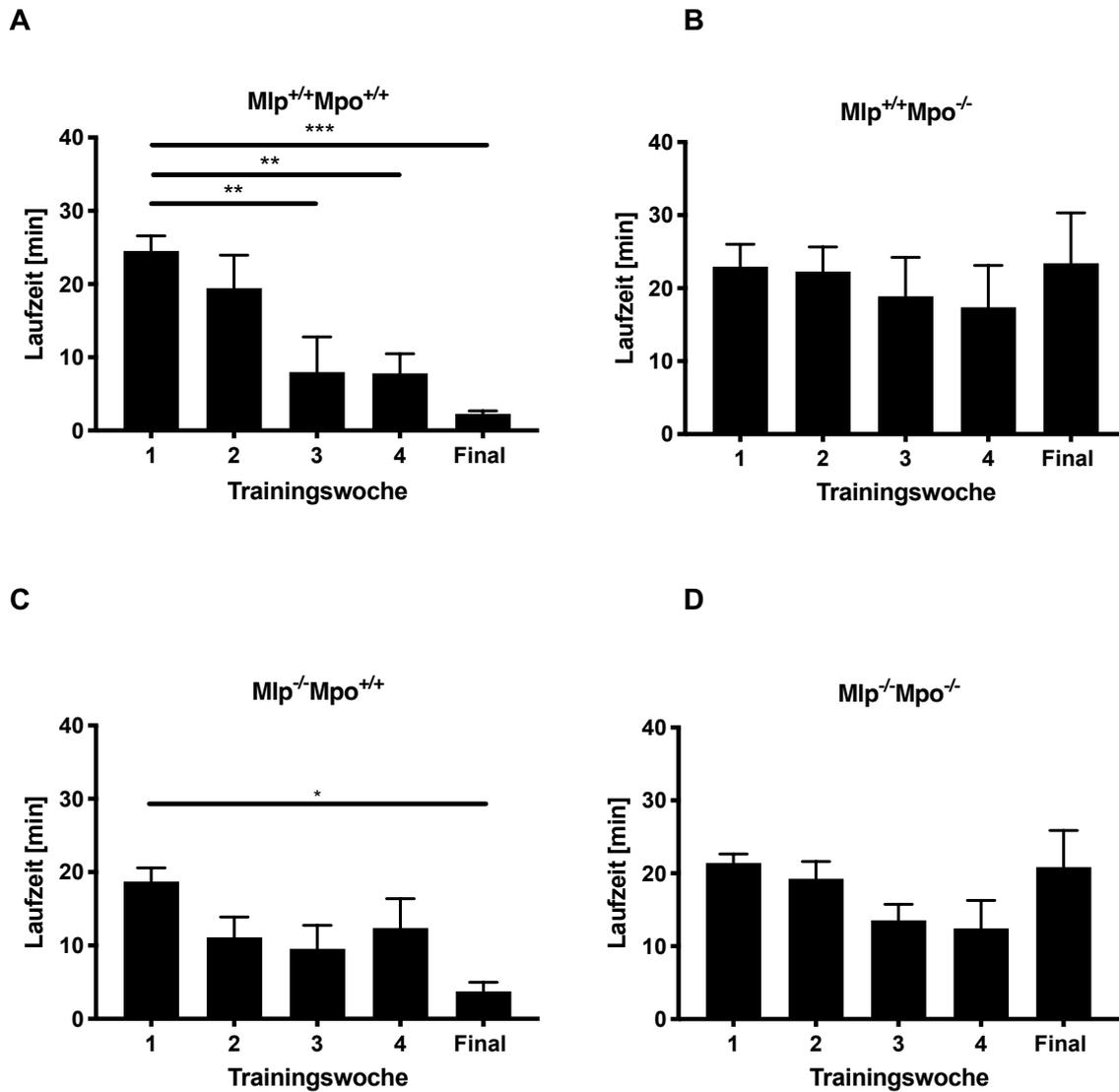
Abb. 2: **Laufband Belastungstests untrainierter Tiere.**

(A) Erreichte Laufzeit während des einmaligen Belastungstests. (B) Luftstöße pro Minute die während des Belastungstests der jeweiligen Tiere ausgelöst wurden. n=16,11,14,15; Mittelwert ± SEM; \*=p<0.05, \*\*\*=p<0.001; Alter 11-15 Wochen

Es waren deutliche Unterschiede im Laufverhalten der Versuchsgruppen zu verzeichnen. Die Mpo-KO Tiere, ob mit oder ohne zusätzlichem Mlp-KO haben signifikant weniger Luftstöße pro Minute ausgelöst als die MPO kompetenten WT Tiere (Mpo-KO vs WT p=0.0276 und DKO vs WT p=0.0004), ohne dabei eines der Stopp-Kriterien des Belastungstests zu erfüllen, was auf ein inkonstantes Laufverhalten hinweisen kann (Abb. 2B).

#### 4.1.2. Die Entwicklung der Belastungsfähigkeit durch vierwöchiges Training

Um den Einfluss des Belastungstrainings auf die Entwicklung der dilatativen Kardiomyopathie zu untersuchen und einen möglichen protektiven Einfluss der MPO-Defizienz darzustellen, wurden die Tiere vier Wochen lang, fünfmal pro Woche mit steigender Intensität auf einem Laufband trainiert. In der ersten Woche liefen die Tiere jeweils 30 Minuten pro Tag, in der zweiten 40, in der dritten 50 und in der vierten 60 Minuten. Das Training fand an fünf aufeinanderfolgenden Tagen pro Woche statt. Vor Beginn des Trainings, am Ende jeder Trainingswoche, sowie nach Abschluss des Trainings wurde der standardisierte Belastungstest durchgeführt. Die Geschwindigkeit des Laufbands während der Trainingstage wurde individuell für jede Maus bestimmt, sie lag bei 65% der während des Belastungstest am Anfang der Woche maximal erreichten Geschwindigkeit des Tieres<sup>158</sup>.



**Abb. 3: Entwicklung der Belastungsfähigkeit während der Trainingsperiode.**

Laufzeiten wurden bestimmt durch Belastungstests zu Beginn jeder neuen (1-4), sowie nach Abschluss der letzten Trainingswoche (Final). **(A)** Laufzeiten der WT Tiere; n= 8,8,8,8 **(B)** Laufzeiten der Mpo-KO Tiere; n=4,4,4,4 **(C)** Laufzeiten der Mlp-KO Tiere; n=7,7,7,7 **(D)** Laufzeiten der DKO Tiere; n=8,8,8,8; Mittelwert  $\pm$  SEM; \*= $p < 0.05$ ; \*\*= $p < 0.01$ ; \*\*\*= $p < 0.001$ ; Alter: 11-15 Wochen

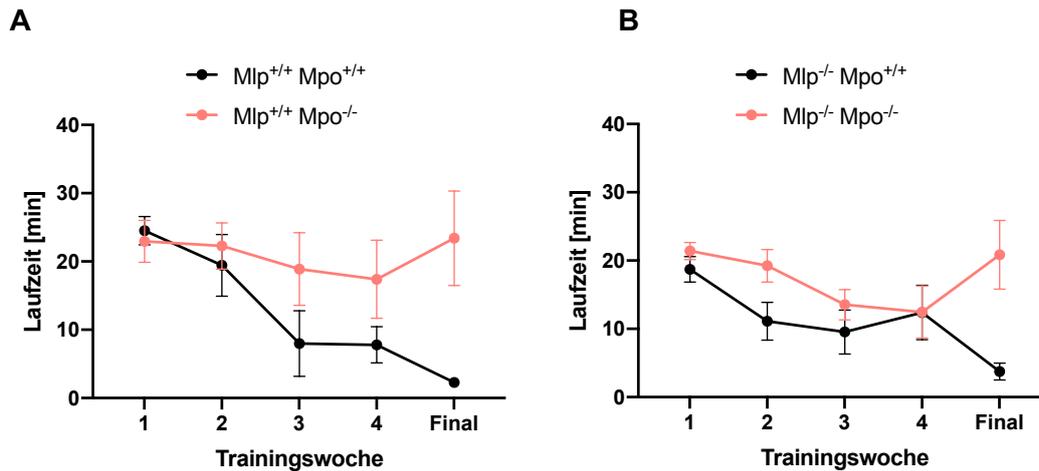


Abb. 4: Entwicklung der Belastungsfähigkeit während der Trainingsperiode im direkten Vergleich mit bzw. in Abwesenheit von MPO.

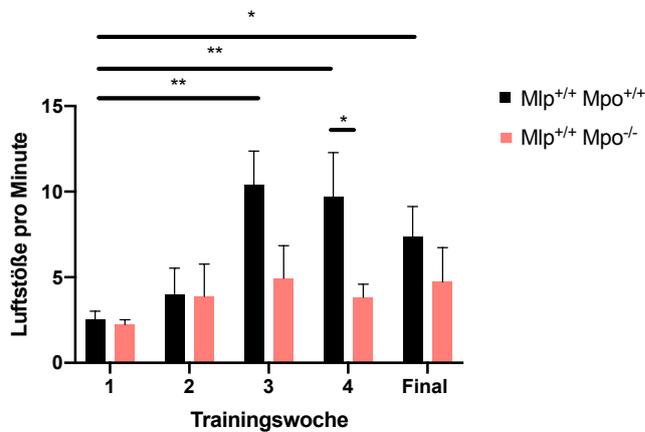
Laufzeiten wurden bestimmt durch Belastungstests zu Beginn jeder neuen (1-4), sowie nach Abschluss der letzten Trainingswoche (Final). **(A)** Entwicklung der Laufzeiten MLP kompetenter Tiere, mit und ohne MPO-Defizienz **(B)** Entwicklung der Laufzeiten von Mlp-KO Tieren, mit und ohne MPO-Defizienz; Mittelwert  $\pm$  SEM; Alter: 11-15 Wochen

Die Belastungstests zeigten eine beinahe konstante Verringerung der Belastbarkeit der Mlp-KO Tiere über die gesamte Trainingsperiode hinweg. Die vor dem ersten Training im Belastungstest erreichte Laufzeit von durchschnittlich  $18,71 \pm 1,86$  Minuten betrug nach Abschluss des Trainings lediglich  $3,76 \pm 1,23$  Minuten. Interessanterweise waren die Mlp-KO Tiere in Abwesenheit von MPO dazu in der Lage, ihre anfänglich erreichte Laufzeit zumindest zu halten (Laufzeit Woche 1:  $21,4 \pm 1,26$  Minuten vs Laufzeit Final:  $20,86 \pm 5,03$  Minuten).

Belastungstests von MLP kompetenten WT Tieren zeigten die gleichen Verhältnisse: Die vor dem Training bestimmte Laufzeit betrug im Durchschnitt  $24,5 \pm 2,07$  Minuten und lediglich  $2,3 \pm 0,38$  Minuten nach Abschluss der Trainingsperiode. Bei MPO-Defizienz zeigte sich eine deutlich konstantere Entwicklung der Laufzeit, mit leichter Verschlechterung während der 3. und 4. Trainingswoche, aber, genau wie bei dem DKO Tieren, beinahe gleichem finalen wie ursprünglichen Ergebnis (Laufzeit Woche 1:  $22,95 \pm 3,06$  Minuten vs Final:  $23,4 \pm 6,9$  Minuten) (Abb.3).

Wichtig bei der Bewertung dieser Versuche ist erneut die Betrachtung des Laufverhaltens anhand der Luftstöße, die pro Minute des jeweiligen Belastungstests abgegeben wurden, beispielhaft anhand des Vergleiches zwischen Mlp-WT Tieren mit bzw. ohne MPO-Defizienz in Abbildung 5 gezeigt. MPO kompetente Tiere lösten zu Beginn der dritten Trainingswoche eine signifikant höhere Anzahl an Luftstößen pro Minute Laufzeit aus als noch im Belastungstest der 1. Woche gemessen wurden ( $p=0,0012$ ), was auf ein inkonstantes Laufverhalten hindeutet. Demgegenüber veränderte sich die Anzahl an Luftstößen pro Minute bei den MPO

defizienten Tieren weniger deutlich, sie blieb über die gesamten vier Wochen hinweg nahezu konstant (Luftstöße pro Minute Mpo-KO Woche 1 vs Final  $p=0,4471$ ) (Abb. 5).



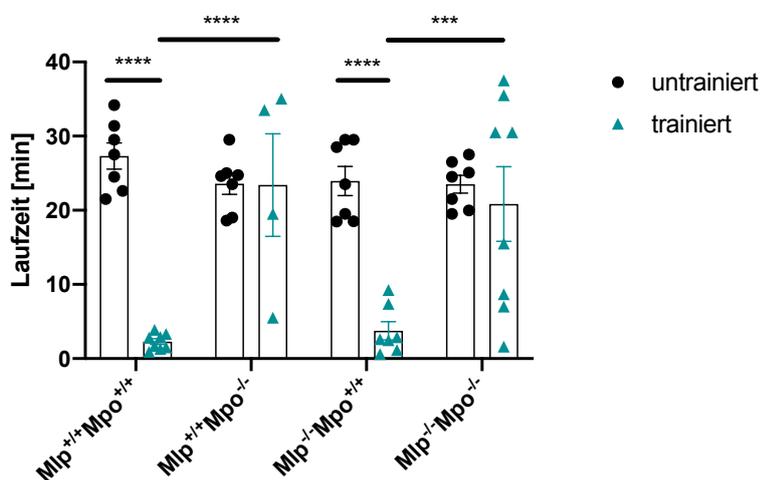
**Abb. 5: Entwicklung der Anzahl an Luftstöße die pro Minute während der Belastungstests ausgelöst wurden**

Direkter Vergleich zwischen MPO kompetenten und MPO defizienten Mlp-WT Tieren über die gesamte Trainingszeit hinweg. Mittelwert  $\pm$  SEM; \*= $p<0.05$ ; \*\*= $p<0.01$  Alter: 11-15 Wochen

#### 4.1.3. Der Einfluss des Trainings auf die Belastungsfähigkeit

Um den Effekt des Trainings auf die Belastungsfähigkeit der Mlp-KO Tiere sowie mögliche Unterschiede in dessen Ausprägung in Abwesenheit von MPO nachzuweisen, wurden 15 Wochen alte untrainierte mit gleichaltrigen trainierten Tieren verglichen. In keiner Versuchstiergruppe konnte eine signifikante Steigerung der Belastungsfähigkeit durch Training verzeichnet werden. Es zeigte sich auch hier deutlich, dass bei MPO kompetenten, trainierten Tieren eine signifikant ausgeprägtere Verringerung der Laufzeit zu messen ist, als bei MPO defizienten Tieren, welche ihre anfangs erreichte Laufzeit, im Durchschnitt halten konnten.

Betrachtet man lediglich den Trainingseffekt der MPO defizienten Tiere fällt außerdem die starke Streubreite der erreichten Laufzeiten auf. Ungefähr die Hälfte der Tiere hat eine höhere Laufzeit als der Durchschnitt der untrainierten Vergleichsgruppe erreicht, die andere Hälfte eine deutlich schlechtere (Abb. 6).



**Abb. 6: Vergleich der Laufzeiten von untrainierten Tieren und 4 Wochen lang trainierten Tieren.**

Laufzeiten bestimmt durch Belastungstest ohne vorheriges Training bzw. nach Abschluss der Trainingsperiode.  $n=7,8,7,4,7,7,7,8$ ; Mittelwert  $\pm$  SEM; \*\*\*\*= $p<0.0001$  Alter: 15 Wochen

#### 4.1.4. Überprüfung der Methodik durch Verkürzung der Erschöpfungszone

Zur Überprüfung der Methodik des Belastungstests wurde eine Verkürzung der Erschöpfungszone des Laufbandes wie in Abbildung 7 dargestellt durchgeführt, und das Trainingsprotokoll mit Mlp-WT und Mlp-KO Tieren wiederholt. Die Ergebnisse der Belastungstests sowie der während der Belastungstests pro Minute ausgelösten Luftstöße der Mlp-KO Tiere, werden beispielhaft in Abb. 8 dargestellt. Das Ergebnis der Anpassung des Versuchsaufbaues sind deutlich längere Laufzeiten der Tiere, zusammen mit weniger ausgelösten Luftstößen pro Minute. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Mlp-KO Tiere im Rahmen des ursprünglichen Versuchsaufbaus während der Belastungstests nicht vollständig ausbelastet waren.

**A**



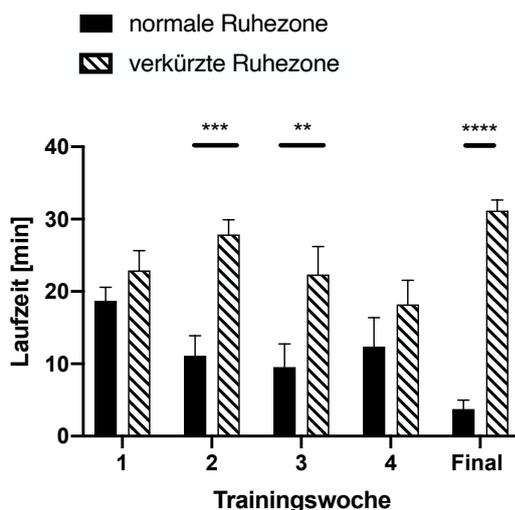
**B**



Abb. 7: **Fotographien des Laufbandes vor und nach Anpassung der Erschöpfungszone.**

(A) Die Erschöpfungszone (Metallstäbe am linken Ende der Laufbahn) ist groß. (B) Die Begrenzung der Laufbahn (durchsichtige Begrenzung) wurde in Richtung Ende der Laufbahn verschoben, sodass die Erschöpfungszone nur noch ca. 1cm beträgt.

**A**



**B**

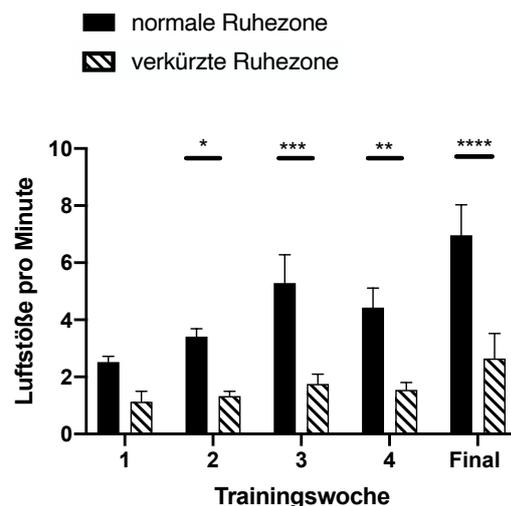


Abb. 8: **Entwicklung der Belastungstests der Mlp-KO Tiere von Trainingswoche 1-4 sowie Final, Vergleich von ursprünglicher und verkürzter Ruhezone.**

(A) Laufzeit die während der Belastungstest erreicht wurde (B) Luftstöße die pro Minute Laufzeit des Belastungstests pro Maus ausgelöst wurden. n=7,5; Alter: 11-15 Wochen; Mittelwert ± SEM; \*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$ , \*\*\*= $p < 0.001$ , \*\*\*\*= $p < 0.0001$

## 4.2 Echokardiographie

### 4.2.1. Bedeutung des Mlp-KO und der MPO-Defizienz für die kardiale

#### Funktion

Um den Einfluss des Belastungstrainings auf die kardiale Funktion von Mlp-KO Tieren beurteilen zu können, wurden zunächst echokardiographische Untersuchungen von Tieren durchgeführt, die noch kein Trainingsprogramm absolviert hatte, um somit die kardialen Ausgangsphänotypen der unterschiedlichen Versuchstiergruppen charakterisieren zu können. Eines der charakteristischen Merkmale der dilatativen Kardiomyopathie ist die Veränderung der Herzgeometrie in Form von einer deutlichen Dilatation der Ventrikel. Durch die strukturellen Veränderungen des Zytoskeletts der Mlp-KO Tiere weisen auch sie diese Veränderung auf, was sich durch Betrachtung der M-Mode Abbildungen des linken Ventrikels augenscheinlich bestätigen ließ.

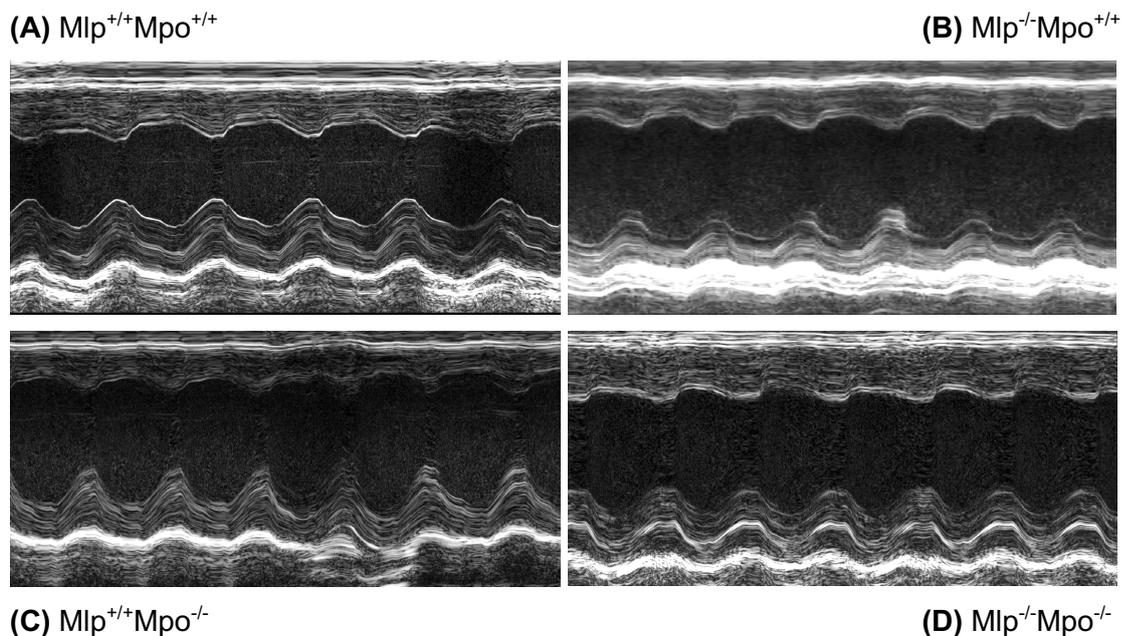


Abb. 9: **Darstellung der linken Ventrikel.**

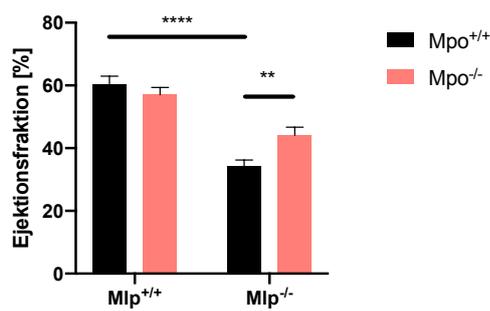
Abbildung der echokardiographisch dargestellten linken Ventrikel im M-Mode (motion-mode).

(A)  $Mlp^{+/+}Mpo^{+/+}$  (B)  $Mlp^{-/+}Mpo^{+/+}$  (C)  $Mlp^{+/+}Mpo^{-/-}$  (D)  $Mlp^{-/+}Mpo^{-/-}$

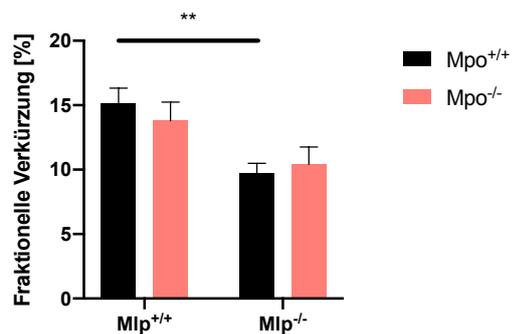
Echokardiographisch zeigte sich eine signifikante Erhöhung des enddiastolischen linksventrikulären Volumens der Mlp-KO Tiere, außerdem war eine deutliche Erhöhung des Verhältnisses der E-Welle zur A-Welle (E/A) zu erkennen. Die E-Welle beschreibt den passiven Blutfluss aus dem linken Vorhof in den Ventrikel zu Beginn der Diastole, die A-Welle spiegelt den mitralen Blutfluss wider, der anschließend durch die Vorhofkontraktion erzeugt wird. Eine so deutliche Erhöhung des E/A Quotienten deutet auf eine ausgeprägte diastolische Dysfunktion hin.

Ein weiteres Hauptmerkmal der DCM ist die Einschränkung der linksventrikulären systolischen Funktion. Echokardiographisch zeigte sich mit  $34,34 \pm 1,91\%$  eine signifikant niedrigere Ejektionsfraktion der Mip-KO Tiere im Vergleich zu  $60,36 \pm 2,59\%$  bei den Mip-WT Tieren. Die Ejektionsfraktion beschreibt den Anteil des Volumens, der in Bezug auf das enddiastolische Volumen während der Ventrikelkontraktion in der Systole ausgeworfen wird. Auch das Schlagvolumen, also das durch die Kontraktion ausgeworfene Volumen, war signifikant reduziert, genau wie die ebenfalls die systolische Funktion beurteilende fraktionelle Verkürzung. Die fraktionelle Verkürzung beschreibt die prozentuelle Veränderung des linksventrikulären Durchmessers in der Systole, welche durch die Kontraktion des Myokards erreicht wird. Interessant ist der Vergleich mit den MPO defizienten Tieren. Die zusätzliche MPO-Defizienz der Mip-KO Tiere verbesserte ihre eingeschränkte systolische Funktion deutlich. Die Ejektionsfraktion gleichaltriger Tiere betrug  $44,07 \pm 2,6\%$  im Vergleich zu  $34,34 \pm 1,91\%$  in Anwesenheit von MPO (Abb. 10).

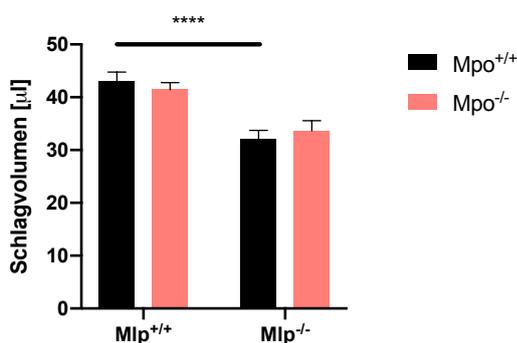
(A)



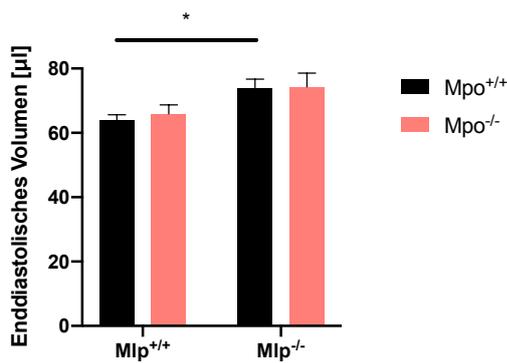
(B)



(C)



(D)



(E)

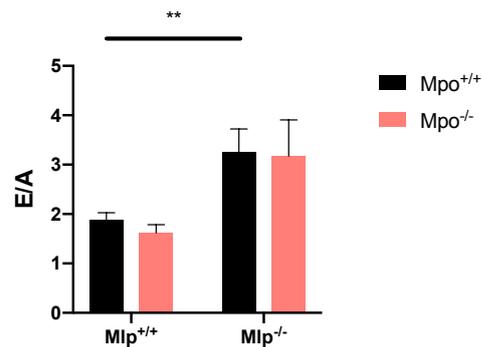


Abb. 10: Echokardiographische Untersuchung der kardialen Funktion von Mlp-KO Tieren mit und ohne MPO-Defizienz

(A) Echokardiographische Untersuchung der Ejektionsfraktion, (B) der Fraktionellen Verkürzung und (C) des Schlagvolumens als Parameter für die systolische LV-Funktion. (D) Enddiastolisches Volumen und (E) E/A Quotienten zur Beurteilung der diastolischen Funktion des linken Ventrikels. N=13,11,14,13; Alter: 11-15 Wochen; Mittelwert ± SEM; \*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$ , \*\*\*= $p < 0.001$ , \*\*\*\*= $p < 0.0001$

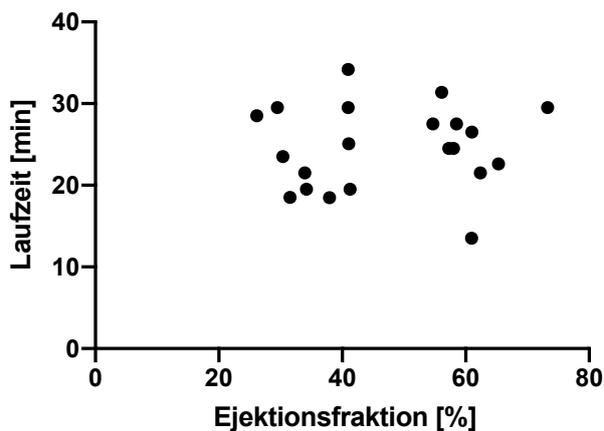


Abb. 11: Überprüfung einer möglichen Korrelation zwischen der linksventrikulären Funktion und der Belastungsfähigkeit untrainierter Tiere.

WT, Mlp-KO, Mpo-KO und DKO Tiere; Pearson Korrelation; N=21; Alter: 15 Wochen

Aufgrund der Tatsache, dass die Mlp-KO Tiere nicht nur eine eingeschränkte Belastungsfähigkeit, sondern auch eine verminderte LVEF ausweisen, stellt sich die Frage, ob es eine direkte Korrelation zwischen den beiden Parametern gibt. Diese Vermutung konnte allerdings werden für die Mlp-KO, WT oder DKO Tiere einzeln, noch wenn man alle gemeinsam betrachtet (Abb. 11) festgestellt werden.

#### 4.2.2. Entwicklung der kardialen Funktion zwischen der 11. und 15. Lebenswoche ohne Training

Der kardiale Phänotyp der Mlp-KO Tiere entwickelt sich wie bereits beschrieben zwischen der 6. und 15. Lebenswoche. Um den Einfluss von Belastungstraining auf diese Entwicklung

beurteilen zu können, wurden zunächst die echokardiographischen Veränderungen gezeigt, die ohne jegliches Belastungstraining eintreten würden.

Wie in Abbildung 12 ersichtlich, ließen sich jedoch keine Unterschiede der systolischen LV-Funktion zwischen der 11. und 15. Lebenswoche darstellen. Auch weitere bestimmte Parameter wie das Schlagvolumen, die fraktionelle Verkürzung und das enddiastolische Volumen blieben statistisch unauffällig.

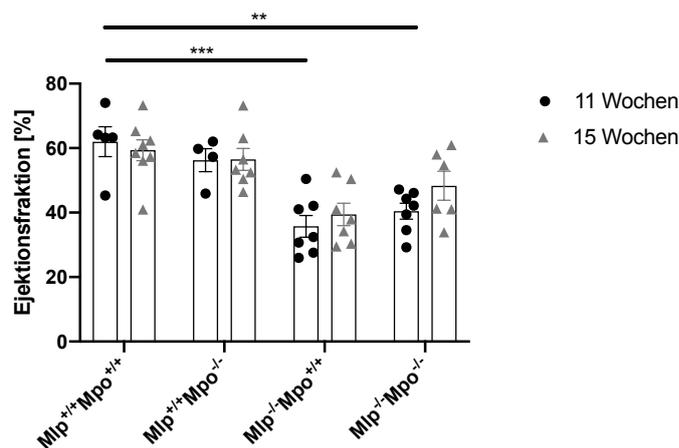


Abb. 12: Vergleich der systolische LV-Funktion im Alter von 11 und 15 Wochen.

Vergleich der Ejektionsfraktionen von 11 und 15 Wochen alten Tieren, ohne Belastungstraining. n=5,8,4,7,7,7,7,6; Mittelwert ± SEM; \*\*=p<0.01\*\*\*=p<0.001

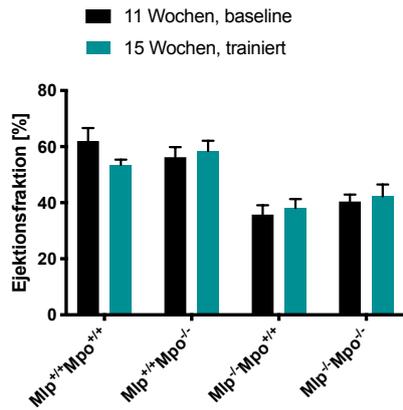
#### 4.2.3. Entwicklung der kardialen Funktion während der vierwöchigen Trainingsperiode

Der Effekt des Belastungstrainings auf die kardiale Funktion soll anhand des Vergleiches von echokardiographisch gewonnenen Werten vor Beginn des Trainings (baseline), mit Werten nach Abschluss der Trainingsperiode (trainiert) dargestellt werden. Dabei ist zum einen der Vergleich der Mittelwerte der gesamten Trainingskohorte eines Genotyps interessant und zum anderen die individuelle Veränderung der Werte jedes einzelnen Tieres.

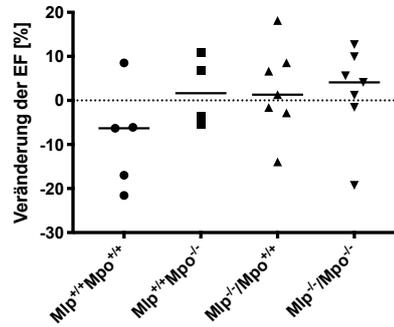
Das Training konnte keine signifikanten Veränderungen der LVEF, weder bei Mip-KO noch bei DKO oder WT Tieren hervorrufen. Eine signifikante Verbesserung zeigte sich allerdings bei Betrachtung des Schlagvolumens der Mip-KO Kohorte und bei zusätzlicher MPO-Defizienz ist einer Steigerung der Fraktionellen Verkürzung der Tiere nach Abschluss des Trainings festzustellen.

Interessant ist außerdem neben dem Vergleich der Mittelwerte der Kohorten, der Vergleich in der Entwicklung jedes einzelnen Tieres während des Trainings. Hierbei fällt bei der Betrachtung des Schlagvolumens auf, dass bei jeder Mip-KO Maus, ob mit oder ohne MPO-Defizienz eine Verbesserung des Schlagvolumens nach Abschluss des Trainingsperiode zu verzeichnen ist (Abb. 13).

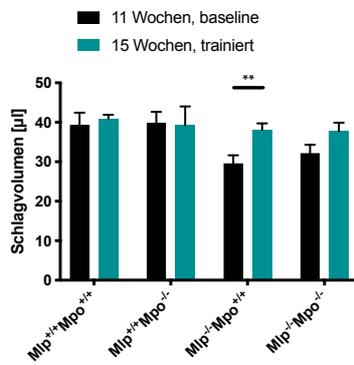
(A1)



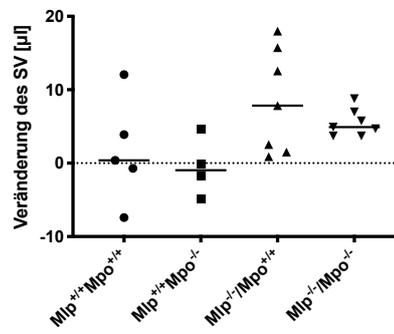
(A2)



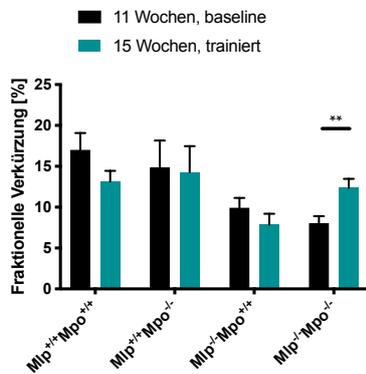
(B1)



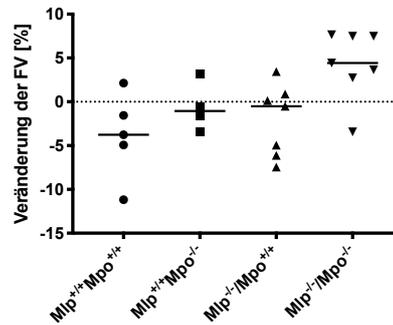
(B2)



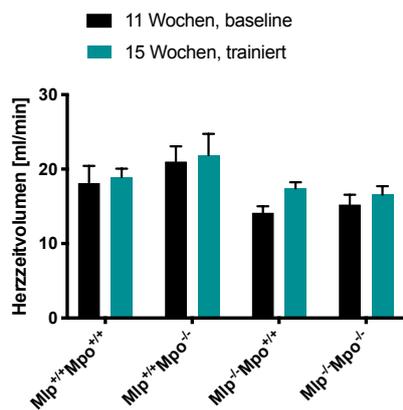
(C1)



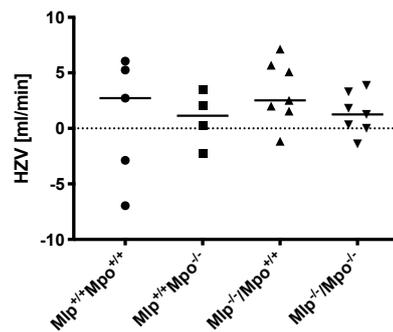
(C2)



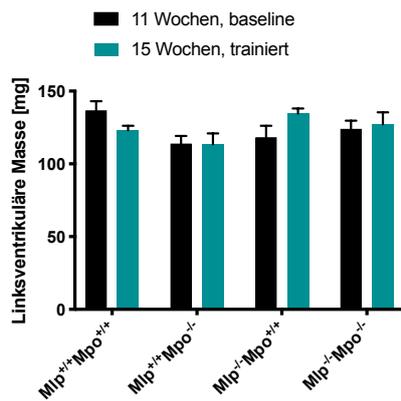
(D1)



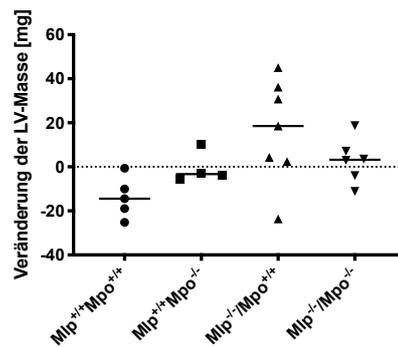
(D2)



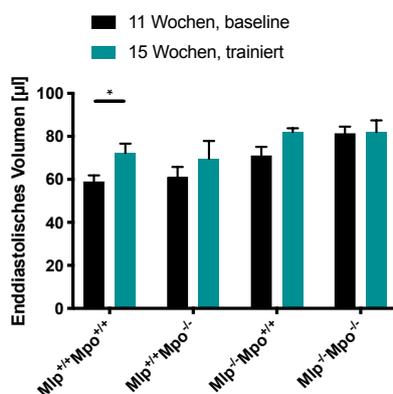
(E1)



(E2)



(F1)



(F2)

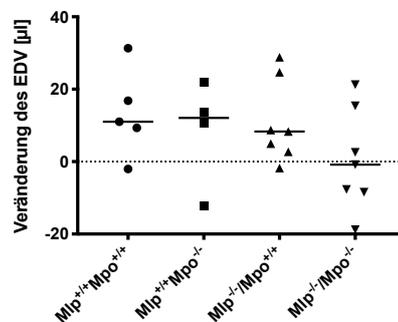


Abb. 13: Entwicklung der kardialen Funktion während des Belastungstrainings.

Echokardiographisch bestimmte Werte der kardialen Funktion. Vergleich der vor Beginn des Trainings gemessenen Werte, mit Werten nach Abschluss des vierwöchigen Trainings, jeweils aufgelistet als Vergleich der Durchschnittswerte (X1) und der individuellen Veränderung jedes einzelnen Tieres (X2) (A) Untersuchung der Ejektionsfraktion, (B) des Schlagvolumens, (C) der Fraktionellen Verkürzung, (D) des Herzzeitvolumens, (E) der linksventrikulären Masse, (F) des Enddiastolischen Volumen N=5,4,7,7; Alter: 11-15 Wochen; Mittelwert  $\pm$  SEM; \*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$

Die bisher gezeigten Daten sollten einen möglichen Effekt von Belastungstraining auf die *Entwicklung* der kardialen Funktion der einzelnen Tiere zeigen. Die folgenden Werte sollen durch den direkten Vergleich gleichaltriger, trainierter und untrainierter Tiere abschließend klären, ob trainierte Tiere eine bessere kardiale Funktion aufweisen.

Es konnten jedoch lediglich die zuvor bereits gezeigten Unterschiede zwischen Mip-KO und WT Tieren, sowieso zusätzlicher MPO-Defizienz bestätigt werden, es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der kardialen Funktionsparameter zwischen trainierten und untrainierten Tieren (Abb. 14).

Diese Feststellung legt nahe, dass die vielfach nachgewiesenen positiven Effekte von Belastungstraining, wie bereits angenommen, nicht vorrangig auf einer Verbesserung der kardialen

Funktion beruhen, sondern dass sie ihren Ursprung anderswo, beispielsweise im Skelettmuskel haben.

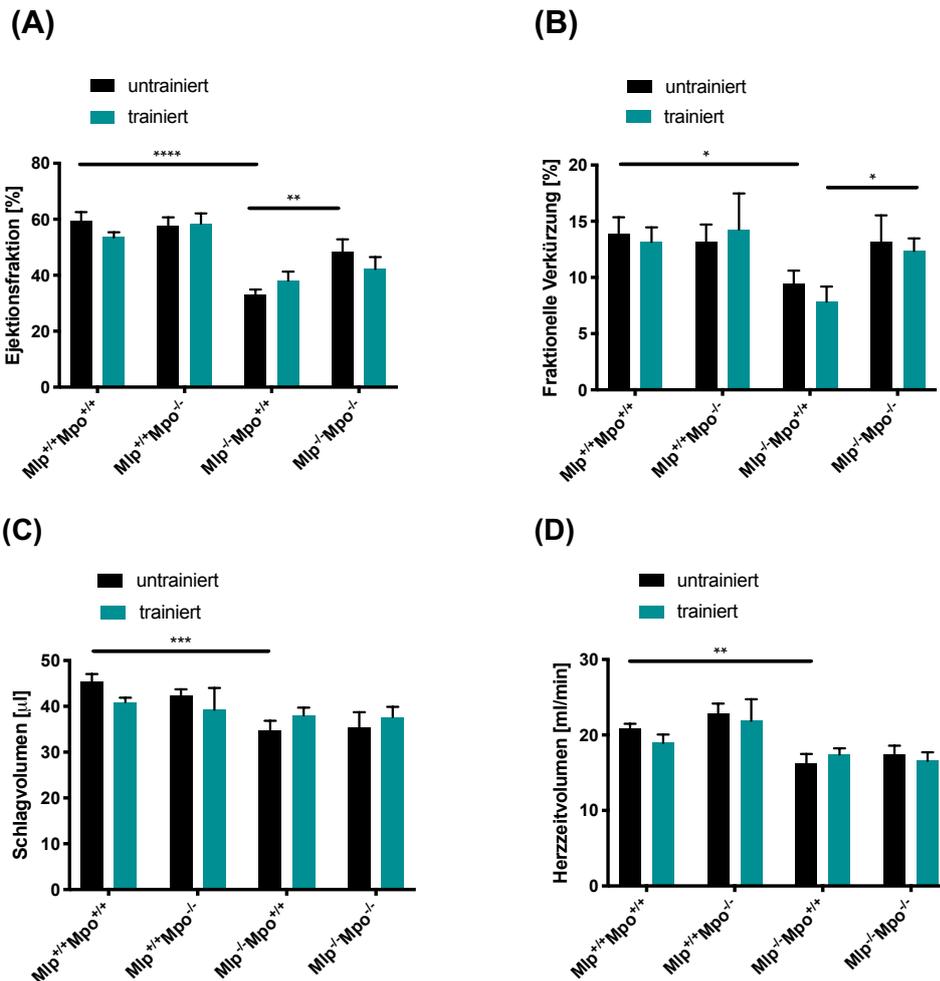


Abb. 14: Vergleich der kardialen Funktion untrainierter und trainierter Tiere.

Echokardiographisch bestimmte Werte der kardialen Funktion. Vergleich von untrainierten 15 Wochen alten Tieren mit 15 Wochen alten Tieren die das vierwöchige Trainingsprogramm absolviert haben. (A) Untersuchung der Ejektionsfraktion, (B) der Fraktionellen Verkürzung, (C) des Schlagvolumens und (D) des Herzzeitvolumens, N=8,5,7,4,7,7,6,7; Alter: 15 Wochen; Mittelwert ± SEM; \*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$ , \*\*\*= $p < 0.001$ , \*\*\*\*= $p < 0.0001$

Dass das Gewebe der Tiere der Trainingskohorte, trotz des durch den Belastungstest nicht ausreichend darstellbaren Trainingserfolges trotzdem für weitere Versuche zur Analyse von Trainingseffekten verwendet werden kann, lässt sich mit der zurückgelegten Gesamtdistanz der Tiere begründen. In den gesamten vier Wochen des Trainings legten Mip-KO Tiere durch Adaptation, Training und Belastungstest jeweils durchschnittlich 6,31 Kilometer zurück, bei zusätzlicher MPO-Defizienz interessanterweise sogar 7,6 Kilometer. Bei den Wildtyp-Tieren waren es durchschnittlich 5,99 Kilometer pro Tier (Abb. 15).

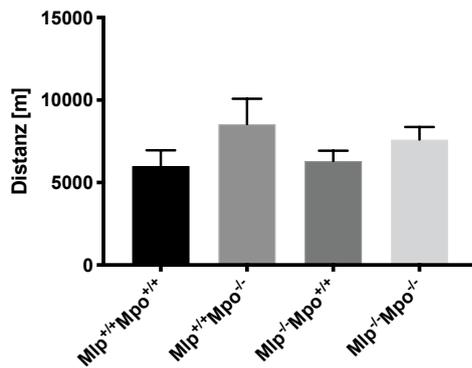


Abb. 15: Distanz die während des gesamten Versuches, einschließlich Adaptation, Belastungstest und vierwöchigem Training pro Tier zurückgelegt wurde.

Errechnet durch Addition der einzelnen Laufzeiten der Tiere. n=8,4,7,8; Alter: 11-15 Wochen; Mittelwert  $\pm$  SEM

#### 4.3 Die Auswirkung von Belastungstraining auf die Konzentration der Myeloperoxidase

Erhöhte MPO-Plasmaspiegel konnten bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz nachgewiesen werden, wobei die Konzentration sogar mit dem NYHA-Stadium der Erkrankung korreliert. Dies legt die Vermutung nahe, dass auch bei der Mlp-KO Maus die Menge an systemisch zirkulierendem MPO erhöht ist. Zur Überprüfung der Hypothese wurden Plasma Proben mithilfe eines MPO-ELISAs bezüglich der MPO-Konzentration untersucht (siehe Abb. 16). Es konnte signifikant weniger MPO im Plasma der Mlp-KO Tiere im Vergleich zu WT Tieren festgestellt werden, dies bestätigte sich im Vergleich von untrainierten Tieren ( $p=0,032$ ) und im Vergleich von trainierten Tieren ( $p=0,034$ ). Aufgrund ihres Genotyps wiesen die DKO Mäuse kein MPO im Plasma auf. Im nächsten Schritt wurden die untrainierten Tiere mit Tieren, die das vierwöchige Trainingsprogramm absolviert hatten verglichen, da bereits in klinischen Studien gezeigt werden konnte, dass regelmäßiges Belastungstraining den MPO-Plasmaspiegel von Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren senkt<sup>155</sup>. Dies konnte zumindest als Trend bestätigt werden (siehe Abb. 16), die Ergebnisse erreichten allerdings keine statistische Signifikanz.

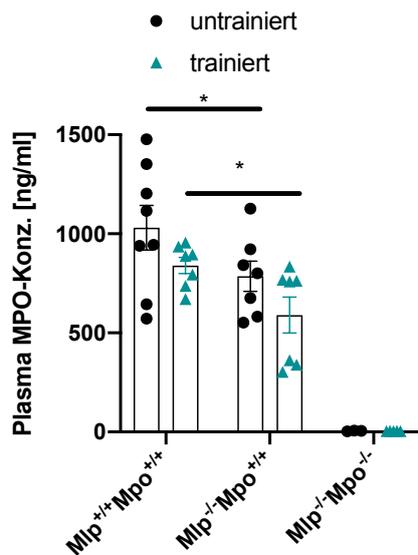


Abb. 16: **MPO-Konzentration im Plasma.**

Vergleich der MPO-Plasmakonzentration von Mip-KO und WT Tieren vor und nach Absolvieren des Trainingsprogrammes n=8,7,7,7,3,5; Alter: 15 Wochen; Mittelwert  $\pm$  SEM; \* $=p<0.05$

Da MPO seine pathophysiologischen Eigenschaften vielfach über Interaktionen mit dem Gefäßendothel vermittelt, sollten im folgenden Schritt Unterschiede in der Menge an MPO nachgewiesen werden, die an das Endothel gebunden in der Peripherie vorliegt. Aufgrund seiner kationischen Ladung interagiert MPO mit der Glykokalix der Endothelzellen und liegt dort immobilisiert vor. Zur Konzentrationsbestimmung wurde nach Entnahme der Plasmaprobe der gesamte vaskuläre Kreislauf der Tiere mit einer heparinhaltigen Perfusionslösung gespült. Das Heparin löst durch seine starke negative Ladung das MPO von den Glykokalix, sodass es frei im aufgefangenen Perfusat vorliegt. Es zeigt sich eine signifikant erhöhte Menge an peripher abgelagertem MPO in untrainierten Mip-KO Tieren im Vergleich zu WT Tieren ( $p=0,0408$ ). Nach Abschluss des Trainingsprogrammes sinkt diese initial erhöhte Menge signifikant auf Werte, die sogar unterhalb der Ausgangswerte der WT Tiere liegen ( $p=0,0002$ ). Bei den WT Tieren zeigt sich durch das Training keine Veränderung der peripheren MPO-Konzentration (Abb. 17).

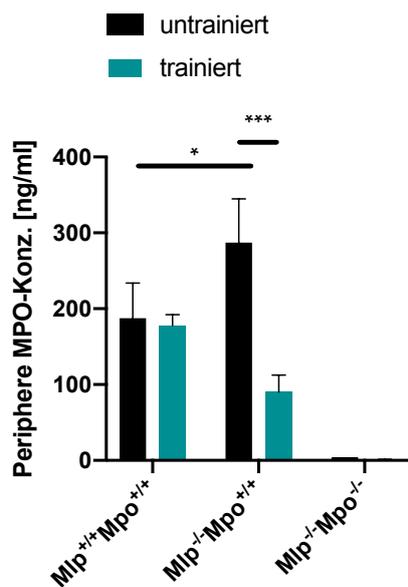


Abb. 17: **Konzentration des peripher an die Endothelwand gebundenen MPOs.**

Vergleich der durch Heparin-Perfusate gewonnenen und mittels MPO-ELISA gemessenen MPO-Konzentrationen, welche das an den Endothelzellen anhaftende MPO darstellen. Direkter Vergleich untrainierter und trainierter Tiere. N=7,7,6,7,2,8; Alter: 15 Wochen; Mittelwert  $\pm$  SEM; \*= $p < 0.05$ , \*\*\*= $p < 0.001$

#### 4.4 Anpassung der Skelettmuskulatur an das Belastungstraining – Neoangiogenese

Um mögliche periphere Effekte des Belastungstrainings, sowie unterschiedliche Ausgangssituationen der Mip- bzw. Mpo-KO Tiere nachweisen zu können, wurde die Kapillarisation des M. Soleus des Hinterlaufs der Tiere untersucht. Eine höhere Anzahl an Kapillaren pro Muskelfaser geht einher mit einer besseren Durchblutung der Muskulatur und somit einer besseren Versorgung mit Sauerstoff und Energielieferanten, sowie verbessertem Abtransport anfallender Stoffwechselprodukte. MPO-Defizienz könnte Einfluss auf die Durchblutung nehmen, da in Abwesenheit von MPO mehr Stickstoffmonoxid zur Verfügung steht, was wiederum vasodilatierend auf die Gefäße wirkt.

Zur Darstellung der Kapillarisation wurde eine immunhistologische Färbung von M. soleus Querschnitten der Versuchstiere unter Verwendung eines Anti-CD31 Antikörpers durchgeführt. CD31 ist ein Thrombozyten-Endothelzell-Adhäsionsmolekül, welches auf der Oberfläche von Endothelzellen lokalisiert ist. Es konnten keine signifikanten Unterschiede bei der Auszählung der angefärbten Kapillare pro Muskelfaser festgestellt werden, weder in Abhängigkeit des Trainingsstatus noch bei Betrachtung des Mip- beziehungsweise Mpo-KO Status (Abb. 18).

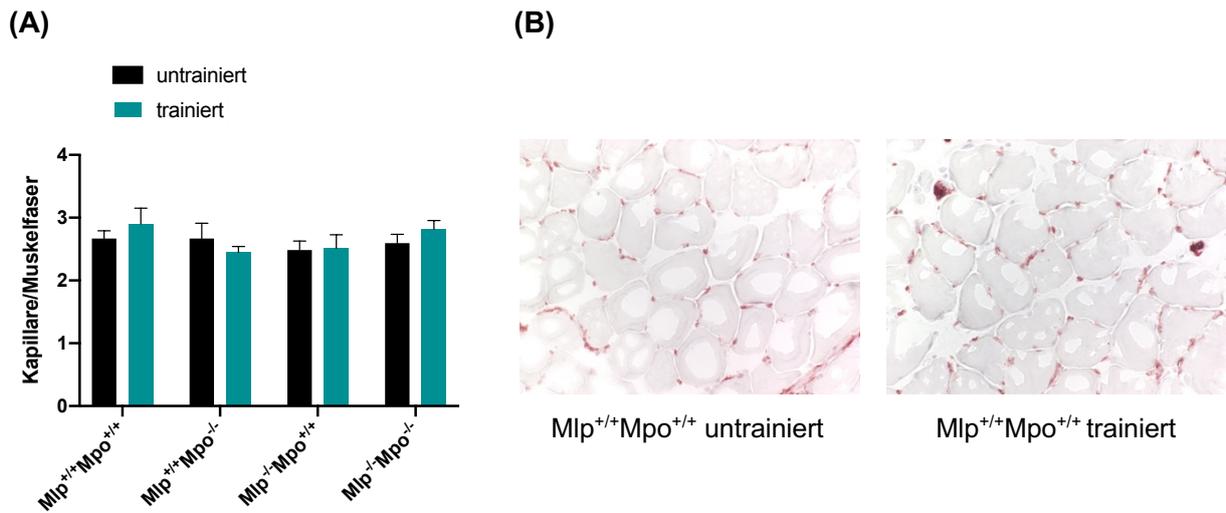


Abb. 18: **Darstellung der Anzahl an Kapillaren pro Muskelfaser des M. soleus.**

**(A)** Vergleich der Kapillaren pro Muskelfaser zwischen untrainierten und trainierten Tieren. n=8,4,5,6,7,7,7,4; Alter: 15 Wochen; Mittelwert  $\pm$  SEM **(B)** Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Anti-CD31 Antikörper Färbung des M. soleus Querschnitts.

Interessant ist allerdings die Betrachtung der Expression des vascular endothelial growth factors (VEGF) welche im M. gastrocnemius des Hinterlaufes der Tiere gemessen wurde. Es zeigt sich eine signifikante Steigerung der Expression durch das Training bei den Mip-WT und DKO Tieren (Mip-WT Tiere untrainiert vs trainiert:  $p=0,014$ ); DKO Tiere untrainiert vs trainiert:  $p=0,0117$ ). Bei den Mip-KO Tieren ist ebenfalls eine Steigerung der Expression sichtbar, die Werte erreichen allerdings keine statistische Signifikanz (Abb. 19). VEGF ist ein Protein, das als Signalmolekülen die Proliferation von Endothelzellen stimuliert und somit zur Angiogenese beiträgt.

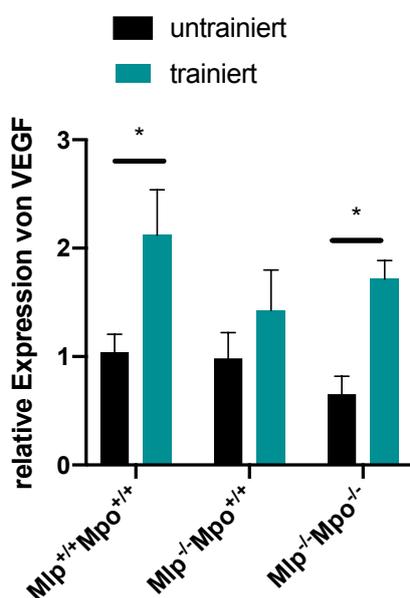


Abb. 19: **VEGF-mRNA Expression im M. gastrocnemius.**

Quantitative Auswertung der real-time PCR Analysen des M. gastrocnemius. n=5,5,6,6,5,6; Alter: 15 Wochen; Mittelwert  $\pm$  SEM; \*= $p<0.05$

#### **4.5 Charakterisierung der Expression mitochondrialer Marker in der Skelettmuskulatur und der Einfluss von Belastungstraining**

Die Tatsache, dass Belastungstraining nachgewiesenermaßen zu einer Erhöhung der Mitochondrien Dichte des Skelettmuskels führt zusammen mit der Feststellung, dass die Oberflächendichte COX-positiver Mitochondrien bei Herzinsuffizienz Patienten signifikant herabgesetzt ist, führte zu der abschließend zu untersuchenden Fragestellung, inwieweit der Mlp-KO bzw. eine MPO-Defizienz Einfluss auf die Entwicklung der Mitochondriendichte durch das Training der in dieser Arbeit untersuchten Versuchstiergruppen hat<sup>154,153</sup>. Eine verminderte Zahl an Mitochondrien im Skelettmuskel führt zu verminderter oxidativer Kapazität und somit eingeschränkter Belastungsfähigkeit. Der genannte Effekt ist mechanistisch im Kontext dieser Arbeit interessant, da eine verminderte oxidative Kapazität unter Belastung zu oxidativem Stress und einem erhöhten inflammatorischen Status, primär des Skelettmuskels und möglicherweise sekundär auch systemisch führen kann. Da eine erhöhte Zahl bestimmter pro-inflammatorischer Zytokine im Blutplasma positiv mit der Progression der DCM korreliert, ist die Veränderung der Mitochondrienzahl oder -qualität ein denkbarer Mechanismus, über den regelmäßiges Ausdauertraining die Entwicklung der DCM positiv beeinflussen könnte<sup>43</sup>.

Untersucht wurde die mRNA-Expression mehrerer Untereinheiten von Komplexen der mitochondrialen Atmungskette in Gewebe des M. gastrocnemius mittels quantitativer real-time PCR. Die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 4i (COX4i) ist ein Teil der COX, des Komplex 4 der Atmungskette, welcher in die innere Mitochondrienmembran eingelagert ist. Die Ubichinol-Cytochrom-c-Reduktase-Kernprotein 1 (UQCRC1) ist eine Untereinheit des Komplex 3 und die Succinat-Dehydrogenase-Komplex-Flavoprotein-Untereinheit A (SDHA) Teil des Komplex 2 der Atmungskette, ebenfalls ansässig in der Inneren Membran.

Die Expression aller drei untersuchten Marker ist bei den Mlp-KO Tieren signifikant erhöht im Vergleich zu WT Tieren, in Abwesenheit von MPO ist dieser Effekt interessanterweise nicht mehr nachzuweisen (siehe Abb. 20). Nach Abschluss des Trainings wiederum zeigt sich die Expression der COX4i bei den Mlp-KO Tieren signifikant reduziert, die Expression der UQCRC1 und SDHA zeigen gleiche Tendenzen, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen. Durch zusätzliche Abwesenheit von MPO ist der genannte Effekt aufgehoben und sogar in die gegenläufige Richtung umgekehrt: DKO Tiere zeigen vor allem in Bezug auf die Expression der UQCRC1 und SDHA eine signifikante Steigerung der Expression durch Belastungstraining.

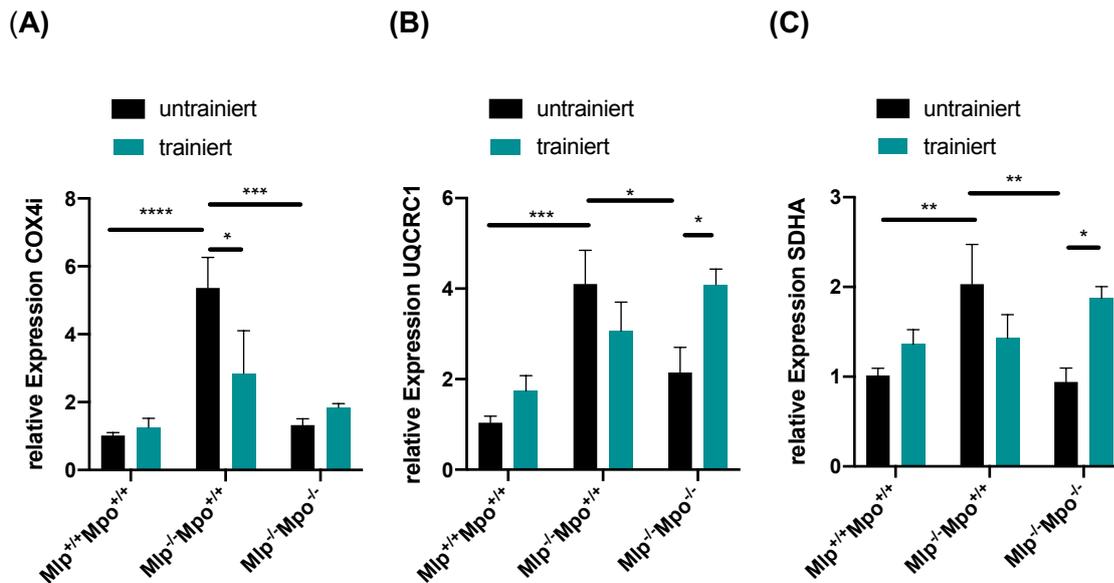


Abb. 20: Vergleich der mRNA-Expression von Proteinen der mitochondrialen Atmungskette zwischen untrainierten und trainierten Tieren.

Quantitative Auswertung der real-time PCR für die (A) Cytochrom-c-Oxidase 4i (COX4i) (B) Ubichinol-Cytochrom-c-Reduktase-Kernprotein 1 (UQCRC1) (C) Succinat-Dehydrogenase-Komplex-Flavoprotein-Untereinheit A (SDHA); n=5,5,6,6,5,6; Alter: 15 Wochen; Mittelwert  $\pm$  SEM; \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001

## 5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit ist es die Themengebiete dilatative Kardiomyopathie und kardiale Funktion, Belastungstraining und funktionelle Kapazität sowie Inflammation, insbesondere die Rolle der Myeloperoxidase zu untersuchen und eventuelle mechanistische Zusammenhänge darzustellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden *Mip*-KO Mäuse als murines Modell der DCM sowie *Mip*-KO Mäuse mit zusätzlichem *Mpo*-KO über einen Zeitraum von insgesamt vier Wochen auf einem extra für Kleintiere entwickelten Laufband trainiert. Ihre Belastungsfähigkeit wurde anhand von wöchentlichen, standardisierten Belastungstest aufgezeichnet und die Entwicklung ihrer kardialen Funktion anhand von wiederholten echokardiographischen Untersuchungen verfolgt. Rückschlüsse auf körperliche Anpassungsprozesse, insbesondere Veränderungen des inflammatorischen Status durch das Training wurden abschließend durch Gewebeuntersuchungen aus Herz-, Skelettmuskulatur und Blutplasma gewonnen.

Im Folgenden Abschnitt werden die aufgeführten Ergebnisse diskutiert und in den Kontext der aktuellen Forschung eingeordnet.

## **5.1 Bedeutung des Mlp-KO für die kardiale Funktion und Anpassung durch MPO-Defizienz**

Um die genannten Zusammenhänge sinnvoll darstellen zu können, sollte in diesem Abschnitt der Arbeit zunächst der eingeschränkte kardiale Phänotyp der Mlp-KO Mäuse bestätigt und der Einfluss eines zusätzlichen Mpo-KO anhand der echokardiographisch gewonnenen Daten diskutiert werden. Arber et al. etablierten bereits 1997 die Mlp-KO Maus als sinnvolles Tiermodell zur Untersuchung der DCM<sup>105</sup>. Dies wurde durch die echokardiographischen Untersuchungen auch in dieser Arbeit zweifelsfrei bestätigt. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten außerdem bereits durch in vivo ermittelte Druck Volumen Schleifen eine signifikante Erhöhung der linksventrikulären isovolumetrischen Relaxation (Tau) bei Mlp-KO Tieren, beweisend für eine deutliche diastolischen Dysfunktion. In Zusammenschau mit diesen Vorarbeiten kann auch die hier festgestellte signifikante Erhöhung des E/A Quotienten bei Mlp-Knockout Tieren als Hinweis für eine erhebliche Störung der linksventrikulären Funktion gedeutet werden<sup>159</sup>.

Bemerkenswerterweise konnte gezeigt werden, dass die Mlp-KO Tiere bei zusätzlicher MPO-Defizienz eine signifikant höhere Ejektionsfraktion als die MPO naiven Tiere ausweisen. Die Frage, worauf diese enorme Verbesserung der kardialen Funktion beruht ist bislang ungeklärt. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigen anhand von Analysen kardialen Gewebes unter dem Elektronenmikroskop, dass es keinen Unterschied in der Sarkomerstruktur zwischen den Mlp-KO und DKO Tieren gibt. Es konnte auch kein Unterschied in dem Fibrosegrad des linken Ventrikels oder in der Funktion der Mitochondrien festgestellt werden. Dem gegenüber konnten bereits deutliche Unterschiede im peripheren vaskulären System nachgewiesen werden. In Abwesenheit von MPO besteht ein deutlich geringerer peripherer vaskulärer Widerstand, unter anderem erklärbar durch die erhöhte Bioverfügbarkeit von vasodilatatorisch wirkendem NO. Aufbauend auf diesen Feststellungen stellten wir die Hypothese auf, dass Mlp-KO Tiere in Abwesenheit von MPO nicht nur eine bessere kardiale Funktion, sondern auch eine erhöhte Belastungstoleranz aufweisen müssten.

## **5.2 Auswirkung des Mlp-KO auf die Belastungsfähigkeit**

Die eingeschränkte Belastungsfähigkeit von DCM-Patienten, darstellbar beispielsweise durch die Überprüfung der 6-Minuten Gehstrecke oder maximale Ausdauerleistungstests, ist eines der ersten Symptome der Erkrankung und geht mit einer starken Einschränkung der Lebensqualität einher.

Ein Grund für die starke Einschränkung ist die Unfähigkeit des Herzens das Schlagvolumen des linken Ventrikels adäquat an die Belastungssituation zu steigern und eine daraus resultierende Minderperfusion des peripheren Gewebes, unter anderem der Skelettmuskulatur. Der durch die DCM ohnehin bereits stark dilatierte Ventrikel ist nicht in der Lage die Vorlast noch

weiter zu erhöhen. Außerdem kann die Kontraktilität des Ventrikels nicht gesteigert werden durch eine verminderte Sensibilität der  $\beta$ -Adrenozeptoren und die vermehrte Aktivität des RAAS, welche zu einer Erhöhung des peripheren vaskulären Widerstandes führt<sup>109</sup>.

Aus diesen Gründen wäre also auch bei Mlp-KO Tieren eine eingeschränkte Belastbarkeit während des einmaligen Belastungstest zu erwarten. Weiterführend wäre bei zusätzlicher MPO-Defizienz eine gesteigerte Belastungsfähigkeit durch die bessere kardiale Funktion und insbesondere durch den geringeren peripheren Widerstand zu erwarten. Bisher gibt es keine Veröffentlichung in welcher das Laufverhalten bzw. die funktionelle Kapazität von Mlp-KO bzw. DKO Tieren anhand von Laufbandbelastungstest oder einer anderen Belastungssituation untersucht wurde.

Die Laufbandbelastungstest zeigten in der Tat eine eingeschränkte Belastungsfähigkeit der Mlp-KO Tiere. Im Alter von 11-15 Wochen, also zu einem Zeitpunkt an dem der kardiale Phänotyp der Mlp-KO Tiere vollständig entwickelt ist, erreichten die Mlp-KO Tiere im Rahmen des einmaligen Belastungstests im Durchschnitt lediglich eine maximale Laufzeit von 21,19 Minuten, während die Mlp-WT Tiere 25,49 Minuten erreichten (Mlp-KO vs WT: 21,19 $\pm$ 1,49 Minuten vs 25,49 $\pm$ 1,38 Minuten ( $p=0,0147$ )).

Bei zusätzlicher MPO-Defizienz, konnte hier im Gegensatz zu den kardialen Untersuchungen allerdings keine Verbesserung dargestellt werden. DKO Tiere erreichten im Durchschnitt eine ähnlich eingeschränkte Laufzeit wie die Mlp-KO Tiere, auch wenn dies im direkten Vergleich mit den Wildtyp Tieren keine statistische Signifikanz erreichte. Auffällig waren die sehr heterogenen Ergebnisse innerhalb der einzelnen Gruppen: die maximalen Laufzeiten der Mlp-KO Tiere reichten von 11,54 Minuten bis 29,32 Minuten, ähnliche Streubreiten lagen auch bei den übrigen Versuchstiergruppen vor.

Weiterführende statistische Untersuchungen zeigten, dass die Belastungsfähigkeit der Tiere nicht mit der LVEF korreliert. Dieses Ergebnis deckt sich mit Ergebnissen bisherige Studien welche besagen, dass es keine Korrelation zwischen der LVEF und der funktioneller Kapazität gibt. Bereits 1981 stellten Franciosa et al. fest, dass die in Ruhe echokardiographisch gemessene Herzleistung nicht mit der Belastbarkeit und Symptomatik von Patienten mit Herzinsuffizienz korreliert<sup>111</sup>. Tierexperimentelle Studien an Mäusen kommen mehrheitlich zu dem gleichen Ergebnis.

Aber obwohl die LVEF und die Belastbarkeit nicht direkt miteinander korrelieren verbessert regelmäßiges Belastungstraining in Studien nachweislich sowohl die LVEF als auch die Belastbarkeit. Es scheint also, der Trainingserfolg ist nicht direkt begründet in der Verbesserung der LVEF sondern in anderen, z.B. peripheren Mechanismen, welche unter anderem mit einer Verbesserung der LVEF einhergehen.

### 5.3 Einfluss von Belastungstraining auf die funktionelle Kapazität

Positive Auswirkungen von Belastungstraining auf Herzinsuffizienz beziehungsweise DCM-Patienten sind in vielen Studien belegt worden. Regelmäßiges körperliches Belastungstraining führt zu einer 11%igen Reduktion der primären Endpunkte Hospitalisierung und Tod, zur Steigerung der LVEF in Ruhe und unter Belastung, sowie zur Steigerung der Belastungsfähigkeit und somit auch der Lebensqualität der Patienten<sup>121,122</sup>.

Unumstritten in beinahe allen diesen Studien ist die Steigerung der  $V(O_2)_{max}$ . Die  $V(O_2)_{max}$  als Bruttokriterium der kardiopulmonal-metabolischen Kapazität soll im Rahmen dieser Arbeit aufgeteilt werden in kardiale und extrakardiale Anpassungsprozesse. Kardiale Daten werden durch echokardiographische Untersuchung vor Beginn des Trainings und nach Abschluss der letzten Trainingswoche aufgezeichnet, extrakardiale Daten im Rahmen der Gewebe- und Plasmauntersuchungen nach Abschluss des Trainings.

Die Arbeitshypothese besagt, dass Mip-KO Tiere vor allem durch extrakardiale Anpassungsprozesse während des Trainings, insbesondere durch Reduktion des peripheren vaskulären Widerstandes sowie einer Reduktion des grundsätzlich erhöhten inflammatorischen Status eine deutliche Verbesserung ihrer Belastungsfähigkeit erreichen und auch im Endeffekt ihre kardiale Funktion verbessern können, beziehungsweise das Fortschreiten der Entwicklung der DCM eingegrenzt wird. Bei zusätzlicher MPO Defizienz wird hingegen angenommen, dass die Tiere ihre Belastungsfähigkeit nur in geringerem Maße verbessern können, da insbesondere ihr peripherer vaskulärer Widerstand bereits deutlich niedriger ist, und ihre kardiale Funktion bereits am Ausgangspunkt des Experiments deutlich besser ist. Sie dienen also zum einen als Kontrollgruppe, ob die Reduktion des peripheren Widerstandes einen Einfluss auf die Entwicklung der DCM zu vernehmen mag und letztendlich den gleichen Effekt wie die angeborene MPO-Defizienz auf die kardiale Funktion hat. Außerdem sollte durch das Training der DKO-Kohorte überprüft werden, inwieweit die Modifikation des inflammatorischen Status einen Einfluss auf die kardiopulmonal-metabolische Kapazität, kardial und extrakardial hat, dieser Unterpunkt wird zu einem späteren Zeitpunkt diskutiert werden.

Das Trainingsprogramm dauerte vier Wochen lang und bestand aus fünf Laufeinheiten pro Woche, bei denen mit steigender Intensität auf einem Laufband trainiert wurde. In der ersten Woche liefen die Tiere jeweils 30 Minuten pro Tag, in der zweiten 40, in der dritten 50 und in der vierten 60 Minuten. Das Training fand an fünf aufeinanderfolgenden Tagen statt, gefolgt von zwei Ruhetagen. Vor Beginn des Trainings, am Ende jeder Trainingswoche, sowie nach Abschluss des Trainings wurde der standardisierte Belastungstest durchgeführt. Diese dienten zum einen der Dokumentation der Entwicklung der Belastungsfähigkeit, zum anderen wurde hierdurch die Geschwindigkeit des Laufbands für die Trainingstage der folgenden Woche individuell für jede Maus bestimmt. Sie lag bei 65% der während des Belastungstest am Anfang der Woche maximal erreichten Geschwindigkeit des Tieres. Dies sollte sicherstellen, dass das

Training ein moderates Belastungstraining darstellt und die aerobe Kapazität der Tiere nicht überschritten wird.

Die erwartete Steigerung der Belastungsfähigkeit konnte im Rahmen des Trainings der Mlp-KO Tiere allerdings nicht reproduziert werden. Im Gegenteil, die erreichte maximale Laufzeit während des am Ende jeder Trainingswoche durchgeführten Belastungstests nahm während des Versuches beinahe kontinuierlich ab, sodass nach vierwöchigem Training lediglich eine durchschnittliche Laufzeit von  $3,76 \pm 1,232$  Minuten verzeichnet wurde. Gleiche Ergebnisse zeigten sich beim Training der Mlp-WT Tiere. Die Ursache hierfür ist am wahrscheinlichsten ein methodisches Problem des Trainingsprogrammes. Betrachtet man die Entwicklung der Luftstöße die pro Minute durch ein Tier auf seiner Laufbahn ausgelöst wurden, ohne jedoch eines der Stopp-Kriterien des Protokolls zu erfüllen, ist der Grund ersichtlich. Während des primären Belastungstests, dem lediglich die Eingewöhnungsphase an das Gerät und noch keine Trainingswoche voran gegangen war, lösten Mlp-WT Tiere durchschnittlich  $2,54 \pm 0,4828$  Luftstöße/Minute aus, bei einer erreichten Laufzeit von durchschnittlich  $24,5 \pm 2,067$  Minuten. Nach drei Wochen Belastungstraining waren es hingegen  $15,51 \pm 1,963$  Luftstöße/Minute bei einer Laufzeit von nur noch  $7,99 \pm 3,228$  Minuten. Die Steigerung der Luftstöße/Minute lässt auf ein inkonstantes Laufverhalten rückschließen, welches vermutlich durch einen Gewöhnungseffekt der Tiere an den Luftstoß des Gerätes zu begründen ist. Die Tiere sind also vermutlich nicht mehr bis zu ihrer maximalen Belastungsgrenze gelaufen, sondern haben gelernt, dass wenn sie oft genug beziehungsweise lange genug in der Erschöpfungszone sitzen bleiben, das Laufband automatisch stoppt und sie nicht mehr weiterlaufen mussten.

Interessanterweise schienen die Tiere mit zusätzlicher MPO-Defizienz diesem Gewöhnungseffekt weniger stark unterlegen zu sein. Die DKO-Kohorte war zwar ebenfalls nicht wie ursprünglich angenommen dazu in der Lage ihre Belastungsfähigkeit zu steigern, aber nach vierwöchigem Training erreichten sie immerhin dieselben Ergebnisse im Belastungstest wie zu Beginn der Trainingsperiode. Gleiche Verhältnisse werden bei den Mlp-WT Tieren mit zusätzlichem Mpo-KO verzeichnet.

Eine Überprüfung der Methodik wurde durch Modifizierung des Laufbandes durchgeführt. Der Bereich der Erschöpfungszone wurde deutlich verkleinert, sodass die Tiere nicht mehr die Möglichkeit hatten hier auch nur kurz am Rand des Laufbandes zu sitzen, sondern direkt weiterlaufen mussten. Die Entwicklung der Laufzeiten der Mlp-KO Tiere zeigt, dass unter den neuen Versuchsbedingungen die Mlp-KO Tiere ihre Belastungsfähigkeit von ursprünglich  $22,92 \pm 2,731$  Minuten (im Vergleich zur ursprünglichen Erschöpfungszone:  $18,71 \pm 1,855$  Minuten) auf  $31,18 \pm 1,471$  Minuten (im Vergleich zur ursprünglichen Erschöpfungszone:  $3,76 \pm 1,232$  Minuten) nach Abschluss des Trainings steigern konnten. WT Tiere hingegen sind auch unter den neuen Versuchsbedingungen nicht in der Lage ihre Belastungsfähigkeit zu steigern,

obwohl auch bei ihnen zumindest längere Laufzeiten in den Belastungstest während den Trainingswochen zu verzeichnen waren.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich die Instabilität der Studienergebnisse, welche sich durch nur minimale Anpassung des Versuchsaufbaus drastisch verändern lassen.

Es ist schwierig zu beurteilen, warum die Mpo-KO Tiere im Gegensatz zu MPO naiven Tieren in der Lage sind ihre Belastungsfähigkeit zu erhalten. Ob hier tatsächlich körperliche Unterschiede vorliegen, oder, ob ein methodisches Problem wie z.B. ein fehlerhaftes Protokoll des Belastungstests vorlag, ist aktuell nicht zu beurteilen. Bei Überprüfung der Methodik anhand der aktuellen Studienlage wird schnell klar, dass die hohe Diversität der Trainingsprotokolle die Vergleichbarkeit von Veröffentlichungen zur Belastungsfähigkeit von Mäusen kaum möglich macht. Es gibt unterschiedliche Belastungssituationen wie Training auf dem Laufband, Laufrad, oder Schwimmen, erzwungenes oder freiwilliges Training. Bezogen auf das Laufbandtraining gibt es Versuchsaufbauten die wie in dieser Arbeit Luftstöße als Stimuli verwenden, in vielen anderen Arbeiten werden jedoch auch leichte Elektroschocks verwendet. Es ist leicht vorstellbar, dass es zu einem erheblichen Unterschied in den Ergebnissen kommt, selbst wenn jedes sonstige Detail eines Versuchsaufbaus übernommen wird, aber eine Maus nicht durch Luftstöße, sondern durch Elektroschocks zum Laufen stimuliert wird.

Aber auch wenn das Belastungstestprotokoll im Rahmen des Trainings scheinbar problematisch ist, bleibt die Tatsache bestehen, dass die Mlp-KO Tiere während des einmaligen Belastungstests vor Beginn der Trainingsperiode eine eingeschränkte Belastungsfähigkeit zeigten. Da diesem einmaligen Test lediglich die Eingewöhnung an das Laufband vorausging, ist hier nicht von einem Gewöhnungseffekt auszugehen und die Ergebnisse des einmaligen Tests werden weiter als auswertbar angesehen.

Außerdem bleibt die Tatsache bestehen, dass die Tiere der Trainingskohorte trotz nur eingeschränkt bewertbarem Belastungstest das Training an den übrigen Tagen der Woche absolviert und somit im Durchschnitt ca. 7km während der vier Trainingswochen zurückgelegt haben, während die Vergleichskohorte die gesamten vier Wochen in einem Käfig verbrachte. Auch wenn also nicht zu beurteilen ist, ob sich die Belastungsfähigkeit der Tiere durch das Training verändert hat, scheint es durchaus lohnenswert das Gewebe der Tiere beziehungsweise echokardiographische Daten auf Anpassungsprozesse an das absolvierte Training zu untersuchen.

#### **5.4 Einfluss von Belastungstraining auf die kardiale Funktion**

Die grundsätzlichen Unterschiede der echokardiographisch gemessenen kardialen Funktion zwischen WT, Mlp-KO und DKO Tieren wurde zu Anfang bereits beschrieben. Im Folgenden soll es um die Entwicklung der kardialen Funktion zwischen der 11. und 15. Lebenswoche gehen und welchen möglichen Effekt das Belastungstraining auf diese Entwicklung ausübt.

Da sich der kardiale Phänotyp der Mlp-KO Mäuse innerhalb der ersten Lebenswochen entwickelt, sollte durch Untersuchungen einer Vergleichsgruppe untrainierter Tiere ein möglicher Einfluss der grundlegenden Entwicklung bzw. Alterung der Tiere ausgeschlossen werden. Hier sieht man, dass zwischen der 11. und 15. Lebenswoche bei keinem der genannten Genotypen eine signifikante Veränderung der LVEF, FS oder des enddiastolischen Volumens mehr stattfindet, die kardiale Funktion also stabil bleibt.

Das Training konnte keine signifikanten Veränderungen der LVEF, weder bei Mlp-KO noch bei DKO oder WT Tieren hervorrufen. Bisherige Veröffentlichungen in Bezug auf DCM-Patienten zeigen heterogene Ergebnisse was die Auswirkungen von Training insbesondere auf die LVEF angeht. Holloway et al. ließen DCM-Patienten acht Wochen lang trainieren und konnten anschließend einen Anstieg der Ruhe LVEF um 16% nachweisen<sup>122</sup>. Auch Stolen et al. zeigten anhand von fünfmonatigem Training eine signifikante Steigerung der EF<sup>126</sup>. Demgegenüber berichten Myers et al., dass es keine Veränderungen der LVEF, des enddiastolischen oder endsystolischen Volumens nach achtwöchigem Training gab. Einen positiven Trainingseffekt stellten sie allerdings bei der Relaxationsgeschwindigkeit des Ventrikels bei der Trainingskohorte fest, welche sie mit einer verbesserten diastolischen Füllung assoziierten<sup>123</sup>.

Eine durchgeführte Metaanalyse mit insgesamt über 400 eingeschlossenen Patienten welche unter Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF) litten zeigte außerdem, dass Training zwar die körperliche Belastbarkeit sowie die Lebensqualität verbessert, aber keine signifikante Verbesserung der LV-systolischen oder diastolischen Funktion bewirkte<sup>160</sup>.

Eine signifikante Verbesserung zeigte sich im Rahmen dieser Arbeit bei Betrachtung des Schlagvolumens der Mlp-KO Kohorte und bei zusätzlicher MPO-Defizienz ist einer Steigerung der Fraktionellen Verkürzung der Tiere nach Abschluss des Trainings festzustellen.

Interessant ist außerdem neben dem Vergleich der Mittelwerte der Kohorten, der Vergleich in der Entwicklung jedes einzelnen Tieres unter dem Training. Hierbei fällt bei der Betrachtung des Schlagvolumens auf, dass bei jeder Mlp-KO Maus, ob mit oder ohne MPO-Defizienz eine Verbesserung des Schlagvolumens nach Abschluss des Trainingsperiode zu verzeichnen ist. Als zwischenzeitliches Fazit ist also festzuhalten, dass die Steigerung der  $V(O_2)_{max}$  von DCM-Patienten als Bruttokriterium der kardiopulmonalen metabolischen Kapazität durch Ausdauertraining unumstritten ist. Weiterhin ist in dieser Arbeit klar deutlich geworden, dass die kardiale Funktion von Mlp-KO und DKO im Vergleich zu WT Tieren zwar unterschiedlich ist, sich durch vierwöchiges Training aber nur bedingt beeinflussen lässt und auch diese Feststellung stimmt zumindest mit einem Teil der aktuelle heterogenen Studienergebnisse überein. Wenn also nicht die Verbesserung der kardialen Funktion der Grund für die Steigerung der  $V(O_2)_{max}$  ist, liegt die Vermutung nahe, dass der Grund hierfür extrakardial liegen muss.

## 5.5 Die Verteilung der Myeloperoxidase im Gewebe

Pathophysiologisch gibt es vielfach nachgewiesene Zusammenhänge zwischen verstärkten inflammatorischen Prozessen und der Herzinsuffizienz. Erhöhte Serum Zytokin Spiegel, die verstärkte Expression inflammatorischer Marker im Myokard und die vermehrte Produktion von ROS sind nur einige erwähnenswerten Merkmale<sup>38,161</sup>. Unklar bleibt in vielen Fällen der genaue mechanistische Zusammenhang beziehungsweise auch die Frage, ob der erhöhte Grad der Inflammation Ursprung oder Folge der Herzinsuffizienz ist. In dieser Arbeit wird daher insbesondere auf die Myeloperoxidase eingegangen. Um nur einige der Studien zum Zusammenhang zwischen MPO und kardiovaskulären Erkrankungen erneut aufzugreifen gilt zu nennen, dass Untersuchungen erhöhte MPO-Plasmaspiegel bei Patienten die an Vorhofflimmern leiden zeigten, dass ein höheres Risiko für die Endpunkte Tod und nicht letaler Myokardinfarkt bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom und hohen MPO-Spiegeln nachgewiesen ist und, dass erhöhte MPO-Spiegel bei Patienten mit verminderter linksventrikulärer Ejektionsfraktion vorliegen<sup>76,89</sup>. Hervorzuheben gilt insbesondere die positive Korrelation zwischen MPO-Plasmaspiegeln und dem NYHA-Stadium der Herzinsuffizienz, da das NYHA-Stadium direkt die Belastbarkeit von Patienten widerspiegelt<sup>90</sup>.

Die in dieser Arbeit gemessenen MPO-Plasmaspiegel konnten die zuvor beschriebenen Korrelationen nicht widerspiegeln, im Gegenteil bei den Mlp-KO Tieren konnte signifikant weniger MPO im Plasma nachgewiesen werden als bei WT Tieren. Umgekehrt verhielt sich das Verhältnis der Menge des peripher an die Gefäßwand gebundenen MPO, hier waren signifikant höhere Mengen bei den Mlp-KO Tieren nachweisbar. Ein möglicher Grund für die erhöhte an das Endothel gebundenen MPO-Konzentration bei den Mlp-KO Tieren ist das durch die Herzinsuffizienz verstärkt aktivierte RAAS. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten bereits zeigen, dass bei den Mlp-KO Tieren ein grundsätzlich erhöhter Angiotensin II Spiegel als Zeichen des verstärkt aktivierten RAAS vorliegt und dass Angiotensin II die verstärkte Ausschüttung von MPO vermittelt.

Die Myeloperoxidase bindet, nachdem sie von aktivierten Neutrophilen sezerniert wurde mit hoher Affinität an das Endothel der Gefäße und führt dort zur endothelialen Dysfunktion, wobei insbesondere der Verbrauch von Stickstoffmonoxid zu nennen ist, durch den es zur Steigerung des peripheren Gefäßwiderstandes kommt<sup>162</sup>.

Dargestellt wurde diese endotheliale Dysfunktion im murinen Modell der DCM durch weitere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe. Explantierte Aortenringe von Mlp-KO Tieren zeigten in Anwesenheit von MPO eine verringerte Relaxation, wenn sie Acetylcholin ausgesetzt wurden im Vergleich zu MPO defizienten Tieren. Mechanistisch ist dies wie folgt zu erklären: bei Mlp-KO Tieren wurden erniedrigte Spiegel des zyklischen Guanosinmonophosphates (cGMP) festgestellt, bei zusätzlichem Mpo-KO zeigten die Spiegel gleiche Werte wie bei WT Tieren. Das

cGMP ist ein Messenger-Molekül welches synthetisiert wird, wenn NO an den Hormonrezeptor Guanylatzyklase bindet. Es aktiviert wiederum die Proteinkinase-I, dies führt zur Relaxation glatter Muskelzellen und somit zur Dilatation von Gefäßen<sup>163,164</sup>. Die erhöhte Konzentration von MPO im Bereich des Endothels, führt also kurz zusammengefasst zu einer herabgesetzten Bioverfügbarkeit von NO, wodurch weniger cGMP gebildet wird und weniger Relaxation der glatten Muskelzellen der Gefäßwand stattfindet. Unter anderem dadurch kommt es zu dem erhöhten peripheren vaskulären Widerstand der Mlp-KO Tiere, welcher bei zusätzlicher MPO-Defizienz wieder deutlich, beinahe auf das Niveau von WT Tieren reduziert wird.

Die im Rahmen dieser Arbeit bei den Mlp-KO Tieren festgestellten erhöhten Spiegel der peripher abgelagerten MPO können über den oben genannten Mechanismus also in direkten Zusammenhang mit der schlechteren linksventrikulären Funktion und der schlechteren Belastungsfähigkeit der Tiere gesetzt werden. Die Erhöhung des peripheren vaskulären Widerstandes führt zur Erhöhung der Nachlast, die verminderte Bioverfügbarkeit von NO führt außerdem über verstärkte Vasokonstriktion zu verminderter Perfusion der Skelettmuskulatur.

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der Myeloperoxidase im Zusammenhang mit den positiven Effekten von regelmäßigem körperlichen Belastungstraining bei DCM-Patienten zu untersuchen. Richter et al. konnten durch Ausdauertraining von Patienten mit erhöhten kardiovaskulären Risikofaktoren nicht nur die Steigerung der Belastungsfähigkeit, sondern auch eine Reduktion der MPO-Plasmaspiegel nachweisen. Diese Reduktion korrelierte mit einer Steigerung des cGMP-Plasmaspiegels, welcher wie bereits erwähnt die NO-Bioverfügbarkeit des Endothels widerspiegelt<sup>165</sup>. Studien konnten außerdem zeigen, dass Training von herzinsuffizienten Mäusen zu einer signifikanten Reduktion der Angiotensin II Konzentration, repräsentative für das RAAS führt, begleitet von Verbesserungen der kardialen Funktion und Ausdauerleistung<sup>165</sup>.

Daher folgten in Anschluss an das abgeschlossene Training wiederum die Gewebeuntersuchungen bezogen auf die Verteilung der Myeloperoxidase. Die frei im Blutplasma zirkulierende Menge an MPO zeigte einen Trend sowohl bei WT als auch bei Mlp-KO Tieren zur sinkenden MPO-Konzentration, auch wenn die Werte keine statistische Signifikanz erreichten (WT untrainiert vs trainiert:  $p=0,0898$ ; Mlp-KO untrainiert vs trainiert:  $p=0,0924$ ). Wiederrum interessant war hier die Betrachtung des peripher abgelagerten MPO, bei den Mlp-KO Tieren war eine signifikante Reduktion der nach Abschluss des Trainings gemessenen Konzentration nachzuweisen ( $p=0,0002$ ).

Ein denkbarer mechanistischer Zusammenhang wäre in diesem Fall also, dass regelmäßiges Belastungstraining unter anderem durch Herabregulierung der Aktivität des RAAS und die daher reduzierte Konzentration von Angiotensin II zu verminderter Ausschüttung von MPO und somit auch verminderter Ablagerung am Endothel führt, dies wiederum hat eine Verbesserung

der endothelialen Dysfunktion und weiterführend die Senkung des erhöhten peripheren vasculären Widerstandes zur Folge. Die somit verminderte Nachlast wäre eine Erklärung für die durch Belastungstraining vielfach nachgewiesene Verbesserung der Belastungsfähigkeit und würde die Rolle von MPO in diesen komplexen Prozessen weiter beleuchten.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die beobachtete Reduktion der MPO-Spiegel aufgrund der eingeschränkten Beurteilbarkeit der Belastungstests während des Trainings leider nicht in Zusammenhang mit einer Verbesserung der Ausdauerleistung gebracht werden. Trotzdem gilt es zu erwähnen, dass lediglich die MPO defizienten Tieren, ob mit oder ohne zusätzlichen Mlp-KO in der Lage waren, ihr Ausdauerleistung im Rahmen des wöchentlichen Belastungstests wenn auch nicht zu steigern, zumindest zu erhalten. Ob diese Beobachtung tatsächlich durch die nicht vorhandene periphere MPO-Ablagerung zu erklären ist, gilt durch weiterführende Untersuchungen zu klären.

## **5.6 MLP-Phänotyp der Skelettmuskulatur und Einfluss von Training auf die Neoangiogenese**

Die Herzinsuffizienz ist eine Erkrankung, welche letztendlich dazu führt, dass das Herz nicht mehr dazu in der Lage ist, den Sauerstoff entsprechend der Anforderungen des Gewebes zu liefern, unter anderem in die Skelettmuskulatur. Das Projekt SICA-HF konnte durch Biopsien der Skelettmuskulatur von über 1400 Patienten, die unter chronischer Herzinsuffizienz leiden die Sarkopenie, also den Schwund von Skelettmuskulatur als häufige Komorbidität der chronischen HI identifizieren. Bei über 20% der Patienten konnte diese Beobachtung gemacht werden, sie ging einher mit einer verminderten LVEF,  $V(O_2)_{max}$  und maximaler Ausdauerleistung<sup>166</sup>.

Die Identifizierung der Sarkopenie als häufige Komorbidität, gemeinsam mit der bereits gewonnen Erkenntnis, dass die Mlp-KO Tiere eine reduzierte Belastungsfähigkeit aufweisen führt zu der Frage, welche Veränderungen in der Skelettmuskulatur der Mlp-KO Tiere vorliegen. Bisher wurde das Muscle Lim Protein im murine Modell der DCM lediglich in Bezug auf seine Rolle in den Kardiomyozyten betrachtet, aufgrund der dramatischen phänotypischen Auswirkung liegt genau hier auch der Hauptfokus der aktuellen Forschung.

Nichtsdestotrotz konnte eine veränderte Expression des MLP auch bei verschiedenen Skelettmuskelerkrankungen nachgewiesen werden, unter anderem der Fazio-skapulo-humeralen Muskeldystrophie (FSHD), der Nemalin-Myopathie oder der Gliedergürteldystrophie Typ 2b<sup>103</sup>. Die Ursache der veränderten Expression ist bisher ungeklärt.

Arber et al. beschrieben die Rolle des MLP in der Skelettmuskulatur in ihren primären Veröffentlichungen zu der Mlp-KO Maus wie folgt: die Expression des MLP ist zum Zeitpunkt der Geburt von WT Tieren in der gesamten quergestreiften Muskulatur mit Ausnahme des Schnauzenmuskels (*M. incisivus*) nachweisbar. Während die Expression in den Kardiomyozyten

während der weiteren Entwicklung konstant bleibt, nimmt sie in der Skelettmuskulatur während der ersten zwei Lebenswochen kontinuierlich ab und ist im Erwachsenenalter der Tiere nur noch mit sehr niedrigen Werten nachzuweisen. In vivo Untersuchungen zeigten in der Skelettmuskulatur von Mlp-KO Tieren qualitativ ähnliche Schädigungsmuster wie sie in den Kardiomyozyten vorliegen, wenn auch in deutlich geringerem Ausmaß. Strukturell fiel besonders eine deutliche Schwellung der einzelnen Muskelfasern auf. Als Grund für die geringeren Auswirkungen des Mlp-KO auf die Funktion der Skelettmuskulatur wird die geringere Anzahl von Sarkomer Befestigungsstellen pro Sarkomer im Vergleich zu der Struktur von Kardiomyozyten aufgeführt. Außerdem besteht im Skelettmuskel ein deutlich höherer Grad an zytoplasmatische Organisation und die Skelettmuskulatur ist nicht der gleichen, dauerhaften Belastung wie das Myokard ausgesetzt<sup>105</sup>.

Willmann et al. hingegen zeigten durch in vivo Experimente an ausgewachsenen Ratten, dass das MLP in ähnlichen Mengen in Kardiomyozyten und dem M. soleus (slow-twitch Fasern, Typ I) vorhanden, jedoch nicht in Typ-II Fasern (fast-twitch Fasern) nachzuweisen ist. Außerdem konnten sie zeigen, dass eine Umwandlung von Typ II zu Typ I Fasern z.B. durch dauerhafte, milde Stimulation der Muskulatur zur Expression von MLP führt.

Auch wenn also strukturelle Unterschiede in der Skelettmuskulatur von Mlp-KO Tieren gefunden wurden, ist das Ausmaß der Schädigung und vor allem die Auswirkung und eine möglicherweise herabgesetzte funktionelle Leistung der Skelettmuskulatur nicht ausreichend geklärt. Untersuchungen der Hinterlauf Muskulatur der Mäuse dienen in dieser Arbeit der weiteren Charakterisierung des Phänotyps des Mlp-KO bezogen auf die Skelettmuskulatur. Können Ursachen für die nachgewiesene herabgesetzte Belastungsfähigkeit der Tiere nicht nur kardial, sondern auch hier beobachtet werden? Insbesondere die Auswirkung einer zusätzlichen MPO-Defizienz gilt es zu untersuchen. Es stellt sich die Frage, ob die Abwesenheit von MPO durch bekannte Prozesse wie einer Minderung der Produktion von ROS oder die Erhöhung der Bioverfügbarkeit von NO nicht nur einer Verbesserung der kardialen Funktion, sondern auch strukturelle Veränderungen in der Skelettmuskulatur hervorruft, welche wiederum mit der verbesserten kardialen Funktion der DKO-Tiere, sowie mit ihrer Fähigkeit die maximale Laufzeit während der Trainingsperiode aufrecht zu erhalten, in Verbindung gebracht werden könnte?

Zunächst erfolgte die Betrachtung der Dichte der Kapillaren des M. soleus der Tiere. Hierzu wurden Muskelquerschnitte immunhistochemisch mit einem CD31-Antikörper gefärbt. CD31, auch bekannt als Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül (PECAM-1) wird unter anderem auf Endothelzellen exprimiert, insbesondere an der Verbindungsstelle benachbarter Zellen.

Studien konnten bei Herzinsuffizienz Patienten eine verminderte Kapillardichte in der Skelettmuskulatur nachweisen, welche mit der erniedrigten  $V(O_2)_{max}$  korrelierte<sup>167</sup>. Außerdem wird

ein erniedrigtes Verhältnis von Kapillaren zu Muskelfasern, sowie ein erniedrigter Durchmesser der Kapillaren beschrieben<sup>168</sup>. Eine unterschiedliche Dichte der Kapillaren von MPO kompetenten und naiven Mlp-KO Tieren wäre denkbar, da in Anwesenheit von MPO über die bereits erwähnten Mechanismen, vor allem die verminderte Bioverfügbarkeit von NO eine verstärkte periphere Vasokonstriktion stattfindet, welche in der Muskulatur zu lokaler Ischämie führt.

Die immunhistochemische Färbung der Muskelquerschnitte konnte allerdings keine Unterschiede in der Zahl der Kapillaren pro Muskelfaser darstellen. Auch konnte keine Steigerung, weder in WT Tieren noch in Mlp-KO Tieren durch Training nachgewiesen werden. Ein möglicher Grund hierfür könnte eine zu geringe Sensitivität der Methode sein. Auch denkbar wäre ein zu kurzer Untersuchungszeitraum und eine somit zu kurze Trainingsperiode, um Unterschiede nachweisen zu können. Für die zweite Möglichkeit spricht die Betrachtung der Expression des vascular endothelial growth factors (VEGF) im M. gastrocnemius der Tiere. Hier zeigt sich eine signifikante Steigerung der Expression durch das Training bei WT ( $p=0,014$ ) und DKO-Tieren ( $p=0,0117$ ), bei den Mlp-KO Tieren war der Unterschied allerdings nur als Tendenz darstellbar und nicht signifikant. Die gesteigerte Expression des VEGF als Protein, das als Signalmolekülen die Proliferation von Endothelzellen stimuliert und somit zur Angiogenese beiträgt, kann als Hinweis gesehen werden, dass das Training doch eine verstärkte Vaskularisierung induziert, welche sich lediglich noch nicht in der Kapillardichte widerspiegelt.

Interessant ist außerdem die Tatsache, dass VEGF über den Transkriptionsfaktor hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1  $\alpha$ ) induziert wird<sup>169</sup>. HIF, eine Heterodimer aus einer alpha und einer beta Untereinheit ist ein Transkriptionsfaktor, welcher wichtig ist für die Reaktion von Zellen auf Zustände, bei denen ein erniedrigtes Sauerstoffangebot herrscht. Dies ist z.B. der Fall in der Skelettmuskulatur während des Ausdauertrainings, da das Training zu einem erhöhten Bedarf und Verbrauch von Sauerstoff in den Muskelfasern führt. Der HIF-Proteinspiegel wiederum wird durch eine erhöhte Konzentration an reaktiver Sauerstoffspezies stabilisiert. Die Induktion von VEGF durch HIF nach Belastungstraining und eine anschließend gesteigerte Angiogenese konnte bereits vielfach durch in vitro und in vivo Untersuchungen nachgewiesen werden<sup>170,171</sup>. Die resultierende Frage ist also, wieso das Training lediglich bei den Mlp-KO Tieren in Abwesenheit von MPO eine signifikant gesteigerte Expression von VEGF auslöst, wie sie auch bei den WT Tieren zu beobachten ist und nicht bei den MPO naiven Tieren? Eine mögliche Erklärung basiert auf neueren Untersuchungen die zeigen, dass die beschriebene Induktion von HIF durch ROS von der Konzentration der ROS abhängig ist. Stark erhöhte ROS-Spiegel führen nicht wie bisher beschrieben zu Induktion, sondern zu Inhibition von HIF-1  $\alpha$  und führen somit zu im Vergleich erniedrigten VEGF-Proteinspiegeln, was mit einer verminderten Angiogenese einhergeht<sup>172</sup>. Denkbar wäre also, dass in der Skelettmuskulatur der Mlp-KO Tiere durch die Kombination aus durch die HI vermittelte Minderperfusion der

Muskelfasern, sowie einem generell erhöhten inflammatorischen Status und dem noch zusätzlich durch das Training erhöhten Sauerstoffbedarf und -verbrauch eine außergewöhnlich stark erhöhte Konzentration an ROS herrscht, welche die HIF und somit die VEGF-Expression unterdrückt. Die genannten, zu erhöhter ROS-Konzentration führenden Prozesse werden durch die Abwesenheit von MPO moduliert. Der periphere vaskuläre Widerstand sinkt, die Perfusion der Muskulatur wird erhöht und der inflammatorische Status wird reduziert, sodass ein lediglich physiologisch erhöhter Spiegel an ROS wieder pro-angiogenetisch wirken kann.

Oxidativer Stress, unter anderem repräsentiert durch die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies wurde lange Zeit als rein schädlicher Faktor für die Skelettmuskulatur betrachtet. Mit der Zeit traten allerdings immer mehr Hinweise auf, die belegen, dass ROS in Konzentrationen, welche unter physiologischen Bedingungen entstehen eine wichtige Rolle bei der Muskelregeneration und -reparatur spielen. Allerdings führt die lokale Persistenz von ROS, unter anderem vermittelt durch die vermehrte Einwanderung von neutrophilen Granulozyten zu oxidativen Schäden an sich differenzierenden Myoblasten und Myotuben<sup>173</sup>. Generell lässt sich sagen, dass es positive und negative Auswirkung der ROS gibt, welche vor allem von der Konzentration und der Dauer der vorherrschenden Konzentration, aber auch von dem Entstehungsort der ROS, der antioxidativen Kapazität der Zielzelle und ihrer Kapazität für DNA-Reparaturvorgänge abhängt<sup>173</sup>. Anschaulich dargestellt ist dies durch das Modell nach Reid, welches den Einfluss des zellulären Redoxstatus auf die kontraktile Funktion des Skelettmuskels beschreibt. Leicht erhöhte Spiegel an ROS, wie sie unter moderater Ausdauerleistung generiert werden führen zu einer optimalen isometrischen Kraftentwicklung der Skelettmuskulatur. Stark erhöhte ROS-Spiegel, wie sie in erschöpfter Muskulatur oder bei verschiedenen Erkrankungen welche mit inflammatorischen Prozessen assoziiert sind wie auch der HI vorliegen, führen zu einer Abnahme der maximal möglichen Kraftentwicklung<sup>174</sup>.

## **5.7 Bedeutung von Belastungstraining und von MPO für die Mitochondrien**

Außerdem führen ROS, welche durch moderates Belastungstraining generiert werden zur Aktivierung der Mitochondriogenese. Aber bei höheren und vor allem länger anhaltenden Konzentrationen kommt es zur Schädigung der mitochondrialen DNA und somit zu Hemmung der myogenen Differenzierung<sup>175</sup>. Diese Zusammenhänge führen zu der abschließenden Fragestellung dieser Arbeit bezüglich der Expression mitochondrialer Marker in der Skelettmuskulatur. Die Feststellung, dass die Konzentration an ROS Einfluss auf die Aktivität und Dichte von Mitochondrien hat legt nahe, dass der Mip-KO eine Veränderung in der Aktivität der Mitochondrien der Skelettmuskulatur auslöst, welche eventuell durch die Abwesenheit von MPO oder ein regelmäßiges Belastungstraining beeinflusst werden könnte.

Die Funktion der Mitochondrien kurz zusammengefasst ist die Produktion von Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) durch die sogenannte Atmungskette, eine Elektronentransportkette, bei der in einer bestimmten Reihenfolge Redoxreaktionen stattfinden.

Untersuchungen kardialen Gewebes von DCM-Patienten konnten myokardial bereits eine gestörte Aktivität der Mitochondrien nachweisen und auch bei den Mlp-KO Tiere zeigen Studien eine verminderte kardiale Mitochondriendichte, was als Zeichen für eine gestörte Interaktion zwischen dem Zytoskelett und den Mitochondrien interpretiert wurde und mit einer Schwächung des Energiestoffwechsel einhergeht<sup>176</sup>.

Untersuchungen identifizierten die Störungen des Metabolismus der Mitochondrien insbesondere als eines der ersten Zeichen der eingeschränkten Funktion der Skelettmuskulatur bei HI Patienten<sup>177</sup>. Ein gestörter Metabolismus der Mitochondrien führt unter anderem zu Reduktion der Sauerstoffaufnahme der Myozyten, Dysregulation der Kalzium-Homöostase, überschießender Produktion an von Mitochondrien produzierten ROS und Apoptose<sup>178,179</sup>.

Untersuchung bezüglich der Mitochondriendichte oder -aktivität in der Skelettmuskulatur von Mlp-KO Tiere, insbesondere unter dem Einfluss von Belastungstraining gibt es zum aktuellen Zeitpunkt nicht.

Um dies zu untersuchen wurde im Rahmen dieser Arbeit die Expression verschiedene Marker der mitochondrialen Atmungskette im M. gastrocnemius durch Quantifizierung der RNA mittels qPCR dargestellt. COX4i ist eine von 13 Untereinheiten der Cytochrom-c-Oxidase, ein Enzymkomplex welcher auch als Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette bezeichnet wird. UQCRC1 ist eine Untereinheit des Ubiquinol-Cytochrom-c-Reduktase Komplex, auch bekannt als Komplex III der mitochondrialen Atmungskette. Die SDHA ist eine der vier Untereinheiten der Succinatdehydrogenase, also dem Komplex II der Atmungskette.

Interessanterweise zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression der RNA der COX4i, UQCRC1 und SDHA in der Skelettmuskulatur von Mlp-KO Tieren im Vergleich zu WT Tieren, welche bei zusätzlicher MPO-Defizienz wieder auf das Niveau der WT Tiere zurückkehrt. Dies könnte als ein Hinweis auf einen gestörten Energiemetabolismus bei den Mlp-KO Tieren zu werten sein, wobei die Überexpression der Marker der mitochondrialen Atmungskette, als Versuch der Myozyten anzusehen ist, dem hohen Energiebedarf des Gewebes trotzdem gerecht zu werden. Unterstützt wird diese Theorie durch Untersuchungen von Karamanlidis et al. welche den Übergang von kompensierter Rechtsherzhypertrophie zu dekompensierter Rechtsherzinsuffizienz charakterisierten. Im Stadium der dekompenzierten Rechtsherzinsuffizienz zeigten sich die bereits auch für die chronische Herzinsuffizienz beschriebenen Merkmale wie eine verringerte mitochondriale Enzymaktivität. Allerdings war die Expression der RNA im Stadium der noch kompensierten Rechtsherzhypertrophie stark erhöht und erst im Stadium der dekompenzierte Rechtsherzinsuffizienz erniedrigt, was auch hier als Versuch der Zelle interpretiert wurde, die Funktion der Mitochondrien lange genug aufrecht zu erhalten<sup>180</sup>. Natürlich

sind um diesen Zusammenhang zu bestätigen weitere Untersuchungen bezüglich der tatsächlichen Dichte der Mitochondrien, sowie der Enzymaktivität notwendig.

Die auf das Niveau der WT Tiere normalisierte Expression der Marker in der Skelettmuskulatur der DKO Tiere kann weiterführend interpretiert werden als Zeichen für einen verbesserten Energiemetabolismus in Abwesenheit von MPO. Wichtig zu erwähnen ist in diesem Zusammenhang, dass Mitochondrien empfindlich gegenüber oxidativem Stress sind. Bei den Mlp-KO herrscht in Abwesenheit von MPO weniger oxidativer Stress, unter anderem durch bereits erläuterte Mechanismen wie eine geringe Produktion von ROS, erhöhte Bioverfügbarkeit von NO und somit einer verbesserten Durchblutung und Bereitstellung von Sauerstoff.

Um den Einfluss des Trainings beurteilen zu können ist es wichtig klarzustellen, dass die Organentnahme und somit die Gewinnung der Muskelprobe 48h nach dem zuletzt durchgeführten Belastungstest erfolgte. Diese Vorgehensweise stellt sicher, dass die Untersuchung der Genexpression nicht die akute Reaktion des Körpers auf das Training widerspiegelt, sondern langfristige Anpassungsprozesse darstellt.

Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Reduktion der Expression von COX4i in der Skelettmuskulatur der Mlp-KO Tiere durch das Training. Auch zeigte sich eine deutliche Reduktion der Expression von UQCRC1 und SDHA, auch wenn diese Ergebnisse keine statistische Signifikanz erreichten. Bei zusätzlicher Abwesenheit von MPO zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Expression von UQCRC1 und SDHA, also ein genau gegenläufiger Prozess. Geht man davon aus, dass die anfängliche Überexpression der Marker als ein Zeichen des gestörten Energiemetabolismus zu bewerten ist, zeigt sich durch die Reduktion der Überexpression also eine positive Auswirkung des vierwöchentlichen Belastungstrainings.

Das Training hat wie bereits nachgewiesen die periphere MPO-Ablagerung bei den Mlp-KO Tieren gesenkt und könnte so unter anderem zu Anpassungsprozessen wie der Reduktion des peripheren vaskulären Widerstandes und einer Verbesserung der Perfusion der Muskulatur führen. Dies wiederum könnte den Energiestoffwechsel der Muskulatur verbessern, wodurch die Überexpression der mitochondrialen Marker nicht mehr notwendig wäre.

## **5.8 Ausblick für die Zukunft**

Diese Arbeit identifiziert MPO als einen potentiellen Ansatzpunkt um die positiven Effekte von Belastungstraining bei DCM-Patienten besser zu verstehen und in Zukunft eventuell sogar als therapeutisches Ziel zu nutzen.

Wichtige weiterführende Untersuchungen im Rahmen des murinen Modells der DCM wären definitiv Studien, die eindeutig eine Verbesserung der Belastungsfähigkeit der Tiere durch das Training zeigen und eventuelle Unterschiede durch die Abwesenheit von MPO charakterisieren. Umsetzbar wäre dies zum Beispiel durch Verwendung eines Laufbandes, das in der Lage ist während des Trainings die Aufnahme von Sauerstoff und den Ausstoß von

Kohlenstoffdioxid der Tiere zu messen, um so Veränderungen der  $V(O_2)_{max}$  zu bestimmen. Des Weiteren wäre die Bestimmung des peripheren vaskulären Widerstandes der Tiere vor und nach dem Training notwendig um die in dieser Arbeit angenommene Auswirkung der peripheren MPO-Ablagerung zu bestätigen.

Auch ist es natürlich von Bedeutung zu sagen, dass eine direkte Übertragung der im murinen Modell gesammelten Erkenntnisse auf DCM-Patienten nur unter Einschränkungen möglich ist. Es gibt einige grundlegende Unterschiede zwischen dem Immunsystem der Maus und dem des Menschen, unter anderem unterschiedliche Subtypen von Monozyten und Makrophagen. Untersuchungen zur Verteilung von MPO im peripheren Gefäßsystem und Skelettmuskel bei der humanen DCM, sowie Anpassungen, die durch Belastungstraining ausgelöst werden und deren Auswirkung wie die Veränderung des peripheren Widerstandes, die Beeinflussung von pro- und antiinflammatorischen Prozessen und die Verbesserung der endothelialen Dysfunktion wären die nun folgenden wichtigen Schritte.

Interessant in diesem Versuchsaufbau wäre selbstverständlich auch die Anwendung eines humanen MPO-Inhibitors. Versuche unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die Einnahme des oralen MPO Inhibitors AZD4831 über den Zeitraum von zwölf Wochen zu einer signifikanten Verlängerung der 6-Minuten Gehstrecke, zur Reduktion des NTproBNP Serumspiegels und letztendlich zu einer Steigerung der LVEF bei vier Patienten, die an einer DCM leiden führte. Die Durchführung eines Trainingsprogrammes mit DCM-Patienten während der zeitgleichen Einnahme des oralen MPO-Inhibitors wäre ungemein interessant um nicht nur die Rolle der Myeloperoxidase in Rahmen der dilatativen Kardiomyopathie besser zu verstehen, sondern auch den Mechanismus hinter den positiven Effekten von Belastungstraining weiter aufzuklären.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Report of the WHO/ISFC task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *British Heart Journal* 1980; **44**(6): 672-3.
2. Richardson P, McKenna W, Bristow M, et al. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* 1996; **93**(5): 841-2.
3. Caforio AL, Pankuweit S, Arbustini E, et al. Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of myocarditis: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J* 2013; **34**(33): 2636-48, 48a-48d.
4. Codd MB, Sugrue DD, Gersh BJ, Melton LJ, 3rd. Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy. A population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1975-1984. *Circulation* 1989; **80**(3): 564-72.
5. Williams DG, Olsen EG. Prevalence of overt dilated cardiomyopathy in two regions of England. *Br Heart J* 1985; **54**(2): 153-5.
6. Miura K, Nakagawa H, Morikawa Y, et al. Epidemiology of idiopathic cardiomyopathy in Japan: results from a nationwide survey. *Heart* 2002; **87**(2): 126-30.
7. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, et al. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* 2006; **113**(14): 1807-16.
8. George A, Figueredo VM. Alcoholic cardiomyopathy: a review. *J Card Fail* 2011; **17**(10): 844-9.
9. Monda E, Palmiero G, Rubino M, et al. Molecular Basis of Inflammation in the Pathogenesis of Cardiomyopathies. *Int J Mol Sci* 2020; **21**(18).
10. Weisleder H, Jacobson E, Frishman WH, Dhand A. Cardiac Manifestations of Viral Infections, Including COVID-19: A Review. *Cardiol Rev* 2022.
11. Kuhl U, Pauschinger M, Noutsias M, et al. High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction. *Circulation* 2005; **111**(7): 887-93.
12. van Spaendonck-Zwarts KY, van Rijsingen IA, van den Berg MP, et al. Genetic analysis in 418 index patients with idiopathic dilated cardiomyopathy: overview of 10 years' experience. *Eur J Heart Fail* 2013; **15**(6): 628-36.
13. Millat G, Bouvagnet P, Chevalier P, et al. Clinical and mutational spectrum in a cohort of 105 unrelated patients with dilated cardiomyopathy. *Eur J Med Genet* 2011; **54**(6): e570-5.
14. Grunig E, Tasman JA, Kucherer H, Franz W, Kubler W, Katus HA. Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1998; **31**(1): 186-94.
15. Michels VV, Moll PP, Miller FA, et al. The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1992; **326**(2): 77-82.
16. Haas J, Frese KS, Peil B, et al. Atlas of the clinical genetics of human dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2015; **36**(18): 1123-35a.
17. Herman DS, Lam L, Taylor MR, et al. Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2012; **366**(7): 619-28.
18. Orphanou N, Papatheodorou E, Anastasakis A. Dilated cardiomyopathy in the era of precision medicine: latest concepts and developments. *Heart Fail Rev* 2021.
19. Mathew T, Williams L, Navaratnam G, et al. Diagnosis and assessment of dilated cardiomyopathy: a guideline protocol from the British Society of Echocardiography. *Echo Res Pract* 2017; **4**(2): G1-G13.
20. Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation* 1991; **83**(6): 1849-65.
21. Palmer RM, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; **153**(3): 1251-6.

22. Harrison DG, Widder J, Grumbach I, Chen W, Weber M, Searles C. Endothelial mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation. *J Intern Med* 2006; **259**(4): 351-63.
23. Landmesser U, Spiekermann S, Dikalov S, et al. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation* 2002; **106**(24): 3073-8.
24. Konstam V, Salem D, Pouleur H, et al. Baseline quality of life as a predictor of mortality and hospitalization in 5,025 patients with congestive heart failure. SOLVD Investigations. Studies of Left Ventricular Dysfunction Investigators. *Am J Cardiol* 1996; **78**(8): 890-5.
25. Towbin JA, Bowles NE. The failing heart. *Nature* 2002; **415**(6868): 227-33.
26. Merlo M, Pivetta A, Pinamonti B, et al. Long-term prognostic impact of therapeutic strategies in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy: changing mortality over the last 30 years. *Eur J Heart Fail* 2014; **16**(3): 317-24.
27. McMurray JJ, Packer M, Desai AS, et al. Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *N Engl J Med* 2014; **371**(11): 993-1004.
28. McMurray JJV, Solomon SD, Inzucchi SE, et al. Dapagliflozin in Patients with Heart Failure and Reduced Ejection Fraction. *N Engl J Med* 2019; **381**(21): 1995-2008.
29. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J* 2021; **42**(36): 3599-726.
30. Pinto YM, Elliott PM, Arbustini E, et al. Proposal for a revised definition of dilated cardiomyopathy, hypokinetic non-dilated cardiomyopathy, and its implications for clinical practice: a position statement of the ESC working group on myocardial and pericardial diseases. *Eur Heart J* 2016; **37**(23): 1850-8.
31. Frustaci A, Russo MA, Chimenti C. Randomized study on the efficacy of immunosuppressive therapy in patients with virus-negative inflammatory cardiomyopathy: the TIMIC study. *Eur Heart J* 2009; **30**(16): 1995-2002.
32. Dziewiecka E, Gliniak M, Winiarczyk M, et al. Mortality risk in dilated cardiomyopathy: the accuracy of heart failure prognostic models and dilated cardiomyopathy-tailored prognostic model. *ESC Heart Fail* 2020; **7**(5): 2455-67.
33. Malkiel S, Kuan AP, Diamond B. Autoimmunity in heart disease: mechanisms and genetic susceptibility. *Mol Med Today* 1996; **2**(8): 336-42.
34. Pankuweit S, Ruppert V, Maisch B. Inflammation in dilated cardiomyopathy. *Herz* 2004; **29**(8): 788-93.
35. Hazebroek MR, Moors S, Dennert R, et al. Prognostic Relevance of Gene-Environment Interactions in Patients With Dilated Cardiomyopathy: Applying the MOGE(S) Classification. *J Am Coll Cardiol* 2015; **66**(12): 1313-23.
36. Triposkiadis F, Karayannis G, Giamouzis G, Skoularigis J, Louridas G, Butler J. The sympathetic nervous system in heart failure physiology, pathophysiology, and clinical implications. *J Am Coll Cardiol* 2009; **54**(19): 1747-62.
37. Murray DR, Prabhu SD, Chandrasekar B. Chronic beta-adrenergic stimulation induces myocardial proinflammatory cytokine expression. *Circulation* 2000; **101**(20): 2338-41.
38. Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 2006; **86**(3): 747-803.
39. Guasch E, Benito B, Nattel S. Exercise training, inflammation and heart failure: working out to cool down. *J Physiol* 2010; **588**(Pt 14): 2525-6.
40. Tatli E, Kurum T. A controlled study of the effects of carvedilol on clinical events, left ventricular function and proinflammatory cytokines levels in patients with dilated cardiomyopathy. *Can J Cardiol* 2005; **21**(4): 344-8.
41. Pagani FD, Baker LS, Hsi C, Knox M, Fink MP, Visner MS. Left ventricular systolic and diastolic dysfunction after infusion of tumor necrosis factor-alpha in conscious dogs. *J Clin Invest* 1992; **90**(2): 389-98.
42. Kleemann R, Zadelaar S, Kooistra T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res* 2008; **79**(3): 360-76.
43. Hedayat M, Mahmoudi MJ, Rose NR, Rezaei N. Proinflammatory cytokines in heart failure: double-edged swords. *Heart Fail Rev* 2010; **15**(6): 543-62.

44. Orus J, Roig E, Perez-Villa F, et al. Prognostic value of serum cytokines in patients with congestive heart failure. *J Heart Lung Transplant* 2000; **19**(5): 419-25.
45. McTiernan CF, Lemster BH, Frye C, Brooks S, Combes A, Feldman AM. Interleukin-1 beta inhibits phospholamban gene expression in cultured cardiomyocytes. *Circ Res* 1997; **81**(4): 493-503.
46. Gielen S, Adams V, Mobius-Winkler S, et al. Anti-inflammatory effects of exercise training in the skeletal muscle of patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2003; **42**(5): 861-8.
47. Haywood GA, Tsao PS, von der Leyen HE, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in human heart failure. *Circulation* 1996; **93**(6): 1087-94.
48. Flesch M, Kilter H, Cremers B, et al. Acute effects of nitric oxide and cyclic GMP on human myocardial contractility. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; **281**(3): 1340-9.
49. Schultz J, Kaminker K. Myeloperoxidase of the leucocyte of normal human blood. I. Content and localization. *Arch Biochem Biophys* 1962; **96**: 465-7.
50. Lau D, Baldus S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacol Ther* 2006; **111**(1): 16-26.
51. Brown KE, Brunt EM, Heinecke JW. Immunohistochemical detection of myeloperoxidase and its oxidation products in Kupffer cells of human liver. *Am J Pathol* 2001; **159**(6): 2081-8.
52. Green PS, Mendez AJ, Jacob JS, et al. Neuronal expression of myeloperoxidase is increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2004; **90**(3): 724-33.
53. Nauseef WM, Malech HL. Analysis of the peptide subunits of human neutrophil myeloperoxidase. *Blood* 1986; **67**(5): 1504-7.
54. Arnljots K, Olsson I. Myeloperoxidase precursors incorporate heme. *J Biol Chem* 1987; **262**(22): 10430-3.
55. Martinez FO, Sironi M, Vecchi A, Colotta F, Mantovani A, Locati M. IL-8 induces a specific transcriptional profile in human neutrophils: synergism with LPS for IL-1 production. *Eur J Immunol* 2004; **34**(8): 2286-92.
56. Heit B, Tavener S, Raharjo E, Kubes P. An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients. *J Cell Biol* 2002; **159**(1): 91-102.
57. Chen Y, Junger WG. Measurement of oxidative burst in neutrophils. *Methods Mol Biol* 2012; **844**: 115-24.
58. Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 2000; **80**(5): 617-53.
59. Fliss H. Oxidation of proteins in rat heart and lungs by polymorphonuclear leukocyte oxidants. *Mol Cell Biochem* 1988; **84**(2): 177-88.
60. Pahwa R, Modi P, Jialal I. Myeloperoxidase Deficiency. StatPearls. Treasure Island (FL); 2021.
61. Nussbaum C, Klinke A, Adam M, Baldus S, Sperandio M. Myeloperoxidase: a leukocyte-derived protagonist of inflammation and cardiovascular disease. *Antioxid Redox Signal* 2013; **18**(6): 692-713.
62. Marquez LA, Dunford HB, Van Wart H. Kinetic studies on the reaction of compound II of myeloperoxidase with ascorbic acid. Role of ascorbic acid in myeloperoxidase function. *J Biol Chem* 1990; **265**(10): 5666-70.
63. Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, et al. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 1998; **391**(6665): 393-7.
64. Aratani Y, Koyama H, Nyui S, Suzuki K, Kura F, Maeda N. Severe impairment in early host defense against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase. *Infect Immun* 1999; **67**(4): 1828-36.
65. Aratani Y, Kura F, Watanabe H, et al. Differential host susceptibility to pulmonary infections with bacteria and fungi in mice deficient in myeloperoxidase. *J Infect Dis* 2000; **182**(4): 1276-9.
66. Hirche TO, Gaut JP, Heinecke JW, Belaaouaj A. Myeloperoxidase plays critical roles in killing *Klebsiella pneumoniae* and inactivating neutrophil elastase: effects on host defense. *J Immunol* 2005; **174**(3): 1557-65.

67. Nunoi H, Kohi F, Kajiwara H, Suzuki K. Prevalence of inherited myeloperoxidase deficiency in Japan. *Microbiol Immunol* 2003; **47**(7): 527-31.
68. Lanza F. Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency. *J Mol Med (Berl)* 1998; **76**(10): 676-81.
69. Eiserich JP, Baldus S, Brennan ML, et al. Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science* 2002; **296**(5577): 2391-4.
70. Rudolph TK, Wipper S, Reiter B, et al. Myeloperoxidase deficiency preserves vasomotor function in humans. *Eur Heart J* 2012; **33**(13): 1625-34.
71. Baldus S, Heitzer T, Eiserich JP, et al. Myeloperoxidase enhances nitric oxide catabolism during myocardial ischemia and reperfusion. *Free Radic Biol Med* 2004; **37**(6): 902-11.
72. Zhang C, Reiter C, Eiserich JP, et al. L-arginine chlorination products inhibit endothelial nitric oxide production. *J Biol Chem* 2001; **276**(29): 27159-65.
73. von Leitner EC, Klinke A, Atzler D, et al. Pathogenic cycle between the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetrical dimethylarginine and the leukocyte-derived hemoprotein myeloperoxidase. *Circulation* 2011; **124**(24): 2735-45.
74. Abdo AI, Rayner BS, van Reyk DM, Hawkins CL. Low-density lipoprotein modified by myeloperoxidase oxidants induces endothelial dysfunction. *Redox Biol* 2017; **13**: 623-32.
75. Wong ND, Gransar H, Narula J, et al. Myeloperoxidase, subclinical atherosclerosis, and cardiovascular disease events. *JACC Cardiovasc Imaging* 2009; **2**(9): 1093-9.
76. Holzwirth E, Kornej J, Erbs S, et al. Myeloperoxidase in atrial fibrillation: association with progression, origin and influence of renin-angiotensin system antagonists. *Clin Res Cardiol* 2020; **109**(3): 324-30.
77. Rudolph V, Andrie RP, Rudolph TK, et al. Myeloperoxidase acts as a profibrotic mediator of atrial fibrillation. *Nat Med* 2010; **16**(4): 470-4.
78. Gururajan P, Gurumurthy P, Nayar P, et al. Serum myeloperoxidase: a novel biomarker for evaluation of patients with acute coronary syndrome. *Heart Asia* 2009; **1**(1): 41-6.
79. Baldus S, Heeschen C, Meinertz T, et al. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2003; **108**(12): 1440-5.
80. Nahrendorf M, Sosnovik D, Chen JW, et al. Activatable magnetic resonance imaging agent reports myeloperoxidase activity in healing infarcts and noninvasively detects the antiinflammatory effects of atorvastatin on ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 2008; **117**(9): 1153-60.
81. Ali M, Pulli B, Courties G, et al. Myeloperoxidase Inhibition Improves Ventricular Function and Remodeling After Experimental Myocardial Infarction. *JACC Basic Transl Sci* 2016; **1**(7): 633-43.
82. Guthoff H, Hof A, Klinke A, et al. Protective Effects of Therapeutic Neutrophil Depletion and Myeloperoxidase Inhibition on Left Ventricular Function and Remodeling in Myocardial Infarction. *Antioxidants (Basel)* 2022; **12**(1).
83. Vasilyev N, Williams T, Brennan ML, et al. Myeloperoxidase-generated oxidants modulate left ventricular remodeling but not infarct size after myocardial infarction. *Circulation* 2005; **112**(18): 2812-20.
84. Askari AT, Brennan ML, Zhou X, et al. Myeloperoxidase and plasminogen activator inhibitor 1 play a central role in ventricular remodeling after myocardial infarction. *J Exp Med* 2003; **197**(5): 615-24.
85. Zhang R, Brennan ML, Fu X, et al. Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *JAMA* 2001; **286**(17): 2136-42.
86. Schrnagl H, Kleber ME, Genser B, et al. Association of myeloperoxidase with total and cardiovascular mortality in individuals undergoing coronary angiography--the LURIC study. *Int J Cardiol* 2014; **174**(1): 96-105.
87. Meuwese MC, Stroes ES, Hazen SL, et al. Serum myeloperoxidase levels are associated with the future risk of coronary artery disease in apparently healthy individuals: the EPIC-Norfolk Prospective Population Study. *J Am Coll Cardiol* 2007; **50**(2): 159-65.
88. Nettersheim FS, Schluter JD, Kreuzberg W, et al. Myeloperoxidase is a critical mediator of anthracycline-induced cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol* 2023; **118**(1): 36.
89. Rudolph V, Rudolph TK, Hennings JC, et al. Activation of polymorphonuclear neutrophils in patients with impaired left ventricular function. *Free Radic Biol Med* 2007; **43**(8): 1189-96.

90. Michowitz Y, Kisil S, Guzner-Gur H, et al. Usefulness of serum myeloperoxidase in prediction of mortality in patients with severe heart failure. *Isr Med Assoc J* 2008; **10**(12): 884-8.
91. Tang WH, Tong W, Troughton RW, et al. Prognostic value and echocardiographic determinants of plasma myeloperoxidase levels in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2007; **49**(24): 2364-70.
92. Tang WH, Katz R, Brennan ML, et al. Usefulness of myeloperoxidase levels in healthy elderly subjects to predict risk of developing heart failure. *Am J Cardiol* 2009; **103**(9): 1269-74.
93. Weiskirchen R, Pino JD, Macalma T, Bister K, Beckerle MC. The cysteine-rich protein family of highly related LIM domain proteins. *J Biol Chem* 1995; **270**(48): 28946-54.
94. Zheng Q, Zhao Y. The diverse biofunctions of LIM domain proteins: determined by subcellular localization and protein-protein interaction. *Biol Cell* 2007; **99**(9): 489-502.
95. Knoll R, Hoshijima M, Hoffman HM, et al. The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell* 2002; **111**(7): 943-55.
96. Louis HA, Pino JD, Schmeichel KL, Pomies P, Beckerle MC. Comparison of three members of the cysteine-rich protein family reveals functional conservation and divergent patterns of gene expression. *J Biol Chem* 1997; **272**(43): 27484-91.
97. Papalouka V, Arvanitis DA, Vafiadaki E, et al. Muscle LIM protein interacts with cofilin 2 and regulates F-actin dynamics in cardiac and skeletal muscle. *Mol Cell Biol* 2009; **29**(22): 6046-58.
98. Heineke J, Ruetten H, Willenbockel C, et al. Attenuation of cardiac remodeling after myocardial infarction by muscle LIM protein-calcineurin signaling at the sarcomeric Z-disc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**(5): 1655-60.
99. Gupta MP, Samant SA, Smith SH, Shroff SG. HDAC4 and PCAF bind to cardiac sarcomeres and play a role in regulating myofilament contractile activity. *J Biol Chem* 2008; **283**(15): 10135-46.
100. Vafiadaki E, Arvanitis DA, Papalouka V, et al. Muscle lim protein isoform negatively regulates striated muscle actin dynamics and differentiation. *FEBS J* 2014; **281**(14): 3261-79.
101. Hoffmann C, Moreau F, Moes M, et al. Human muscle LIM protein dimerizes along the actin cytoskeleton and cross-links actin filaments. *Mol Cell Biol* 2014; **34**(16): 3053-65.
102. Gehmlich K, Geier C, Milting H, Furst D, Ehler E. Back to square one: what do we know about the functions of muscle LIM protein in the heart? *J Muscle Res Cell Motil* 2008; **29**(6-8): 155-8.
103. Vafiadaki E, Arvanitis DA, Sanoudou D. Muscle LIM Protein: Master regulator of cardiac and skeletal muscle functions. *Gene* 2015; **566**(1): 1-7.
104. Arber S, Halder G, Caroni P. Muscle LIM protein, a novel essential regulator of myogenesis, promotes myogenic differentiation. *Cell* 1994; **79**(2): 221-31.
105. Arber S, Hunter JJ, Ross J, Jr., et al. MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell* 1997; **88**(3): 393-403.
106. Costandi PN, Frank LR, McCulloch AD, Omens JH. Role of diastolic properties in the transition to failure in a mouse model of the cardiac dilatation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; **291**(6): H2971-9.
107. Lorenzen-Schmidt I, Stuyvers BD, ter Keurs HE, et al. Young MLP deficient mice show diastolic dysfunction before the onset of dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 2005; **39**(2): 241-50.
108. Zolk O, Caroni P, Bohm M. Decreased expression of the cardiac LIM domain protein MLP in chronic human heart failure. *Circulation* 2000; **101**(23): 2674-7.
109. Pina IL, Apstein CS, Balady GJ, et al. Exercise and heart failure: A statement from the American Heart Association Committee on exercise, rehabilitation, and prevention. *Circulation* 2003; **107**(8): 1210-25.
110. Brubaker PH, Kitzman DW. Chronotropic incompetence: causes, consequences, and management. *Circulation* 2011; **123**(9): 1010-20.
111. Franciosa JA, Park M, Levine TB. Lack of correlation between exercise capacity and indexes of resting left ventricular performance in heart failure. *Am J Cardiol* 1981; **47**(1): 33-9.

112. Drexler H, Banhardt U, Meinertz T, Wollschlager H, Lehmann M, Just H. Contrasting peripheral short-term and long-term effects of converting enzyme inhibition in patients with congestive heart failure. A double-blind, placebo-controlled trial. *Circulation* 1989; **79**(3): 491-502.
113. Zelis R, Sinoway LI, Musch TI, Davis D, Just H. Regional blood flow in congestive heart failure: concept of compensatory mechanisms with short and long time constants. *Am J Cardiol* 1988; **62**(8): 2E-8E.
114. Wilson JR, Martin JL, Schwartz D, Ferraro N. Exercise intolerance in patients with chronic heart failure: role of impaired nutritive flow to skeletal muscle. *Circulation* 1984; **69**(6): 1079-87.
115. Sullivan MJ, Knight JD, Higginbotham MB, Cobb FR. Relation between central and peripheral hemodynamics during exercise in patients with chronic heart failure. Muscle blood flow is reduced with maintenance of arterial perfusion pressure. *Circulation* 1989; **80**(4): 769-81.
116. Nakamura M, Ishikawa M, Funakoshi T, Hashimoto K, Chiba M, Hiramori K. Attenuated endothelium-dependent peripheral vasodilation and clinical characteristics in patients with chronic heart failure. *Am Heart J* 1994; **128**(6 Pt 1): 1164-9.
117. McMurray JJ, Ray SG, Abdullah I, Dargie HJ, Morton JJ. Plasma endothelin in chronic heart failure. *Circulation* 1992; **85**(4): 1374-9.
118. Drexler H, Hayoz D, Munzel T, et al. Endothelial function in chronic congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1992; **69**(19): 1596-601.
119. Green DJ, Maiorana A, O'Driscoll G, Taylor R. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. *J Physiol* 2004; **561**(Pt 1): 1-25.
120. Massie B, Conway M, Yonge R, et al. Skeletal muscle metabolism in patients with congestive heart failure: relation to clinical severity and blood flow. *Circulation* 1987; **76**(5): 1009-19.
121. O'Connor CM, Whellan DJ, Lee KL, et al. Efficacy and safety of exercise training in patients with chronic heart failure: HF-ACTION randomized controlled trial. *JAMA* 2009; **301**(14): 1439-50.
122. Holloway CJ, Dass S, Suttie JJ, et al. Exercise training in dilated cardiomyopathy improves rest and stress cardiac function without changes in cardiac high energy phosphate metabolism. *Heart* 2012; **98**(14): 1083-90.
123. Myers J, Wagner D, Schertler T, et al. Effects of exercise training on left ventricular volumes and function in patients with nonischemic cardiomyopathy: application of magnetic resonance myocardial tagging. *Am Heart J* 2002; **144**(4): 719-25.
124. Beer M, Wagner D, Myers J, et al. Effects of exercise training on myocardial energy metabolism and ventricular function assessed by quantitative phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy and magnetic resonance imaging in dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2008; **51**(19): 1883-91.
125. Gudjonsson T, Rahko PS. Relation of "inotropic reserve" to functional capacity in heart failure secondary to ischemic or nonischemic cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 2002; **89**(9): 1057-61.
126. Stolen KQ, Kempainen J, Ukkonen H, et al. Exercise training improves biventricular oxidative metabolism and left ventricular efficiency in patients with dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2003; **41**(3): 460-7.
127. Neubauer S, Horn M, Pabst T, et al. Contributions of 31P-magnetic resonance spectroscopy to the understanding of dilated heart muscle disease. *Eur Heart J* 1995; **16 Suppl O**: 115-8.
128. Neubauer S, Horn M, Cramer M, et al. Myocardial phosphocreatine-to-ATP ratio is a predictor of mortality in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1997; **96**(7): 2190-6.
129. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; **288**(5789): 373-6.
130. Cherry PD, Furchgott RF, Zawadzki JV, Jothianandan D. Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; **79**(6): 2106-10.
131. Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986; **250**(6 Pt 2): H1145-9.

132. Myers J, Gullestad L, Vagelos R, et al. Clinical, hemodynamic, and cardiopulmonary exercise test determinants of survival in patients referred for evaluation of heart failure. *Ann Intern Med* 1998; **129**(4): 286-93.
133. Hambrecht R, Fiehn E, Weigl C, et al. Regular physical exercise corrects endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heart failure. *Circulation* 1998; **98**(24): 2709-15.
134. Sun D, Huang A, Koller A, Kaley G. Adaptation of flow-induced dilation of arterioles to daily exercise. *Microvasc Res* 1998; **56**(1): 54-61.
135. Noris M, Morigi M, Donadelli R, et al. Nitric oxide synthesis by cultured endothelial cells is modulated by flow conditions. *Circ Res* 1995; **76**(4): 536-43.
136. Johnson LR, Rush JW, Turk JR, Price EM, Laughlin MH. Short-term exercise training increases ACh-induced relaxation and eNOS protein in porcine pulmonary arteries. *J Appl Physiol (1985)* 2001; **90**(3): 1102-10.
137. Ennezat PV, Malendowicz SL, Testa M, et al. Physical training in patients with chronic heart failure enhances the expression of genes encoding antioxidative enzymes. *J Am Coll Cardiol* 2001; **38**(1): 194-8.
138. Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Cheng Y, Kojda G, Harrison DG. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J Clin Invest* 2000; **105**(11): 1631-9.
139. Hoier B, Olsen K, Hanskov DJA, Jorgensen M, Norup LR, Hellsten Y. Early time course of change in angiogenic proteins in human skeletal muscle and vascular cells with endurance training. *Scand J Med Sci Sports* 2020; **30**(7): 1117-31.
140. Gustafsson T, Kraus WE. Exercise-induced angiogenesis-related growth and transcription factors in skeletal muscle, and their modification in muscle pathology. *Front Biosci* 2001; **6**: D75-89.
141. Gustafsson T, Bodin K, Sylven C, Gordon A, Tyni-Lenne R, Jansson E. Increased expression of VEGF following exercise training in patients with heart failure. *Eur J Clin Invest* 2001; **31**(4): 362-6.
142. Tryfonos A, Tzanis G, Pitsolis T, et al. Exercise Training Enhances Angiogenesis-Related Gene Responses in Skeletal Muscle of Patients with Chronic Heart Failure. *Cells* 2021; **10**(8).
143. Osadchii OE. Cardiac hypertrophy induced by sustained beta-adrenoreceptor activation: pathophysiological aspects. *Heart Fail Rev* 2007; **12**(1): 66-86.
144. Serra AJ, Santos MH, Bocalini DS, et al. Exercise training inhibits inflammatory cytokines and more than prevents myocardial dysfunction in rats with sustained beta-adrenergic hyperactivity. *J Physiol* 2010; **588**(Pt 13): 2431-42.
145. Anker SD, Ponikowski PP, Clark AL, et al. Cytokines and neurohormones relating to body composition alterations in the wasting syndrome of chronic heart failure. *Eur Heart J* 1999; **20**(9): 683-93.
146. Niebauer J, Pflaum CD, Clark AL, et al. Deficient insulin-like growth factor I in chronic heart failure predicts altered body composition, anabolic deficiency, cytokine and neurohormonal activation. *J Am Coll Cardiol* 1998; **32**(2): 393-7.
147. Paulus WJ. How are cytokines activated in heart failure? *Eur J Heart Fail* 1999; **1**(4): 309-12.
148. Mann DL, Reid MB. Exercise training and skeletal muscle inflammation in chronic heart failure: feeling better about fatigue. *J Am Coll Cardiol* 2003; **42**(5): 869-72.
149. Linke A, Adams V, Schulze PC, et al. Antioxidative effects of exercise training in patients with chronic heart failure: increase in radical scavenger enzyme activity in skeletal muscle. *Circulation* 2005; **111**(14): 1763-70.
150. Cleeter MW, Cooper JM, Darley-Usmar VM, Moncada S, Schapira AH. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett* 1994; **345**(1): 50-4.
151. Jezek P, Hlavata L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; **37**(12): 2478-503.
152. Srinivasan S, Avadhani NG. Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2012; **53**(6): 1252-63.

153. Drexler H, Riede U, Munzel T, König H, Funke E, Just H. Alterations of skeletal muscle in chronic heart failure. *Circulation* 1992; **85**(5): 1751-9.
154. Gielen S, Adams V, Linke A, et al. Exercise training in chronic heart failure: correlation between reduced local inflammation and improved oxidative capacity in the skeletal muscle. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2005; **12**(4): 393-400.
155. Richter B, Niessner A, Penka M, et al. Endurance training reduces circulating asymmetric dimethylarginine and myeloperoxidase levels in persons at risk of coronary events. *Thromb Haemost* 2005; **94**(6): 1306-11.
156. Adamopoulos S, Parissis J, Kroupis C, et al. Physical training reduces peripheral markers of inflammation in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J* 2001; **22**(9): 791-7.
157. Poole DC, Copp SW, Colburn TD, et al. Guidelines for animal exercise and training protocols for cardiovascular studies. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2020; **318**(5): H1100-H38.
158. Ferreira JC, Rolim NP, Bartholomeu JB, Gobatto CA, Kokubun E, Brum PC. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; **34**(8): 760-5.
159. Erkens R, Kramer CM, Luckstadt W, et al. Left ventricular diastolic dysfunction in Nrf2 knock out mice is associated with cardiac hypertrophy, decreased expression of SERCA2a, and preserved endothelial function. *Free Radic Biol Med* 2015; **89**: 906-17.
160. Fukuta H, Goto T, Wakami K, Kamiya T, Ohte N. Effects of exercise training on cardiac function, exercise capacity, and quality of life in heart failure with preserved ejection fraction: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Heart Fail Rev* 2019; **24**(4): 535-47.
161. Lynch TL, Ismahil MA, Jegga AG, et al. Cardiac inflammation in genetic dilated cardiomyopathy caused by MYBPC3 mutation. *J Mol Cell Cardiol* 2017; **102**: 83-93.
162. Baldus S, Eiserich JP, Mani A, et al. Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine nitration. *J Clin Invest* 2001; **108**(12): 1759-70.
163. Ignarro LJ, Degnan JN, Baricos WH, Kadowitz PJ, Wolin MS. Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme. Comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung. *Biochim Biophys Acta* 1982; **718**(1): 49-59.
164. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987; **2**(8567): 1057-8.
165. Pereira MG, Ferreira JC, Bueno CR, Jr., et al. Exercise training reduces cardiac angiotensin II levels and prevents cardiac dysfunction in a genetic model of sympathetic hyperactivity-induced heart failure in mice. *Eur J Appl Physiol* 2009; **105**(6): 843-50.
166. Fulster S, Tacke M, Sandek A, et al. Muscle wasting in patients with chronic heart failure: results from the studies investigating co-morbidities aggravating heart failure (SICA-HF). *Eur Heart J* 2013; **34**(7): 512-9.
167. Duscha BD, Kraus WE, Keteyian SJ, et al. Capillary density of skeletal muscle: a contributing mechanism for exercise intolerance in class II-III chronic heart failure independent of other peripheral alterations. *J Am Coll Cardiol* 1999; **33**(7): 1956-63.
168. Esposito F, Mathieu-Costello O, Wagner PD, Richardson RS. Acute and chronic exercise in patients with heart failure with reduced ejection fraction: evidence of structural and functional plasticity and intact angiogenic signalling in skeletal muscle. *J Physiol* 2018; **596**(21): 5149-61.
169. Gustafsson T, Puntchart A, Sundberg CJ, Jansson E. Related expression of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1 mRNAs in human skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 1999; **165**(3): 335-6.
170. Gustafsson T, Puntchart A, Kaijser L, Jansson E, Sundberg CJ. Exercise-induced expression of angiogenesis-related transcription and growth factors in human skeletal muscle. *Am J Physiol* 1999; **276**(2): H679-85.
171. Lloyd PG, Prior BM, Yang HT, Terjung RL. Angiogenic growth factor expression in rat skeletal muscle in response to exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; **284**(5): H1668-78.

172. Sutendra G, Dromparis P, Paulin R, et al. A metabolic remodeling in right ventricular hypertrophy is associated with decreased angiogenesis and a transition from a compensated to a decompensated state in pulmonary hypertension. *J Mol Med (Berl)* 2013; **91**(11): 1315-27.
173. Barbieri E, Sestili P. Reactive oxygen species in skeletal muscle signaling. *J Signal Transduct* 2012; **2012**: 982794.
174. Reid MB. Invited Review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol (1985)* 2001; **90**(2): 724-31.
175. Rochard P, Rodier A, Casas F, et al. Mitochondrial activity is involved in the regulation of myoblast differentiation through myogenin expression and activity of myogenic factors. *J Biol Chem* 2000; **275**(4): 2733-44.
176. van den Bosch BJ, van den Burg CM, Schoonderwoerd K, et al. Regional absence of mitochondria causing energy depletion in the myocardium of muscle LIM protein knockout mice. *Cardiovasc Res* 2005; **65**(2): 411-8.
177. Knapp F, Niemann B, Li L, et al. Differential effects of right and left heart failure on skeletal muscle in rats. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2020; **11**(6): 1830-49.
178. De Mario A, Gherardi G, Rizzuto R, Mammucari C. Skeletal muscle mitochondria in health and disease. *Cell Calcium* 2021; **94**: 102357.
179. Favaro G, Romanello V, Varanita T, et al. DRP1-mediated mitochondrial shape controls calcium homeostasis and muscle mass. *Nat Commun* 2019; **10**(1): 2576.
180. Karamanlidis G, Bautista-Hernandez V, Fynn-Thompson F, Del Nido P, Tian R. Impaired mitochondrial biogenesis precedes heart failure in right ventricular hypertrophy in congenital heart disease. *Circ Heart Fail* 2011; **4**(6): 707-13.

## 7. Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Katalytische Aktivität der Myeloperoxidase.....	22
Abb. 2: Laufband Belastungstests untrainierter Tiere. ....	46
Abb. 3: Entwicklung der Belastungsfähigkeit während der Trainingsperiode. ....	47
Abb. 4: Entwicklung der Belastungsfähigkeit während der Trainingsperiode im direkten Vergleich mit bzw. in Abwesenheit von MPO. ....	48
Abb. 5: Entwicklung der Anzahl an Luftstöße die pro Minute während der Belastungstests ausgelöst wurden.....	49
Abb. 6: Vergleich der Laufzeiten von untrainierten Tieren und 4 Wochen lang trainierten Tieren.....	49
Abb. 7: Fotografien des Laufbandes vor und nach Anpassung der Erschöpfungszone. ....	50
Abb. 8: Entwicklung der Belastungstests der Mlp-KO Tiere von Trainingswoche 1-4 sowie Final, Vergleich von ursprünglicher und verkürzter Ruhezone.....	50
Abb. 9: Darstellung der linken Ventrikel.....	51
Abb. 10: Echokardiographische Untersuchung der kardialen Funktion von Mlp-KO Tieren mit und ohne MPO-Defizienz.....	53
Abb. 11: Überprüfung einer möglichen Korrelation zwischen der linksventrikulären Funktion und der Belastungsfähigkeit untrainierter Tiere.....	53
Abb. 12: Vergleich der systolische LV-Funktion im Alter von 11 und 15 Wochen. ....	54
Abb. 13: Entwicklung der kardialen Funktion während des Belastungstrainings.....	56
Abb. 14: Vergleich der kardialen Funktion untrainierter und trainierter Tiere.....	57
Abb. 15: Distanz die während des gesamten Versuches, einschließlich Adaptation, Belastungstest und vierwöchigem Training pro Tier zurückgelegt wurde.....	58
Abb. 16: MPO-Konzentration im Plasma.....	59
Abb. 17: Konzentration des peripher an die Endothelwand gebundenen MPOs.....	60
Abb. 18: Darstellung der Anzahl an Kapillaren pro Muskelfaser des M. soleus.....	61
Abb. 19: VEGF-mRNA Expression im M. gastrocnemius.....	61
Abb. 20: Vergleich der mRNA-Expression von Proteinen der mitochondrialen Atmungskette zwischen untrainierten und trainierten Tieren. ....	63