

Aus dem Department Universitäts-Herzzentrum  
Klinik für Kardiologie und Angiologie I  
des Universitätsklinikums Freiburg im Breisgau

**Der Einfluss fehlender SIRT5-Expression auf die  
Herzfunktion im Rahmen einer  
chronischen kardialen Drucküberbelastung**



INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Medizinischen Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Albert-Ludwigs-Universität  
Freiburg im Breisgau

Vorgelegt 2018

von Julia Christina Lueg  
geboren in Siegen

Dekan:

Prof. Dr. med. Lutz Hein

1. Gutachter:

PD Dr. med. Heiko Bugger

2. Gutachter:

PD Dr. rer. nat. Michael M. Hoffmann

Jahr der Promotion:

2022

*Für meine Familie.*

*Für meine Eltern, meine Schwester und meinen Großvater.*

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>10</b>
2.1	Physiologische Muskelarbeit im Herzen .....	10
2.2	Kardiale Stoffwechselwege .....	11
2.3	Physiologische Regulationsmechanismen des kardialen Stoffwechsels .....	13
2.4	Sirtuine .....	16
2.5	SIRT5 .....	17
2.6	Energieanforderungen im <i>pressure-overload</i> -Modell .....	20
<b>3</b>	<b>Ziel der Arbeit</b> .....	<b>25</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>26</b>
4.1	Material.....	26
4.1.1	Geräte.....	26
4.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	27
4.1.3	Chemikalien .....	27
4.1.4	Oligonukleotide .....	28
4.1.5	Kit-Systeme .....	29
4.1.6	Antikörper .....	29
4.1.7	Tiere und Tierhaltung .....	29
4.2	Methoden.....	31
4.2.1	Genotypisierung.....	31
4.2.2	Transverse Aortenkonstriktion .....	35
4.2.3	Transthorakale Echokardiographie .....	36
4.2.4	Euthanasie .....	41
4.2.5	Histologie.....	41
4.2.6	Mitochondrienisolation .....	43
4.2.7	Mitochondriale respiratorische Kapazität .....	45
4.2.8	ATP-Synthese .....	47
4.2.9	SDS-PAGE und Western Blot .....	48
4.2.10	RNA-Isolation, cDNA-Synthese und quantitative <i>Real-Time</i> -PCR .....	50
4.2.11	Statistik .....	52
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>53</b>
5.1	Nachweis des <i>Knockouts</i> von SIRT5 im Herzen.....	53
5.2	Kontraktile Herzfunktion <i>in vivo</i> .....	54

5.3	Überleben nach transverser Aortenkonstriktion .....	62
5.4	Herz- und Körpergewicht .....	62
5.5	Histologie .....	63
5.6	Myokardiale mitochondriale Atmungskapazität .....	65
5.7	Myokardiale ATP-Syntheseraten .....	67
5.8	Genexpression .....	68
5.9	Abschätzung der Lipidperoxidation .....	70
5.10	Succinylierung und Malonylierung .....	71
<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>83</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>84</b>
<b>9</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>91</b>
9.1	Ergänzende Messparameter zur kontraktiven Herzfunktion in vivo (5.2) .....	91
9.2	Lebenslauf .....	93
9.3	Eidesstattliche Versicherung .....	95
9.4	Danksagung .....	96

# 1 Abkürzungsverzeichnis

18sRNA	<i>18s ribosomal RNA, small ribosomal subunit component</i>
4-HNE	4-Hydroxynonenal
$\alpha$ -MHC-Promotor	<i><math>\alpha</math>-myosin heavy chain promoter</i>
A./Aa.	Arteria/Arteriae (Pl.)
AAC	ATP/ADP-Carrier/Translokase
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
Acyl-CoA	Acyl-Coenzym A
ADP	Adenosindiphosphat
AMPK	AMP-aktivierte Kinase
ANT	<i>Adenine nucleotide translocator</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-Xl	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
Cat	Catalase
CD36	<i>Cluster of differentiation 36</i>
CPT	Carnitin-Palmitoyltransferase
Cyt C	Cytochrom C
DTT	Dithiothreitol
ECHA	Enoyl-CoA-Hydratase A
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDV	Enddiastolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ERR $\alpha$	<i>Estrogen-related receptor <math>\alpha</math></i>
ESV	Endsystolisches Volumen
FACS	<i>Fatty acid-CoA synthetase</i>
FADH <sub>2</sub> /H	Flavin-Adenin-Dinukleotid (reduzierte/oxidierte Form)
FAT	<i>Fatty acid translocase</i>
FELASA	<i>Federation of Laboratory Animal Science Associations</i>
FOXO	<i>Forkhead-transcriptionfactor subclass O</i>

FS	<i>Fractional Shortening</i> , Verkürzungsfraction
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDH	Glutamatdehydrogenase
GLUT 1/4	Glukosetransporter 1/4
GPX1/4	Glutathion-Peroxidase 1/4
GTP	Guanosintriphosphat
h/r	Indikator einer dilatativen oder konzentrischen Kardiomyopathie
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
HF	Herzfrequenz
HG	Herzgewicht
HMGCS2	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Synthase 2
HNE	4-Hydroxynonenal
hnRNA	<i>Heterogenous nuclear RNA</i>
HZV	Herzzeitvolumen
IFM	<i>Interfibrillar mitochondria</i>
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IVSd	<i>InterVentricular Septum diastolic</i>
IVSs	<i>InterVentricular Septum systolic</i>
KG	Körpergewicht
LCAD	Langketten-Acyl-CoA-Dehydrogenase
LVIDd	<i>Left Ventricle Inner Diameter diastolic</i>
LVIDs	<i>Left Ventricle Inner Diameter systolic</i>
LVPWd	<i>Left Ventricular Posterior Wall diastolic</i>
LVPWs	<i>Left Ventricular Posterior Wall systolic</i>
Malonyl-CoA	Malonyl-Coenzym A
MCAD	<i>Medium-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase</i>
MiR-22	Mikro-RNA-22
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
mtDNA	mitochondriale DNA
mtTFA	mitochondrialer Transkriptionsfaktor A
Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase	Natrium-Kalium-Adenosintriphosphatase
NADH <sub>2</sub>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduzierte/oxidierte Form)
NF-κB	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NRF-1/-2	<i>Nuclear respiratory factors -1/-2</i>

PARP	Poly-(ADP-ribose)-Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PFK-1	Phosphofruktokinase-1
PGC-1 $\alpha$	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1 <math>\alpha</math></i>
PGC-1 $\beta$	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1 <math>\beta</math></i>
PHGP	Phospholipid-Hydroxyperoxid-Glutathion-Peroxidase
PPAR $\alpha$	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor <math>\alpha</math></i>
PRDX3	Peroxiredoxin 3
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RCI	<i>Respiratory Control Index</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT-PCR	<i>Real Time-Polymerase Chain Reaction</i>
RXR	Retinoid X Rezeptor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-Page	<i>Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
Sir	<i>Silent information regulator (Gen)</i>
SIRT	Sirtuin (Protein)
Sod2	mitochondriale Superoxide-Dismutase
SSM	<i>Subsarcolemmal mitochondria</i>
SV	Schlagvolumen
TAC	Transverse Aortenkonstriktion
Taq-Polymerase	Thermus-aquaticus-Polymerase
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TL	Tibiallänge
Trxn1	Thioredoxin 1
TTE	Transthorakale Echokardiographie
UQ	Ubichinon
V./Vv.	Vena/Venae
VDAC1	<i>Voltage-Dependent Anion-Selective Channel Protein 1</i>

VLCAD

Langketten-Acyl-CoA-Dehydrogenase

WGA

*Wheat-Germ Agglutinin*

## 2 Einleitung

### 2.1 Physiologische Muskularbeit im Herzen

Für das Überleben eines komplexen Organismus wie dem menschlichen Körper ist eine stete Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen über das Blut notwendig. Das Herz garantiert diese mit einem Herzzeitvolumen von 5 Litern Blut pro Minute. Im Vierkammersystem des Herzen gelangt das sauerstoffarme Blut zunächst aus dem Körperkreislauf über den rechten Vorhof und die rechte Herzkammer in die Lunge. Angereichert mit frischem Sauerstoff nimmt das Blut den Weg über den linken Vorhof in die linke Herzkammer und wird von dort aus in die Aorta und den Körper gepumpt. Das Herz als Hohlmuskel kontrahiert für diese Pumparbeit 60 bis 80 Mal pro Minute. So kann der systemische Blutdruck aufrecht erhalten werden, der für eine ausreichende Perfusion der Organe notwendig ist. Durch diese konstante Muskularbeit hat das Herz einen hohen Eigenbedarf an oxygeniertem Blut und energiereichen Reaktionsäquivalenten. Die Versorgung des Herzen mit Blut wird über die Herzkranzgefäße bei jedem Herzschlag aufrecht erhalten. Die Kardiomyozyten weisen einen Anteil an Mitochondrien von bis zu 30% des Zellvolumens auf, dank derer in einem vornehmlich aeroben Stoffwechsel die Bereitstellung von Adenosintriphosphat (ATP) garantiert werden kann. 95% der ATP-Produktion findet im Herzen mittels oxidativer Phosphorylierung in den Mitochondrien statt. Das Herz setzt innerhalb von zehn Sekunden nahezu seinen gesamten Bestand an ATP um, wobei 60 bis 70% des ATPs für die Muskelkontraktion verwendet werden (Stanley, Recchia and Lopaschuk 2005). Es konsumiert mehr als das 100-fache seines Eigengewichts an ATP, bis zu 30 kg/Tag (Lauritzen et al. 2015). Trotz des schwankenden Energiebedarfs zwischen Ruhephasen und Phasen körperlicher Arbeit kann die ATP-Konzentration im gesunden Herzen nahezu konstant gehalten werden (Ingwall 2007). Das ATP wird von den Myosinköpfchen der glatten Herzmuskelzellen gebunden und hydrolysiert. Mit der hierbei frei werdenden Energie gleiten die Myosin- und Aktinfilamente des Sarkomers ineinander. Die Verkürzung der Sarkomere bewirkt in ihrer Gesamtheit die Kontraktion des Muskels. Die restlichen 30 bis 40% des ATPs werden im Herzen für intrazelluläre Ionenpumpen, wie die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase, und Transportvorgänge, wie den Rücktransport von  $\text{Ca}^{2+}$  in das sarkoplasmatische Retikulum, verwendet (Stanley et al. 2005).

## 2.2 Kardiale Stoffwechselwege

Das Ziel des myokardialen Stoffwechsels ist die Generierung des benötigten ATPs in der mitochondrialen Atmungskette. Hierfür werden im Citratzyklus Reduktionsäquivalente in Form von  $\text{NADH}_2$  und  $\text{FADH}_2$  generiert. Ausgangssubstanz ist das auf verschiedenen Wegen gebildete Acetyl-CoA. 60 bis 90% des verwendeten Acetyl-CoAs werden im Herzen durch die Oxidation von Fettsäuren, 10 bis 40% durch den Abbau von Glukose beziehungsweise Pyruvat hergestellt (Huss and Kelly 2004). Die Aufnahme von Fettsäuren in die Kardiomyozyten ist abhängig von der Menge nicht veresterter Fettsäuren im Blutplasma. Mittels passiver Diffusion oder mit dem aktiven Transporter CD36, einer *Fatty acid translocase* (FAT), gelangen die Fettsäuren in die Kardiomyozyten und werden im Cytosol durch die *Fatty acid-CoA synthetase* (FACS) zu Acyl-CoA aktiviert. Acyl-CoA gelangt über die Carnitin-Palmitoyltransferasen I und II (CPT) in die Mitochondrien und kann hier in der  $\beta$ -Oxidation abgebaut werden. Je nach Länge der Fettsäure wird die  $\beta$ -Oxidation mehrmals durchlaufen, wobei bei jedem Durchlauf ein  $\text{NADH}_2$  und  $\text{FADH}_2$ , sowie ein Acetyl-CoA generiert werden. Das Substrat Glukose gelangt über die Transporter GLUT1 und GLUT4 in die Kardiomyozyten. Nach Durchlauf der aeroben Glykolyse im Zytosol der Kardiomyozyten wird das Produkt Pyruvat vornehmlich durch die in der mitochondrialen Matrix befindliche Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) zu Acetyl-CoA abgebaut. Hierbei entsteht ebenfalls ein Reduktionsäquivalent in Form von  $\text{NADH}_2$ . Das Acetyl-CoA aus der Fettsäureoxidation und der Glykolyse wird nun im Citratzyklus im Mitochondrium zu  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NADH}_2$ ,  $\text{FADH}_2$  und GTP abgebaut. Die entstandenen Reduktionsäquivalente befinden sich bereits in den Mitochondrien und können der Atmungskette direkt zugeführt werden. Zytosolisches  $\text{NADH}_2$  aus der Glykolyse muss zunächst über den Malat-Aspartat-Zyklus oder das Glycerophosphat-Shuttle in das Mitochondrium transportiert werden.

Im ersten Schritt der Atmungskette werden die Reduktionsäquivalente oxidiert und Elektronen auf die Moleküle Ubichinon und Cytochrom C übertragen. Die Protonen werden über die einzelnen Komplexe in den Intermembranraum zwischen Mitochondrium und Zytosol gepumpt, sodass sich ein energetisch wirksamer Protonengradient aufbaut. Im Komplex I der Atmungskette wird  $\text{NADH}_2$  zu  $\text{NAD}^+$  oxidiert, die Protonen werden in den Intermembranraum gepumpt und die Elektronen auf Ubichinon übertragen. Am Komplex II findet die Oxidation von Succinat zu Fumarat als Teil des Citratzyklus statt. Die Elektronen des hierbei entstehenden  $\text{FADH}_2$  werden auf Ubichinon übertragen. Komplex II ist als einziger Komplex nicht mit dem Intermembranraum verbunden und trägt somit nicht zur Generierung des Pro-

tonengradienten bei. Ubichinon wird durch die Aufnahme der Elektronen aus  $\text{NADH}_2$  und  $\text{FADH}_2$  zu Ubichinol reduziert und überträgt die Elektronen weiter auf Komplex III. Hier werden erneut Protonen in den Intermembranraum gepumpt. Das lösliche Protein Cytochrom C transportiert die Elektronen an der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran zu Komplex IV der Atmungskette, der Cytochrom-Oxidase. Hier wird der Sauerstoff nach der Übertragung von vier Elektronen zu Wasser reduziert. Durch die transmembranäre ATP-Synthase strömen die Protonen am Ende der Atmungskette durch die Mitochondrienmembran, wobei die frei werdende Energie für die Übertragung eines Phosphatrestes auf Adenosindiphosphat (ADP) und somit die Regenerierung von ATP aus ADP genutzt wird. Über den Adenin-Nukleotid-Translokator (ANT) wird das synthetisierte ATP ins Cytoplasma transportiert. ATP kann im Anschluss im ganzen Körper bei Bedarf wieder zu ADP dephosphoryliert und die Energie des Protonengradienten so in zahlreichen Stoffwechselprozessen genutzt werden. Im Gegenzug gelangt ADP in das Mitochondrium und steht ebenfalls für die ATP-Synthese zur Verfügung.

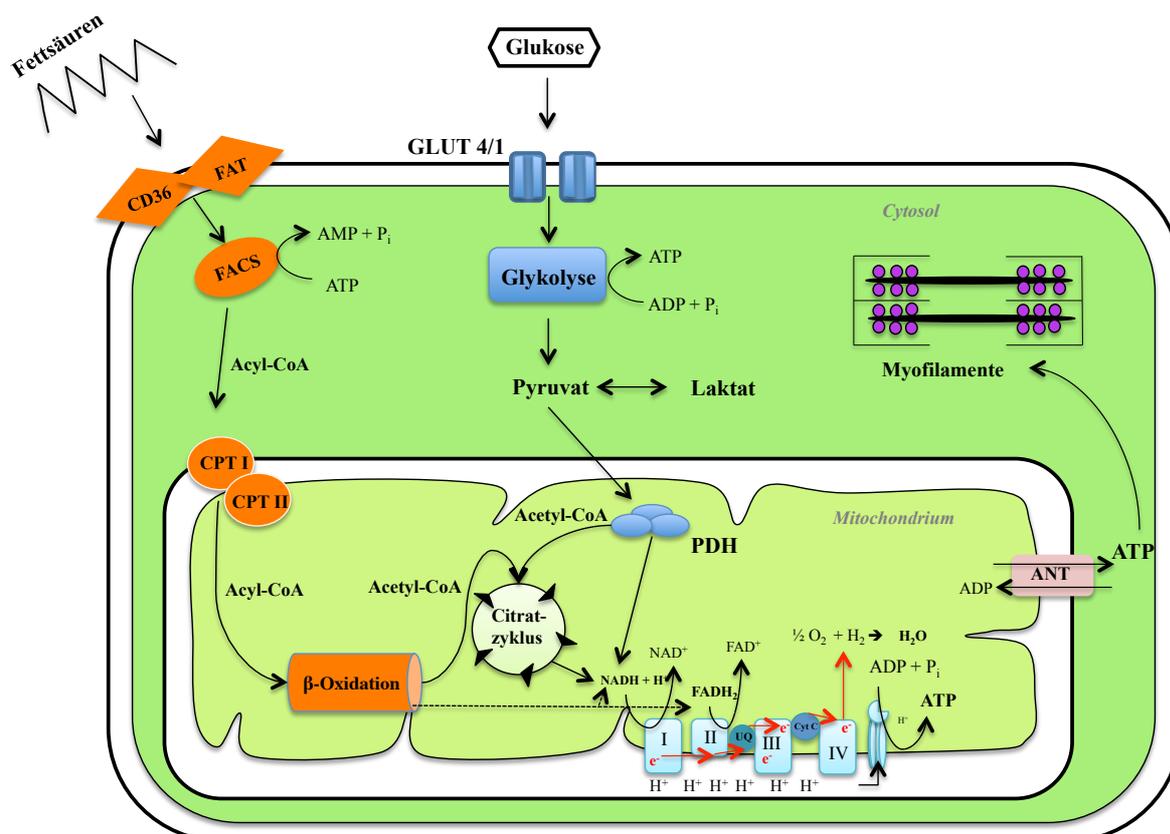


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung des myokardialen Stoffwechsels.

Bis zu 5% des in der ATP-Synthese verwendeten Sauerstoffs werden unter physiologischen Bedingungen auch zu reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) umgewandelt (Lesnefsky et al. 2001, Campbell et al. 2002, Casademont and Miro 2002). Grund hierfür ist das sogenannte Elektronenleck (*Electron leak*), welches beschreibt, dass Elektronen frühzeitig die Atmungskette verlassen und mit  $O_2$  zu Superoxid ( $O_2^-$ ) reagieren (Jastroch et al. 2010). Dies geschieht vornehmlich am Komplex I und III der Atmungskette (Lesnefsky et al. 2001, Jastroch et al. 2010). Eine Erhöhung der Konzentration an mitochondrialem  $NADH_2$  oder  $FADH_2$ , sowie eine Erniedrigung der Konzentration an mitochondrialem  $O_2$  oder ADP verstärken das Elektronenleck (Lesnefsky et al. 2001). Das entstehende Superoxid-Radikal  $O_2^-$  gehört zur Gruppe der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und kann aufgrund seines hohen Oxidationspotenzials erhebliche Schäden an mitochondrialen Proteinen, Lipiden und der mitochondrialen DNA (mtDNA) verursachen (Casademont and Miro 2002). Durch derartige Veränderungen kann es auch zu einer Beeinträchtigung der Atmungskette kommen, was wiederum die Entstehung von ROS befördert (Lesnefsky et al. 2001). Enzyme wie die Phospholipid-Hydroxyperoxid-Glutathion-Peroxidase (PHGP) schützen die Zelle, indem sie beispielsweise die durch ROS peroxidierten Lipide wieder reduzieren (Lesnefsky et al. 2001). Die mitochondriale Mangan-Superoxiddismutase in der Mitochondrienmatrix katalysiert die Umwandlung von  $O_2^-$  zu  $H_2O_2$  und eliminiert so  $O_2^-$  im Zytosol. Das deutlich stabilere  $H_2O_2$  wird dann durch die zytosolische Catalase oder die Glutathion-Peroxidase inaktiviert (Lesnefsky et al. 2001).

### **2.3 Physiologische Regulationsmechanismen des kardialen Stoffwechsels**

Aufgrund seiner zentralen Funktion im menschlichen Kreislauf muss sich das Herz immer wieder an verschiedene energetische Anforderungen anpassen. Es muss in der Lage sein, mittels präziser Regulationsmechanismen den Körper auch bei plötzlicher Anstrengung mit ausreichend sauerstoffreichem Blut zu versorgen und deshalb die eigenen Energiekapazitäten anpassen können.

#### **Modifikationen auf enzymatischer Ebene**

Die AMP-aktivierte Kinase (AMPK) ist in der Lage, den kardialen Stoffwechsel auf enzymatischer Ebene an das vorliegende Verhältnis von Adenosinmonophosphat (AMP) zu ATP anzupassen. Kommt es durch eine erhöhte Arbeitslast des Herzens zu einer sinkenden ATP-Konzentration, werden zwei Moleküle ADP durch das Enzym Adenylatkinase zu einem Mo-

lekül ATP und einem Molekül AMP umgewandelt. Das Enzym wird deswegen auch als Alarmsystem bei zu niedriger Reserve an energiereichen Metaboliten gesehen (Ingwall and Weiss 2004). Die AMPK wird durch die daraus resultierende Zunahme des intrazellulären AMP/ATP-Verhältnisses oder allosterisch durch die Bindung eines AMP-Moleküls aktiviert. Das Enzym hemmt durch verstärkte Phosphorylierung die Acetyl-CoA-Carboxylase, das Schlüsselenzym der Fettsäuresynthese (Young et al. 1999, Stanley et al. 2005). Dies führt zu einer sinkenden Konzentration von Malonyl-CoA und einer Enthemmung der CPT I. Hieraus resultieren eine erhöhte Konzentration von Acyl-CoA im Mitochondrium und eine verstärkt ablaufende  $\beta$ -Oxidation.

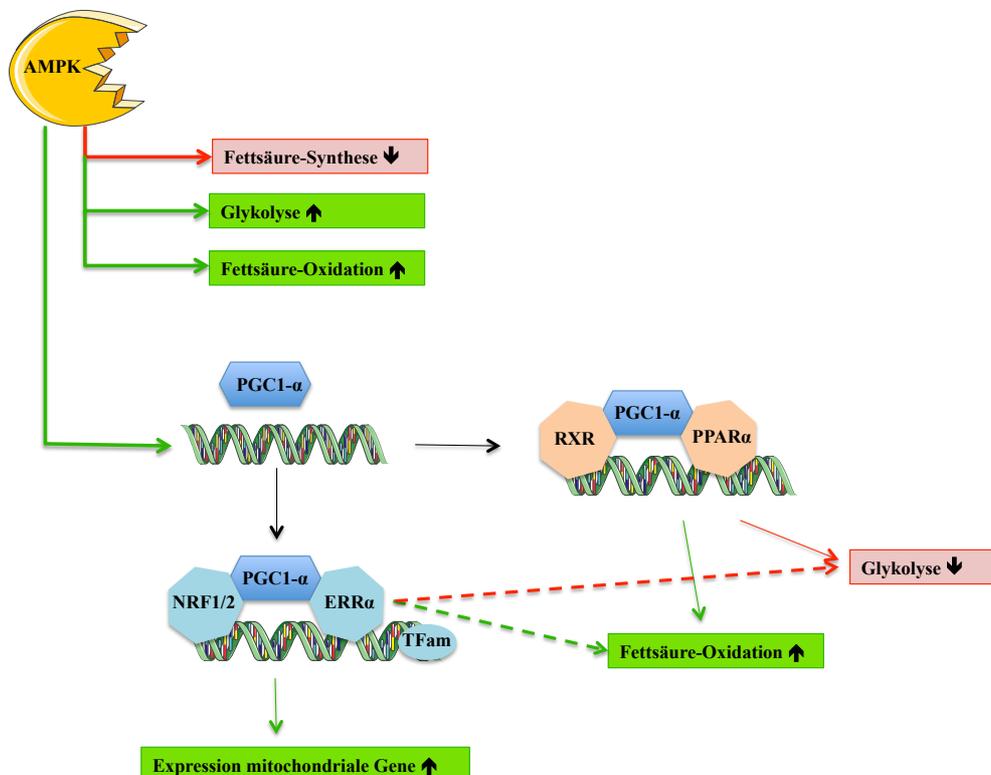
Weiterhin führt eine Aktivierung der AMPK allerdings auch zu einem vermehrten Einbau des insulinabhängigen GLUT4 (Young et al. 1999, Stanley et al. 2005). Die Erhöhung der intrazellulären Glukosekonzentration führt wiederum zu einer verstärkt ablaufenden Glykolyse (Young et al. 1999). Die AMPK trägt dazu bei, dass im Falle eines akuten Energiebedarfs im Herzen anabole Prozesse gehemmt und katabole Prozesse verstärkt werden. Weiterhin kann die AMPK auch auf transkriptionaler Ebene durch eine Aktivierung des *Peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  coactivator-1* (PGC-1  $\alpha$ ), der *Nuclear respiratory factors -1 und -2* (NRF-1 und -2), des mitochondrialen Transkriptionsfaktors A (mtTFA) und des *Estrogen-related receptor  $\alpha$*  (ERR  $\alpha$ ) die mitochondriale Biogenese verstärken (Bayeva, Gheorghiadu and Ardehali 2013).

### **Transkriptionale Modifikation durch PGC-1 $\alpha$ und PPAR $\alpha$**

Der kälteinduzierbare, transkriptionale Coaktivator PGC-1 koaktiviert einen Komplex aus dem *Peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR) und dem *Retinoid X receptor* (RXR) (Stanley et al. 2005). Die Bindungsstelle von PPAR findet sich in Promotorregionen, die die Expression von verschiedenen Stoffwechselgenen regulieren. Im Herzen liegt vornehmlich die Isoform PPAR  $\alpha$  vor. Die Isoformen PPAR  $\beta/\delta$  werden ebenfalls in den Kardiomyozyten exprimiert und haben eine ähnliche Funktion wie die  $\alpha$ -Form (Stanley et al. 2005). Der PPAR  $\gamma$  spielt in der Transkriptionsregulation der Kardiomyozyten nur eine untergeordnete Rolle. Der PPAR  $\alpha$ /RXR-Komplex fungiert als Sensor in den Kardiomyozyten, der bei einem erhöhten Angebot von Fettsäuren und Eicosanoiden die Fettsäure-Oxidation verstärkt ablaufen lässt. Eine Aktivierung des PPAR  $\alpha$ /RXR-Komplexes führt zu einer Zunahme der Transkription von Bestandteilen der Fettsäureoxidation wie den Transportern CD36/FAT, der Malonyl-CoA Decarboxylase oder der *Medium-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase* (MCAD) (Gulick et

al. 1994, Campbell et al. 2002, Huss and Kelly 2004, Stanley et al. 2005). Die Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase 4, die vor allem im Herzen die Pyruvat-Dehydrogenase phosphoryliert und somit hemmt, wird ihrerseits von dem PPAR  $\alpha$ /RXR-Komplex aktiviert. Hierdurch wird die Oxidation von Pyruvat zu Acetyl-CoA und die nachfolgende Glykolyse reduziert (Stanley et al. 2005).

PGC-1  $\alpha$  nimmt weiterhin Einfluss auf die Transkriptionsfaktoren NRF-1 und -2 und den ERR  $\alpha$  (Huss and Kelly 2004). Eine Aktivierung von NRF-1 und -2 führt ebenfalls zu einer vermehrten Expression von Proteinen der mitochondrialen Atmungskette (Lehman et al. 2000). Weiterhin befinden sich Bindestellen für NRF-1 und -2 auch in der Promotorregion des mtTFA, der seinerseits die Transkription von mitochondrial kodierten Genen verstärkt und somit auch Einfluss auf die ATP-Produktion nimmt (Virbasius, Virbasius and Scarpulla 1993, Lehman et al. 2000, Maniatis and Tasic 2002, Hansson et al. 2004). ERR  $\alpha$  aktiviert ähnliche Prozesse wie der PPAR  $\alpha$ /RXR-Komplex und sorgt für erhöhte mitochondriale Fettsäure-Oxidationsraten (Huss et al. 2004). PGC-1  $\alpha$  ermöglicht damit insgesamt eine verbesserte ATP-Produktion in den Mitochondrien durch eine Zunahme der oxidativen Kapazität und der Gesamtzahl der Mitochondrien (Lehman et al. 2000).



**Abbildung 2:** Vereinfachte Darstellung der Auswirkungen einer Aktivierung der AMPK.

## Posttranslationale Modifikationen

Nach der Translation der Gene besteht die Möglichkeit, die Proteine durch beispielsweise Phosphorylierung, Acetylierung, Glykosylierung, Methylierung, Malonylierung, Succinylierung oder Ubiquitinierung in ihrer letztendlichen Funktion zu verändern. An eine Seitenkette des Proteins kann ein zumeist elektrophiler Rest eines Cosubstrates kovalent gebunden werden. Für 15 der 20 bekannten proteinogenen Aminosäuren, mit der Ausnahme von Leu, Ile, Val, Ala, Phe, sind derartige Modifikationen nachgewiesen (Walsh, Garneau-Tsodikova and Gatto 2005). Weiterhin wird unterschieden, mit welchem Cosubstrat oder Coenzym die Reaktion erfolgt. Bekannte Beispiele sind hierbei ATP-abhängige Phosphorylierung, Acetyl-CoA-abhängige Acetylierung oder NAD-abhängige ADP-Ribosylierung (Walsh et al. 2005). Modifizierte Proteine können so in ihrer Funktion aktiviert, gehemmt oder beispielsweise für den Abbau in Peroxisomen durch Ubiquitinierung kenntlich gemacht werden. Vor allem die Acetylierung von Lysinen wurde bereits mehrfach mit Enzymen des Stoffwechsels und dem Energiemetabolismus in Mitochondrien in Zusammenhang gebracht (Kim et al. 2006, Zhang et al. 2009). Mehr als 20% der mitochondrialen Enzyme weisen eine derartige Lysin-Acetylierung auf, die teilweise mit einer verlängerten Lebenszeit der Zellen einhergehen (Kim et al. 2006).

## 2.4 Sirtuine

Vor zwei Jahrzehnten wurde zum ersten Mal in der Hefe der *Silent information regulator 2*, (Sir 2) beschrieben (Kaeberlein, McVey and Guarente 1999, Imai et al. 2000, Koentges, Bode and Bugger 2016a). Sir 2 reguliert auf Ebene des Chromatins die Transkription und ist vornehmlich am Prozess des transkriptionalen *silencings* beteiligt (Frye 1999, Landry et al. 2000, Tsai et al. 2012). Die Familie der Sirtuine besteht aus sieben bislang identifizierten Proteinen (SIRT 1-7), die sich von Sir2 ableiten. Die NAD<sup>+</sup>-abhängigen Deacetylasen der Klasse III sind ubiquitär im menschlichen Körper an zahlreichen Stoffwechselreaktionen beteiligt (Michishita et al. 2005, Koentges et al. 2016a). Sirtuine sind evolutionär hoch konserviert und kommen in Bakterien, Viren, in Hefen wie *S. cerevisiae*, in Würmern wie *C. elegans*, in Drosophila und in Säugetieren vor (Frye 1999, Smith et al. 2000, Bugger, Witt and Bode 2016). Durch die Abhängigkeit von NAD<sup>+</sup> ist die uneingeschränkte Funktion der Sirtuine oft mit einer ausgeglichenen Energiebilanz der Zelle verknüpft (Schlicker et al. 2008, Nakamura et al. 2012, Karamanlidis et al. 2013, Koentges et al. 2016b). Eine verstärkte Akti-

vität von Sir 2 geht in der Hefezelle mit einer Verlängerung der Lebenszeit einher (Michishita et al. 2005). Grund hierfür scheint eine verminderte Bildung von extrachromosomaler, ribosomaler DNA zu sein (Frye 1999, Michishita et al. 2005, Haigis and Guarente 2006). Weiterhin verlängert auch eine Kalorienrestriktion die Lebenserwartung, wodurch Bezüge zu metabolischen Prozessen hergestellt werden (Heilbronn and Ravussin 2003, Michishita et al. 2005, Haigis and Guarente 2006). Dem in Rotwein vorkommenden Alkohol Resveratrol wird in Würmern und Hefen ebenfalls eine lebensverlängernde Wirkung bescheinigt (Baur et al. 2006). Im menschlichen Herzen zeigt Resveratrol zahlreiche kardioprotektive Effekte und aktiviert unter anderem SIRT1 (Zhang et al. 2009, Zordoky, Robertson and Dyck 2015). SIRT3 wird bei Vorliegen eines bestimmten Allels auch bei Menschen eine lebensverlängernde Wirkung zugeschrieben (Bellizzi et al. 2005).

SIRT1, SIRT6 und SIRT7 sind im Nukleus lokalisiert, SIRT2 liegt zytoplasmatisch vor und SIRT3, SIRT4 und SIRT5 im Mitochondrium (Michishita et al. 2005, Zhang et al. 2009). Möglicherweise ist aber auch eine Bewegung der Sirtuine zwischen dem Nukleus und dem Zytosol möglich (Haigis and Guarente 2006, Park et al. 2013). Die von Sirtuinen regulierten Enzyme sind vor allem durch ADP-Ribosylierungen, sowie durch Lysin-Deacetylierungen verändert (Frye 1999, Landry et al. 2000). Diese finden sich bei zahlreichen metabolischen Enzymen, Translations- und Transkriptionsfaktoren, die damit ein potentiell Target für die Sirtuine abgeben (Zhang et al. 2009). Den Sirtuinen wird aufgrund ihrer vielseitigen Einflussnahme und langjährigen Konservierung im Proteom verschiedenster Lebewesen eine bedeutende Rolle bei Alterungsprozessen und verschiedenen Krankheitsbildern zugemessen (Schlicker et al. 2008, Matsushima and Sadoshima 2015, Zordoky et al. 2015). Wegen der kollektiven  $\text{NAD}^+$ -Abhängigkeit und der Bedeutung, die die Mitochondrien als Kraftwerke der Zelle spielen, gibt es Hypothesen, dass vor allem SIRT3-5 eine Möglichkeit der mitochondrialen Adaptation bei Veränderungen im Energiestoffwechsel bieten (Bugger et al. 2016). Hierfür spricht auch, dass sich die Expression der Sirtuine unter der Kontrolle von AMPK, PGC1  $\alpha$ , PPAR  $\alpha$  und ERR  $\alpha$  befindet, was auch auf transkriptionaler Ebene eine Möglichkeit zur Anpassung an wechselnde energetische Zustände zulässt (Buler et al. 2014).

## 2.5 SIRT5

SIRT5 hat, ähnlich wie SIRT4, nur eine schwache Deacetylase-Aktivität, besitzt allerdings auch keine ADP-Ribosyltransferaseaktivität (Haigis and Guarente 2006, Du 2011). Es wirkt als die führende Desuccinylase und Demalonylase in den Mitochondrien und wird somit

mehr als Deacylase statt als Deacetylase gehandelt (Bai et al. 2011, Park et al. 2013, Yu et al. 2013, Bugger et al. 2016). Grund hierfür ist der strukturelle Aufbau des katalytischen Zentrums von SIRT5. Acyl-CoA-Moleküle, wie Malonyl- und Succinyl-CoA, binden hier deutlich besser als Acetyl-CoA-Moleküle, vor allem, wenn sie eine negativ geladene Carboxyl-Gruppe enthalten (Du 2011). SIRT5 kommt im gesamten Körper vor, wobei es im Gehirn, im Herzen, in der Leber und in der Niere am stärksten exprimiert wird (Nakagawa et al. 2009). Es ist vornehmlich mitochondrial wirksam und wird als Protein der Mitochondrienmatrix beschrieben (Schlicker et al. 2008, Nakagawa et al. 2009). Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass SIRT5 auch extramitochondrial wirksam ist (Park et al. 2013). Eine Erklärung könnte die Möglichkeit sein, dass verschiedene Isoformen von SIRT5 an unterschiedlichen Lokalisationen in der Zelle wirksam sind (Matsushita et al. 2011).

Nach neuesten Erkenntnissen ist Succinyl-CoA die dominierende Form von Acetyl-CoA im Herzen, was der Lysin-Succinylierung einen wichtigen Stellenwert im kardialen Stoffwechsel einräumt (Sadhukhan et al. 2016). Nachdem in der SIRT5<sup>(-/-)</sup>-Maus hypersuccinylierte Lysine bei Enzymen des Citratzyklusses und des Fettsäurestoffwechsels gefunden wurden, wird davon ausgegangen, dass SIRT5 Einfluss auf diese Stoffwechselwege nehmen könnte (Park et al. 2013, Rardin et al. 2013). Hinzu kommen Lysine, die mittels Malonylierung reguliert werden und im Rahmen der Glykolyse, der Glukoneogenese, des Harnstoffzyklusses, der Ketogenese und der  $\beta$ -Oxidation eine wichtige Rolle spielen (Rardin et al. 2013, Nishida et al. 2015, Bugger et al. 2016). Bei Enzymen des Glukosestoffwechsels, wie der Aldolase B und der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) finden sich zahlreiche Lysine, die malonyliert und demalonyliert werden (Nishida et al. 2015). In SIRT5<sup>(-/-)</sup>-Hepatozyten wurde ein reduzierter glykolytischer Fluss und eine verminderte Laktat-Produktion gemessen, was auf eine möglicherweise verstärkende Wirkung von SIRT5 auf die Glykolyse schließen lässt (Nishida et al. 2015). Den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex scheint SIRT5 jedoch mittels Desuccinylierung negativ zu beeinflussen und in seiner Aktivität zu hemmen (Park et al. 2013). Ähnliche Ergebnisse wurden für die Succinat-Dehydrogenase gefunden, die sowohl im Citratzyklus als auch in der mitochondrialen Atmungskette eine wichtige Rolle spielt (Park et al. 2013). Bezüglich der Ketogenese und der  $\beta$ -Oxidation sind vier von vier, beziehungsweise 14 von 15 Proteinen Ziele von SIRT5 (Rardin et al. 2013). In SIRT5<sup>(-/-)</sup>-Hepatozyten wurde eine eingeschränkte  $\beta$ -Oxidation, sowie eine globale Hypersuccinylierung der beteiligten Proteine. Es wurde Ansammlung von mittel- und langkettigen Acylcarnitinen gemessen (Rardin et al. 2013). SIRT5 ermöglicht weiterhin durch die Desuccinylierung von Lysinresten der Langketten-Acyl-CoA-Dehydrogenase (VLCAD) eine verbesserte Bin-

dung des Enzyms an Cardiolipin und damit einen verbesserten Ablauf der Fettsäure-Oxidation (Zhang et al. 2015). In einer globalen SIRT5<sup>(-/-)</sup>-Maus fand sich bei reduzierter Nahrungszufuhr eine eingeschränkte Ketogenese mit einer Hypersuccinylierung des Schrittmacherenzym, der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Synthase 2 (HMGCS2) (Rardin et al. 2013). Im Herzen scheint SIRT5 durch eine Beeinflussung der Enoyl-CoA-Hydratase A (ECHA) eine verstärkende Wirkung auf die Fettsäure-Oxidation zu haben (Sadhukhan et al. 2016). Bezüglich des Einflusses auf die mitochondriale Atmungskette, den Sauerstoffverbrauch und die ATP-Produktion gibt es noch keine eindeutigen Ergebnisse, ob das Vorhandensein von SIRT5 eine hemmende oder verstärkende Wirkung hat (Park et al. 2013, Buler et al. 2014). SIRT5 spielt auch bezüglich der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und der Regulation der Apoptose eine Rolle. So schützt eine SIRT5-Überexpression in Kardiomyozyten vor der Apoptose durch oxidativen Stress (Liu et al. 2013). Dem Protein wird weiterhin eine antioxidative Potenz zugesagt, da es durch Desuccinylierung die Superoxid-Dismutase 1 aktiviert, was zu einer verstärkten antioxidativen Kapazität der Zelle führt (Lin et al. 2013, Bugger et al. 2016, Fu et al. 2016). Weiterhin ist bekannt, dass SIRT5 mittels Deacetylierung Peroxiredoxin 1 und den Transkriptionsfaktor FOXO3 in ihrer antioxidativen Wirkung stärkt (Wang et al. 2015, Bugger et al. 2016, Wang et al. 2015). Bei lang anhaltendem oxidativem Stress wird die SIRT5-Expression allerdings dosis- und zeitabhängig um bis zu 50% reduziert (Liu et al. 2013). Werden SIRT5<sup>(-/-)</sup>-Kardiomyozyten oxidativem Stress ausgesetzt, kommt es zu einer signifikant höheren Zahl von apoptotischen Zellen und einer verstärkten Aktivität der an der Apoptose beteiligten Enzyme (Caspasen) (Liu et al. 2013). Eine erhöhte Konzentration von NAD<sup>+</sup> bei reduzierter Nahrungszufuhr führt zu einer leicht erhöhten Aktivität von SIRT5 im Falle des Fastens (Nakagawa et al. 2009, Nakamura et al. 2012). Eine starke Expression von PGC1  $\alpha$  resultiert, PPAR  $\alpha$ - und ERR  $\alpha$ -abhängig, in einer bis zu vierfach erhöhten Expression von SIRT5 (Buler et al. 2014). Im Gegensatz dazu führt eine erhöhte Expression von AMPK zu einer um bis zu 44% reduzierten Expression von SIRT5 (Buler et al. 2014). Beide Erkenntnisse zusammen genommen erklären die nur gering erhöhte Expression von SIRT5 im Falle der reduzierten Nahrungszufuhr. Während des Fastens werden sowohl AMPK als auch PGC1  $\alpha$  vermehrt exprimiert, so dass sich die beiden Regulationsmechanismen bezüglich der SIRT5-Expression fast ausgleichen (Buler et al. 2014).

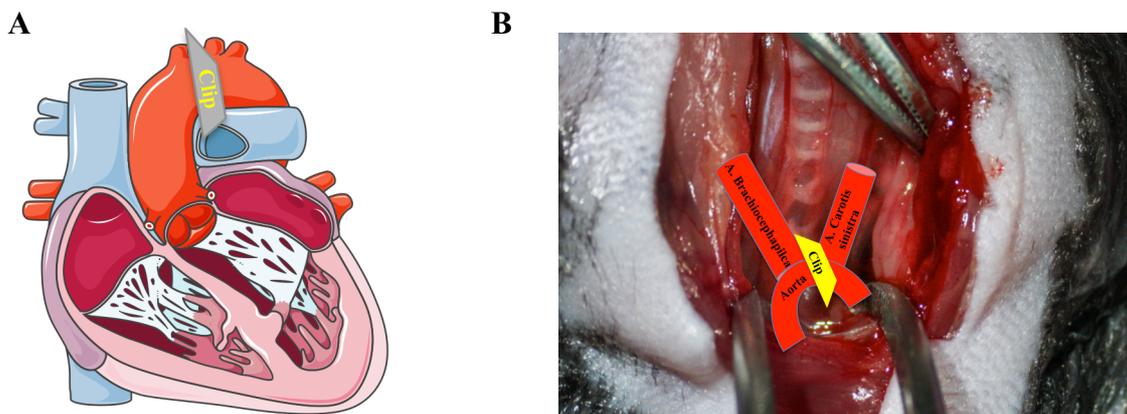
Auch wenn es noch kaum belastbare Ergebnisse zu der Rolle von SIRT5 im Herzstoffwechsel oder in der Entwicklung kardialer Pathologien wie der Herzinsuffizienz gibt, bleibt zu vermuten, dass SIRT5 einen wichtigen Anteil an einem funktionierenden, kardialen Energie-

stoffwechsel hat (Liu et al. 2013, Bugger et al. 2016). Erkenntnisse, dass das Ausmaß von Succinylierung und Malonylierung je nach Organsystem sehr unterschiedlich ausfallen können (Rardin et al. 2013), machen eine isolierte Betrachtung der Rolle von SIRT5 im Herzstoffwechsel notwendig.

## 2.6 Energieanforderungen im *pressure-overload*-Modell

### *Pressure-overload* durch TAC

Im *pressure-overload*-Modell mittels transverser Aortenkonstriktion wird das Herz durch eine künstliche Verengung der Aorta einer erhöhten Nachlast ausgesetzt. Das Herz reagiert in den meisten Fällen mit einer Hypertrophie, um so den nötigen Blutdruck, der für die Überwindung der Verengung notwendig ist, aufrecht zu erhalten (Nakamura et al. 2001, Liao et al. 2002). Die transverse Aortenkonstriktion (TAC) ist eine gut etablierte Methode, um am linken Ventrikel eine Hypertrophie als Reaktion auf eine chronische Druckbelastung zu erzeugen. Mittels eines Clips wird die Aorta zwischen dem Abgang des Truncus Brachiocephalicus und der linken A. carotis künstlich verengt. Durch diese Engstelle erhöht sich auf kurzer Strecke der Druck hinter dem linken Ventrikel.



**Abbildung 3.** Darstellung der transversen Aortenkonstriktion, **A** schematisch und **B** am offenen Situs.

### Substratstoffwechselveränderungen im energetisch beanspruchten Herzen

Die erhöhte Druckbelastung, die durch die TAC-Operation herbeigeführt wird, erzeugt im Herzen erhöhte Energieanforderungen, die über den kardialen Stoffwechsel gedeckt werden müssen. Zahlreiche Studien zeigten eine Veränderung des kardialen Stoffwechsels während

anhaltend energetisch anspruchsvollen Phasen in Richtung des fetalen Stoffwechsels im Herzen (Osorio et al. 2002, Huss and Kelly 2004, Ventura-Clapier, Garnier and Veksler 2004, Stanley et al. 2005). Das Substrat Glukose spielt im energetisch beanspruchten Herzen eine größere Rolle in der ATP-Produktion als im physiologischen Zustand (Ingwall 2007). Auch wenn die ATP-Synthese mittels Glykolyse um das Zehnfache ansteige, bleibe die Fettsäure-Oxidation aber der vorherrschende Stoffwechselweg im Herzmetabolismus (Ingwall 2007). Wie ausgeprägt diese Umstellung stattfindet, sowie die zeitliche und kausale Einordnung dieses veränderten Metabolismus wurde allerdings noch nicht abschließend geklärt (Lesnefsky et al. 2001, Osorio et al. 2002, Chandler et al. 2004, Stanley et al. 2005, Neubauer 2007).

Weiterhin gibt es Hypothesen, dass die Mitochondrien durch die strukturellen und funktionellen Einschränkungen eine reduzierte Aufnahmekapazität für beide Substrate haben und somit der insgesamt eingeschränkte Stoffwechsel erklärt werden kann (Razeghi et al. 2001, Ingwall 2007). Im Falle einer nicht adäquaten Anpassung des Herzens an die erhöhten Energieanforderungen zeigt sich eine reduzierte Kapazität zur ATP-Synthese und eine um bis zu 30% geringere ATP-Konzentration (Ingwall and Weiss 2004, Ventura-Clapier et al. 2004, Stanley et al. 2005, Ingwall 2007, Neubauer 2007, Shekar et al. 2014). Je weiter die Belastung fortschreitet, desto ineffizienter wird der gesamte Energiestoffwechsel und desto ausgeprägter sind die strukturellen und die funktionellen Einschränkungen der Mitochondrien (Dzeja et al. 2000, Bugger et al. 2016). Aufgrund der reduzierten Funktion der Mitochondrien ist neben der ATP- auch die  $\text{NAD}^+$ -Konzentration reduziert, was protektive Mechanismen wie beispielsweise die Funktion der Sirtuine hemmen kann (Pillai et al. 2010).

### **Veränderungen auf enzymatischer und transkriptionaler Ebene nach TAC**

In Bezug auf posttranslationale Modifikationen wird den Lysin-Acetylierungen im Herzen, welches chronisch erhöhten energetischen Anforderungen ausgesetzt ist, eine wichtige Rolle beigemessen (Zhang et al. 2009). An 20% der relevanten mitochondrialen Proteine finden sich derartige Acetylierungen (Grillon et al. 2012). Enzyme der Fettsäure-Oxidation, wie die LCAD, können so beispielsweise durch die Lysin-Acetylierung in ihrer Aktivität gehemmt sein (Grillon et al. 2012). Ziele dieser posttranslationalen Modifikation sind weitere metabolische Enzyme, genauso wie Transkriptionsfaktoren (Zhang et al. 2009). In herzinsuffizienten Ratten sind weiterhin 26% der Proteine posttranslational phosphoryliert, so zum Beispiel erneut die LCAD, der Komplex III der Atmungskette und die ATP-Synthase (Giorgianni et al. 2014, Guzman Montesana et al. 2014). Je weiter die energetische Belastung fortschreitet,

desto häufiger finden sich derartige Maladaptationen und Remodeling-Prozesse, die für die letztendliche energetische Dysbalance sorgen.

Die beschriebenen Veränderungen im Substratmetabolismus werden auch begleitet von Veränderungen auf Ebene der Genexpression der verschiedenen Stoffwechsellzyme (Razeghi et al. 2001, Bugger et al. 2010). Die mRNA-Expression für Proteine der Glykolyse, Fettsäure-Oxidation und des Citratzyklus sind herunter reguliert (Lei et al. 2004, Ventura-Clapier et al. 2004, Bugger et al. 2010). Insgesamt werden 70 von 141 mitochondrialen Proteinen auf Ebene der mRNA-Expression im insuffizienten Herzen reguliert (Bugger et al. 2010). Vor allem die Expression von Enzymen der Fettsäure-Oxidation, beispielsweise der CPT, der MCAD, und der LCAD sind signifikant reduziert (Osorio et al. 2002). Auch die Expression der Cofaktoren PGC1  $\alpha$ , ERR  $\alpha$  und NRF-2 sind auf Ebene der Genexpression herunterreguliert, ebenso die Expression des mtTFA (Ventura-Clapier et al. 2004). Letzteres führt zu einer reduzierten ATP-Produktion und einer verminderten Aktivität der Enzyme der Atmungskette. Der mitochondriale Gehalt von PGC1  $\alpha$  ist durch eine verstärkte Aktivität der AMPK, im insuffizienten Herzen nichtsdestotrotz hoch (Ingwall and Weiss 2004). Durch posttranslationale Modifikation, wie Acetylierung scheint der Coaktivator aber in seiner letztendlichen Funktion gehemmt zu sein (Bugger et al. 2010, Schilling and Kelly 2011, Bayeva et al. 2013, Wende et al. 2015). Es ist weiterhin beschrieben, dass auch die Veränderungen im Substratmetabolismus eine hemmende Wirkung auf die Funktion von sowohl PGC1  $\alpha$ , als auch ERR  $\alpha$  haben (Bugger et al. 2010, Schilling and Kelly 2011). Entsprechend der verminderten Aktivität von PGC1  $\alpha$  ist auch der Komplex aus PPAR  $\alpha$ /RXR nur eingeschränkt im insuffizienten Herzen aktiv und spielt eine scheinbar große Rolle bei der Entwicklung von kontraktile Dysfunktion (Huss and Kelly 2004).

### **Oxidativer Stress im energetisch beanspruchten Herzen**

In Herzen wurden unter erhöhten energetischen Anforderungen sowohl erniedrigte mitochondriale Atmungsraten, als auch Mutationen in der mtDNA festgestellt. Die Produktion von ROS ist erhöht (Xiao et al. 2005), wobei als Quelle vor allem die Komplexe I und III vermutet werden (Lesnefsky et al. 2001, Stanley et al. 2005, Bayeva et al. 2013, Rosca, Tandler and Hoppel 2013). Diese erhöhte ROS-Produktion könnte einen erheblichen Anteil an der Entstehung der Hypertrophie im Herzen, als Antwort auf den mechanischen Stress und auf die mitochondriale Dysfunktion haben (Rosca et al. 2013).



exzentrische Hypertrophie mit Dilatation des Ventrikels und nur mäßiger Wanddickenzunahme. Bei Druckbelastung, also einer Erhöhung des Afterloads, kommt es zu einer konzentrischen Hypertrophie mit deutlicher Wanddickenzunahme und Verkleinerung des Ventrikeldurchmessers. Durch die, bei erhöhter Herzfrequenz, verkürzte Dauer der Diastole ist die Durchblutung der Koronararterien verkürzt. Die entstehende Koronarinsuffizienz führt zu einer Reduktion der Kontraktilität aufgrund von Sauerstoffunterversorgung des Myokards und schlussendlich zu einer Abnahme des Schlagvolumens. Problematisch ist auch die Tatsache, dass die Dichte der Kapillaren, die die Myokardzellen mit sauerstoffreichem Blut versorgen, in der Hypertrophie nicht adäquat zunimmt. Ein eingeschränkter Substratmetabolismus im Herzen führt zusätzlich zu einer kontraktilen Dysfunktion und einem oft inadäquaten strukturellen Remodeling in Form von interstitieller Fibrose (Stanley et al. 2005). Bei einer systolischen Dysfunktion dient der echokardiographisch gemessene Wert der Ejektionsfraktion zur Einteilung der Herzinsuffizienz in Schweregrade. Die Ejektionsfraktion beschreibt, wie viel Prozent des Blutvolumens pro Herzschlag von einer Herzkammer ausgeworfen werden. Eine leichte Einschränkung der Herzfunktion liegt bei einer Ejektionsfraktion inferior 54% vor. Bei einer Ejektionsfraktion von unter 30% spricht man von einer hochgradigen Herzinsuffizienz.

Die Herzinsuffizienz verstanden als multifaktorielle Systemerkrankung gewinnt in einer alternden Gesellschaft immer mehr an Bedeutung und gehört zu einer der häufigsten internistischen Erkrankungen in Europa (Neubauer 2007). Ein hoher Leidensdruck bei Patienten und Angehörigen, sowie stetig steigende Zahlen von Hospitalisierungen und damit steigende Kosten für das Gesundheitssystem geben Anlass zu ausgedehnten Forschungsansätzen, um die Entstehung der Herzinsuffizienz besser zu verstehen und Therapieansätze optimieren zu können (Mosterd and Hoes 2007, Neubauer 2007, van Riet et al. 2016). Da sie hämodynamische und inotrope Nebeneffekte auf ein Minimum reduzieren können, rücken Therapieansätze auf Stoffwechselebene immer mehr in den Fokus der Herzinsuffizienzforschung (Stanley et al. 2005). Wie bereits dargestellt, leisten die Mitochondrien als Generator des energiereichen Substrates ATP einen entscheidenden Beitrag zur Aufrechterhaltung eines physiologischen, kardialen Stoffwechsels und sind damit ebenfalls im Fokus der aktuellen Forschung (Guzman Montesana et al. 2014).

### **3 Ziel der Arbeit**

Pathologische Veränderungen im Energiestoffwechsel des Herzens tragen erheblich zur Entstehung einer Herzinsuffizienz bei und sind somit Gegenstand aktueller Forschung. Die Familie der Sirtuine spielen als  $\text{NAD}^+$ -abhängige Stoffwechsellzyme in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle. SIRT5 wirkt vor allem als Desuccinylase und Demalonylase in entscheidenden Stoffwechselwegen wie der Glykolyse oder der Fettsäureoxidation. Bezogen auf seine Rolle im kardialen Stoffwechsel ist es allerdings noch unzureichend erforscht. Es war Ziel dieser Arbeit, den Einfluss einer fehlenden SIRT5-Expression auf die kardiale und mitochondriale Funktion zu untersuchen, sowie die Rolle von SIRT5 während einer Anpassung an erhöhte kardiale Energieanforderungen im *pressure-overload*-Modell darzustellen.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Geräte

Tabelle 1: Laborgeräte.

Gerät	Hersteller
Absaugpumpe	Fa. Grägerwerk AG, Lübeck
CFX96-Plate Reader	Fa. Bio Rad, München
Cryotom Leica CM 1510S	Fa. Leica, Microsystems, Nussloch
Dispergierstab T10 basic Ultra-TURRAX	IKA, Staufen
Dunstabzug	Fa. Waldner, Wangen im Allgäu
Echokardiographiegerät Vivid 7 Dimension	GE, Healthcare, München
Eismaschine	Fa. Ziegler, Isernhagen
Elektrophoresesystem „Criterion“	Fa. BioRad, München
Fluoreszenzlampe	Fa. Leistungselektronik, Jena
Gefrierschränke, Kühlschränke	Fa. Liebherr, Kirchdorf
Geldokumentationssystem	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Gellaufkammer	Fa. Bio Rad, München
GLOMAX 96 Microplate Luminometer	Promega, Madison, WI, USA
Heizblock	VWR, West Chester, USA
Homogenisiergerät	Fa. Glas-Col, USA
Magnetrührer C-Mag HS 10	Fa. IKA, Staufen
Mikroskop, Axioplan 2 Imaging	Zeiss, Jena
pH-Meter 766 calimatic	Fa. Knick, Berlin
Respirometer MT200A	Fa. Strathkelvin Instruments, Scotland
Sauerstoffelektrode 1302	Fa. Strathkelvin Instruments, Scotland
SpectraMax Plus 384 Microplate Reader	Molecular Devices Spectra Max Plus
Spectrophotometer NanoDrop ND-1000	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Shaker „Vortex Genie“	Fa. Scientific Industries, NY, USA
Thermocycler	Fa. Biometra, Göttingen
Tischwaage CS200	Fa. Ohaus, New York, USA

Tischzentrifuge 5415D

Trichter

Wasserbad E100

Western Blot-System „Criterion“

Zentrifuge Allegra 6R

Fa. Eppendorf, Hamburg

VWR International GmbH, Darmstadt

Fa. Lauda, Lauda-Königshofen

Bio Rad, München

Fa. Beckmann-Coulter GmbH, Krefeld

## 4.1.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien.**

Material	Hersteller
Chirurgisches Besteck	Fa. Roboz Instr., Gaithersburg, USA
Chirurgischer Seidenfaden 4-0	SMI, St. Vith, Belgien
Deckglässchen	Fa. Roth, Karlsruhe
Falcon Tubes	Fa. Greiner Bio-One, Frickenhausen
Messzylinder	Fa. Roth, Karlsruhe
Mikroliterspritzen	Fa. Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Microclip	Teleflex Medical Europe Ltd, Athlone
SuperFrost Plus Objektträger	Fa. Langenbrick, Emmendingen
Petrischalen	Fa. Roth, Karlsruhe
Pipetten, Pipettenspitzen	Fa. Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Fa. Eppendorf, Hamburg
PVDF-Membran	Millipore, Bedford, USA
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nürnbrecht
Sterican <sup>®</sup> Standardkanülen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Verschlussklammern	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Weck <sup>®</sup> Horizon <sup>™</sup> Metal Ligation System	Teleflex Medical Europe Ltd, Athlone
96-Well Mikrotiterplatten	Fisher Scientific GmbH, Schwerte Greiner-Bio-one, Frickenhausen

## 4.1.3 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma Aldrich, Carl Roth GmbH & Co KG und VWR Chemicals bezogen.

#### 4.1.4 Oligonukleotide

**Tabelle 3: Nukleotidsequenz der Forward- und Reverse-Primer für RT-PCR.**

Gen	Primer	Primer-Sequenz (5'-3')
18srRNA	18s fwd	CTCAACACGGGAAACCTCAC
	18s rev	CGCTCCACCAACTAAGAACG
$\alpha$ -mhc	$\alpha$ -MHC-fwd	CGGGTGAAGAAGAAGATGGA
	$\alpha$ -MHC-rev	CTCCTTCAGGTCGTCATTGG
Ant1	Ant1-fwd	AGGGTCTCTACCAGGGTTTCA
	Ant1-rev	TCACACTCTGGGCAATCATC
Cat	Forward	AGCGACCAGATGAAGCAGTG
	Reverse	TCCGCTCTCTGTCAAAGTGTG
GPX1	GPX1-fwd	GTCCACCGTGTATGCCTTCT
	GPX1-rev	TCACCATTCACTTCGCACTT
GPX4	GPX4-fwd	ATGCCCCGATATGCTGAGTGT
	GPX4-rev	CGGCAGGTCCTTCTCTATCA
PRDX3	PRDX3-fwd	ACGGAGTGCTGTTGGAAAGT
	PRDX3-rev	TTGATCGTAGGGGACTCTGG
Sod2	Sod2 fwd	ACAACCTCAGGTCGCTCTTCA
	Sod2 rev	GAACCTTGGACTCCCACAGA
Trxn1	Trxn1 fwd	GCCAAAATGGTGAAGCTGAT
	Trxn1 rev	TGATCATTTTGCAAGGTCCA
VDAC1	VCAD1 fwd	CTCCCACATACGCCGATCTT
	VCAD1 rev	GCCGTAGCCCTTGGTGAAG

**Abkürzungen:** 18srRNA: 18s ribosomal RNA,  $\alpha$ -mhc:  $\alpha$ -myosin heavy chain, Ant1: Adenine nucleotide translocator 1 (solute carrier family 25), Cat: Catalase, GPX1: Glutathione peroxidase 1, GPX4: Glutathione peroxidase 4, single exon, PRDX3: Peroxiredoxin 3, Sod2: Superoxide dismutase [Mn] 2 (mitochondrial), Trxn1: Thioredoxin 1, VDAC1: Voltage-dependent anion-selective channel protein 1, fwd: forward, rev: reverse.

## 4.1.5 Kit-Systeme

Tabelle 4: Kitsysteme.

Kitsystem	Hersteller
Accustain Trichrome Stain Kit	Sigma Aldrich, Taufkirchen
ENLITEN®rLuciferase/Luciferin Kit	Promega, Madison, WI, USA
Micro BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific Inc., Waltham, USA
RNeasy® Midi kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
SuperScript® III Reverse Transcriptase	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
SYBR-Green Supermix	BioRad, Hercules, CA, USA

## 4.1.6 Antikörper

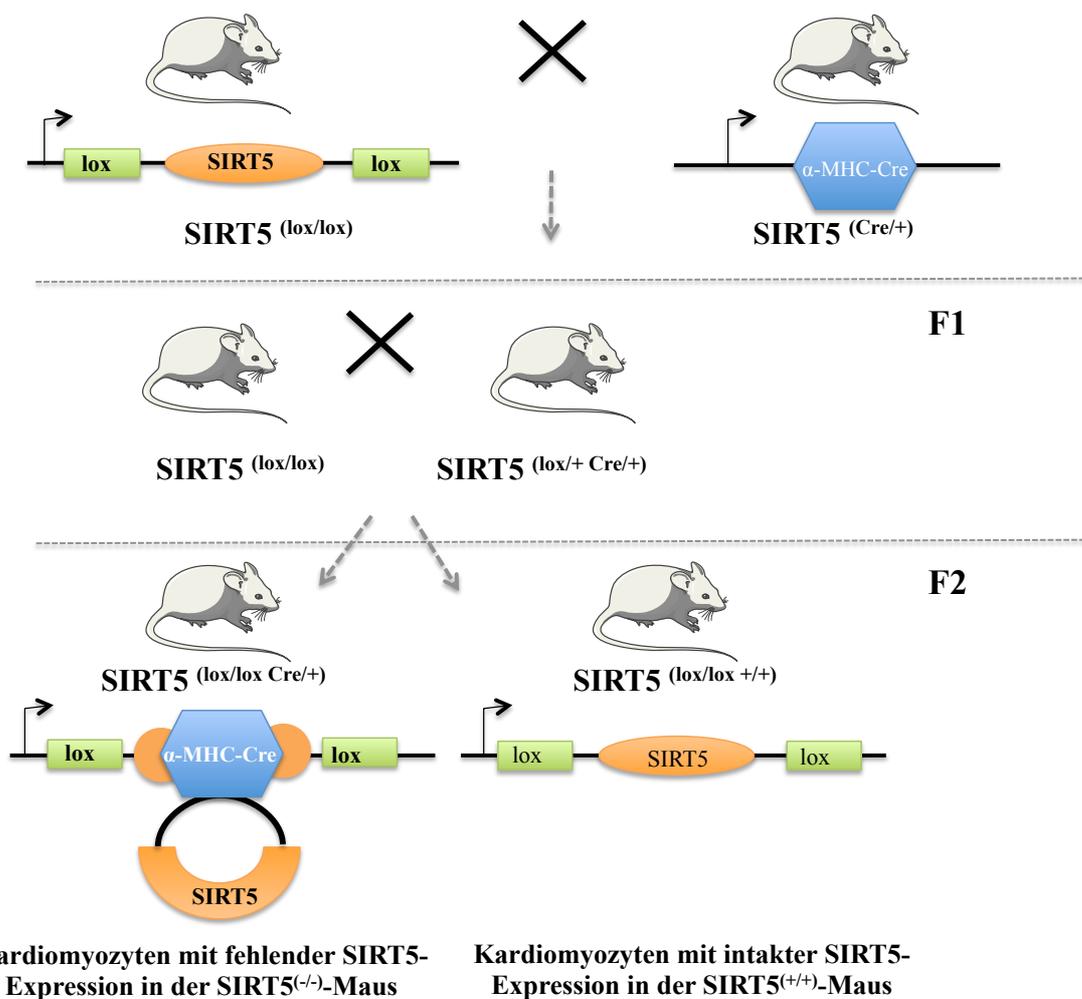
Tabelle 5: Antikörper.

Antikörper	Hersteller
Alexa Fluor® IgG 647 (Secondary)	Cell Signaling
HNE-Michael Adducts Ab	Merck-Milliore
Malonyllysine Antibody	PTM Biolabs
Sirt5 (D8C3) Rabbit mAb	Cell Signaling
Succinyllysine Antibody	PTM Biolabs
WGA, Alexa Fluor® 488 Conjugate	Fisher Scientific GmbH, Schwerte

## 4.1.7 Tiere und Tierhaltung

Die Experimente wurden mit männlichen kardiomyozyten-spezifischen SIRT5<sup>(-/-)</sup>-Mäusen und transgenen Kontrollmäusen durchgeführt. Für die Generierung des *Knockouts* wurden SIRT5<sup>(lox/lox)</sup>-Mäuse mit reinem C57Bl6/J-Hintergrund von der Arbeitsgruppe John Auwerx, École Polytechnique Fédérale de Lausanne verwendet. Bei diesen Mäusen wurden an den Flanken des Sirt5-Gens so genannte loxP-Stellen inseriert (*Knock in*), die von spezifischen Rekombinasen erkannt werden. So kann das Sirt5-Gen spezifisch aus dem Genom entfernt

werden. Zur Generierung einer kardiomyozytenspezifischen  $SIRT5^{(-/-)}$ -Maus wurde eine homozygote  $Sirt5^{(lox/lox)}$  mit einer  $\alpha$ -MHC-Cre-Maus ( $Cre/+$ ) gekreuzt. Bei letzterer Maus wurde das Gen, das für die SIRT5-spezifische Rekombinase kodiert, am  $\alpha$ -MHC-Promotor inseriert, so dass die Rekombinase zusammen mit dem  $\alpha$ -MHC-Gen ausschließlich im Herzen exprimiert wird. Da das SIRT5-Gen in der  $\alpha$ -MHC-Cre-Maus allerdings nicht mit loxP-Stellen markiert ist, entstehen bei dieser Kreuzung heterozygote  $Sirt5^{(lox/+)}$ -Mäuse. Aus diesem Grund wird die entstandene Generation in einem zweiten Kreuzungsschritt noch einmal mit homozygoten  $Sirt5^{(lox/lox)}$ -Mäusen verpaart. So entstehen wieder homozygote  $Sirt5^{(lox/lox)}$ -Mäuse, die entweder die cre-Rekombinase exprimieren ( $cre/+$ ) oder die die Cre-Rekombinase nicht exprimieren ( $+/+$ ). Die homozygoten  $Sirt5^{(lox/lox)}/cre$  positiven Tiere ( $SIRT5^{(lox/lox) Cre/+}$ ) sind kardiomyozytenspezifische  $SIRT5^{(-/-)}$ -Mäuse und die homozygoten  $Sirt5^{(lox/lox)}/cre$  negativen Tiere transgene  $SIRT5^{(+/+)}$ -Kontroll-Mäuse ( $SIRT5^{(lox/lox) +/+}$ ).



**Abbildung 5:** Generierung einer  $SIRT5^{(-/-)}$ -Maus. Die  $SIRT5^{(lox/lox)}$ -Mäuse werden mit  $\alpha$ -MHC-Cre transgenen Mäusen und  $SIRT5^{(lox/lox)}$ -Mäusen gekreuzt, um so  $SIRT5^{(lox/lox) cre/+}$ -Mäuse zu erhalten.

Die Tiere leben in einem 12 Stunden Tages- und 12 Stunden Nachtzyklus bei einer Raumtemperatur von 22°C. Die Mäuse hatten ständigen freien Zugang zu Fertigfutter und Wasser und besaßen zum Zeitpunkt der nachfolgend beschriebenen Experimente ein Alter von acht bis zehn Wochen. Sämtliche dieser Versuche wurden durch die Tierversuchskommission des Regierungspräsidiums Freiburg genehmigt (Aktenzeichen G14/76).

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Genotypisierung

#### Lyse der Mäuseschwänze

Für die Genotypisierung der Mäuse werden Schwanzspitzenproben der drei Wochen alten Mäuse gewonnen und zunächst bei -20°C eingefroren. Zu Beginn der Lyse werden die aufgetauten Schwanzspitzen bei 56°C über Nacht in Lysepuffer inkubiert.

#### **Tabelle 6: Lysepuffer.**

---

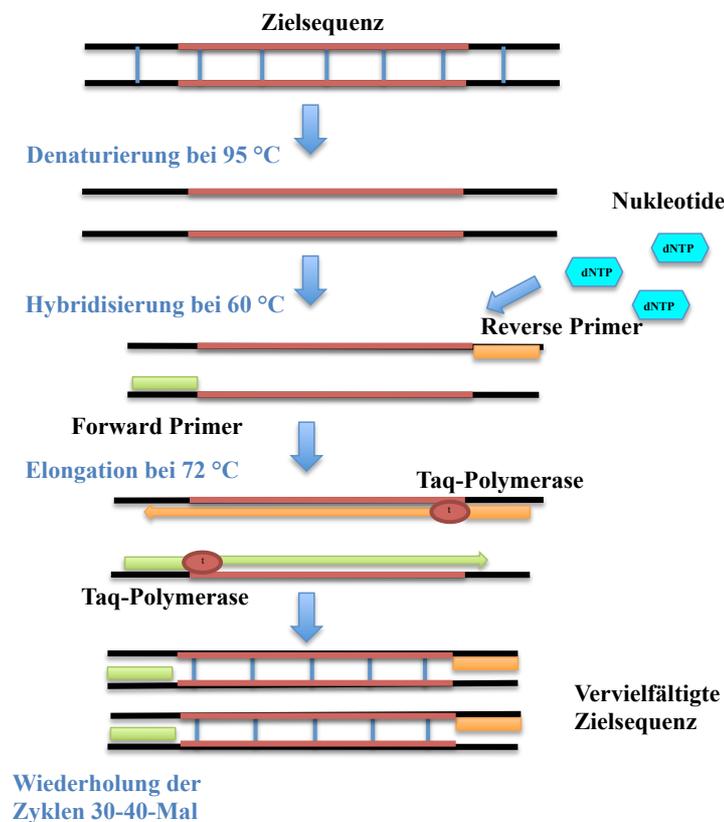
Tris/HCl	100 mM
EDTA	5 mM
SDS	0,2 %
NaCl	200 mM
Proteinase K	0,2 mg/ml

---

Zu den lysierten Schwanzspitzen werden 200 µl Isopropanol gegeben und gevortext. Nach zehnminütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wird die Lösung für 20 Minuten bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der entstandene Überstand wird abgenommen und das ausgefallene Pellet zum Waschen in 500 µl 70% Ethanol resuspendiert. Erneut wird die Lösung nun für 10 Minuten bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der gesamte Überstand wird erneut vorsichtig abgenommen und die Probe trocknet für 10 Minuten bei Raumtemperatur im geöffneten Eppendorf-Reaktionsgefäß. Zuletzt mit 100 µl ddH<sub>2</sub>O versetzt, können die Lyseate wieder bei -20°C eingefroren werden oder sofort für die Genotypisierungs-PCR verwendet werden.

## Konventionelle PCR

Bei der konventionellen Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction* = PCR) handelt es sich um ein selektives und sehr effizientes Verfahren zur *in vitro* Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte. In mehreren Zyklen entstehen so, ausgehend von einem einzelnen DNA-Strang, vollautomatisch zahlreiche Kopien der Ausgangssequenz. Im Reaktionsansatz befinden sich die sequenzspezifischen Primer, die Nukleotide (dATP, dGTP, dCTP und dTTP), die zu amplifizierende DNA-Sequenz und die hitzestabile Taq-Polymerase. Zunächst wird das Gemisch auf 95°C erhitzt, um die DNA-Doppelstrangstruktur zu denaturieren. Nun ist ein Binden der beiden komplementären DNA-Primer bei 60°C möglich (Hybridisierung). Die Primer markieren somit eine DNA-Sequenz spezifischer Länge. Dank ihrer Hitzeresistenz kann die Taq-Polymerase im nächsten Schritt bei 72°C an die Primärsequenz binden und diese unter Verwendung der im Reaktionsansatz enthaltenen Nukleotide vervielfältigen (Elongation). Diese neu synthetisierten DNA-Sequenzen können im nächsten automatisch beginnenden Durchlauf ebenfalls erneut als Primärsequenz (*Template*) für die Taq-Polymerase dienen. Nach 30 – 40 Zyklen liegt die Sequenz millionenfach vervielfältigt im Reaktionsansatz vor.



**Abbildung 6:** Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion mit den Schritten Denaturierung, Hybridisierung und Elongation.

## PCR-Programme $\alpha$ MHC-Cre und SIRT5

Die konventionelle PCR wurde in dieser Arbeit für die Genotypisierung der verwendeten Mäuse genutzt. Es wurden jeweils eine PCR zur Charakterisierung des SIRT5-Genotyps und eine PCR zur Charakterisierung des Cre-Genotyps durchgeführt.

**Tabelle 7: Mastermix SIRT5-PCR, Gesamtvolumen: 25  $\mu$ l.**

---

ddH <sub>2</sub> O	
10x Buffer, 15 mM MgCl <sub>2</sub>	1x
10mM dNTP	0,2 mM
10 $\mu$ M Sirt5L2 Fw	0,4 $\mu$ M
10 $\mu$ M Sirt5L2 Rv	0,4 $\mu$ M
Taq. Pol. (5U/ $\mu$ l)	0,2 U/ $\mu$ l
DNA	3 $\mu$ l

---

**Tabelle 8: Mastermix  $\alpha$ MHC-Cre –PCR Gesamtvolumen: 25  $\mu$ l.**

---

ddH <sub>2</sub> O	
10x Buffer	1x
25mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
10mM dNTPs	0,2 mM
10 $\mu$ M 9543	1 $\mu$ M
10 $\mu$ M 9544	1 $\mu$ M
10 $\mu$ M oIMR8744	0,2 $\mu$ M
10 $\mu$ M oIMR8745	0,2 $\mu$ M
Taq. Pol. (5U/ $\mu$ l)	0,2 U/ $\mu$ l
DNA	3 $\mu$ l

---

Bei der SIRT5-PCR findet die Denaturierung 5 Minuten und 30 Sekunden lang bei 95°C statt, die Hybridisierung 30 Sekunden lang bei 62°C. Anschließend folgt die Elongation für 5 Minuten und 30 Sekunden bei 72°C. Dieser Turnus wird 40-mal wiederholt. Der Ansatz der  $\alpha$ MHC-cre-PCR inkubiert pro Zyklus für die Denaturierung 3 Minuten und 30 Sekunden lang

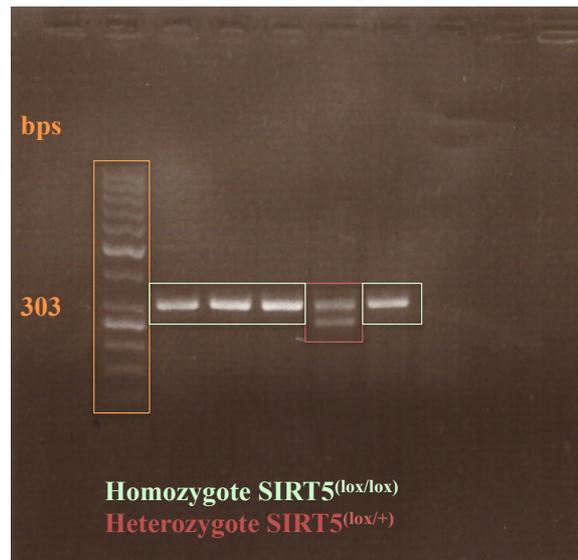
bei 94°C, anschließend findet die Hybridisierung für 60 Sekunden bei 58°C und die Elongation für insgesamt 3 Minuten bei 72°C statt. Dieser Zyklus wird 35-mal wiederholt.

**Tabelle 9: Nukleotidsequenz der Forward- und Reverse-Primer für die Genotypisierungs-PCR.**

Gen	Primer	Primer-Sequenz (5'-3')
Sirt5L2	Sirt5L2 fwd Sirt5L2 rev	TGTGCTTGTACGTGCTGTGC CCCCTCACTCAGCTCACAAA
9543 9544	Transgene fwd Transgene rev	AGACAGACGATCCCTCCTATCTCC CTCATCACTCGTTGCATCATCGAC
oIMR8744 oIMR8745	IPC fwd IPC rev	CAAATGTTGCTTGTCTGGTG GTCAGTCGAGTGCACAGTTT

**Abkürzungen:** Sirt5L2: Sirtuin 5 L2, 9543: Transgene Forward Flox, 9544: Transgene Reverse Flox, oIMR8744: International Positive Control Forward, oIMR8745: International Positive Control Reverse, fwd: forward, rev: reverse.

Die PCR-Produkte werden mittels Gelelektrophorese in einem 2%igen Agarose-Gel sichtbar gemacht. Die DNA wird mit Ladebuffer versetzt und es werden 10 µl Probe in die Taschen des Agarose-Gels pipettiert. Hinzu kommt ein DNA-Kontroll-Leiter zur Klassifizierung der Banden. Im angelegten elektrischen Feld wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren zur Kathode. Dank der Siebstruktur des Agarosegels werden die Genprodukte der Größe nach aufgetrennt. Nach Durchlauf der jeweiligen Laufzeit wird das Gel in einem UV-Transilluminator belichtet. Bei den Tieren, die in der SIRT5-PCR ausschließlich eine Bande bei 303 bps aufweisen, handelt es sich um die homozygoten  $Sirt5^{(lox/lox)}$ -Mäuse, die für die Versuche verwendet wurden (siehe 3.1.6 und Abbildung 7, S. 34). In der Cre-PCR wird weiterhin festgestellt welche der homozygoten  $SIRT5^{(lox/lox)}$ -Mäuse Cre-positiv (kardiomyozytenspezifischen  $SIRT5^{(-/-)}$ -Maus) oder Cre-negativ ( $SIRT5^{(+/+)}$  Kontrollgruppe) sind. Die  $SIRT5^{(-/-)}$ -Mäuse zeigen in der Cre-PCR eine Bande in der Größe bei 300 *base pairs* (bps).

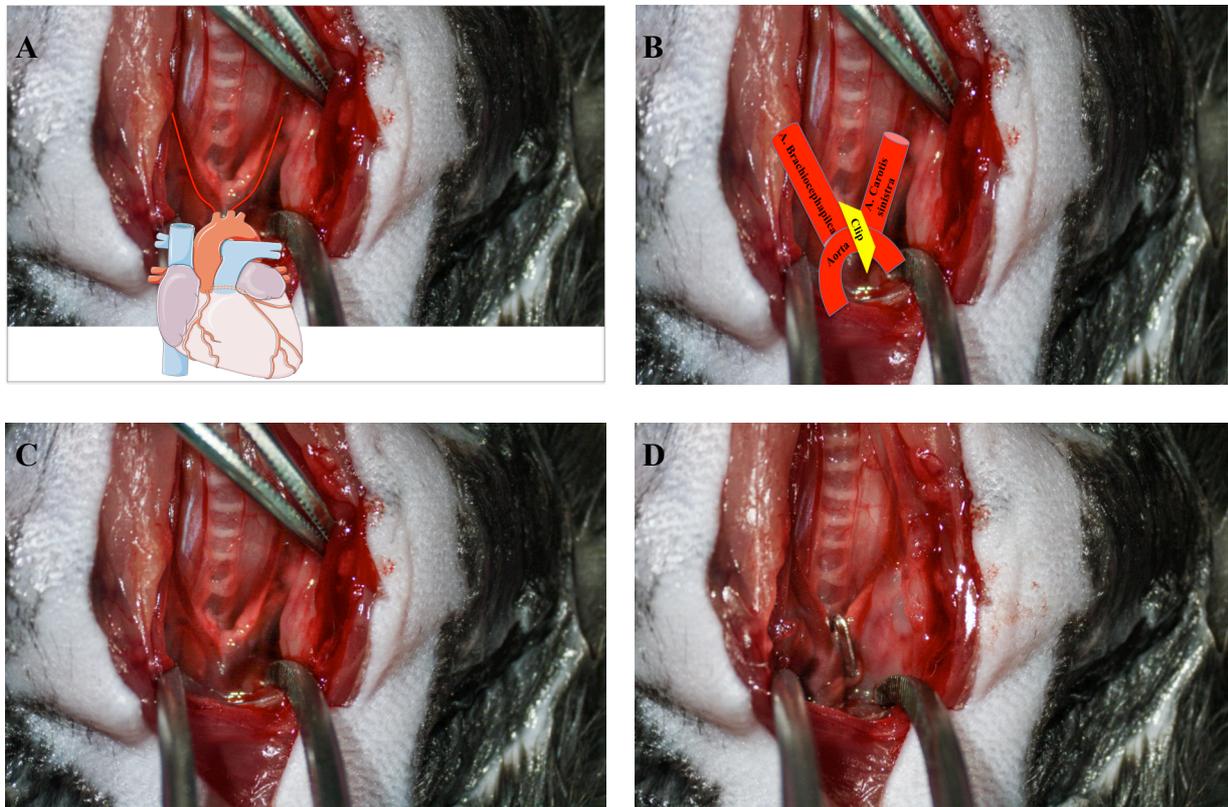


**Abbildung 7:** Beispielhafte Aufnahmen eines belichteten Agarosegels. SIRT5-PCR mit grüner Markierung der, für die Versuche verwendeten, homozygoten  $SIRT5^{(lox/lox)}$ -Mäuse ( $SIRT5^{(-/-)}$ ) und roter Markierung der nicht verwendeten heterozygoten  $SIRT5^{(lox/+)}$ -Mäuse; bps: *base pairs*.

#### 4.2.2 Transverse Aortenkonstriktion

Eine erhöhte Druckbelastung des Herzens wurde für diese Arbeit durch die Transverse Aortenkonstriktion an acht Wochen alten Mäusen herbeigeführt. Dieser Eingriff wurde von Dr. Christoph Koentges, Abteilung Kardiologie & Angiologie I, Universitäts-Herzzentrum Freiburg-Bad Krozingen, durchgeführt. Die Mäuse werden hierfür mit einer intraperitonealen Einzelinjektion von Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (6 mg/kg) in Narkose versetzt. In Rückenlage, unter einem Binokular mit 10-facher Vergrößerung fixiert, wird parasternal beidseits großzügig die Behaarung entfernt und die Haut mit einer 11%igen Iod-Lösung und 70% Ethanol desinfiziert. Nach einem craniocaudalen Hautschnitt von 5-10 mm Länge werden die Speicheldrüsen identifiziert und zurückgehalten. Die Maus wird mittels eines cranial angelegten Schnittes von 2-3 mm sternotomiert. Im Mediastinum muss der Thymus frei präpariert und in zwei Hälften geteilt werden. Nun folgt die Präparation des Aortenbogens zwischen den Abgängen der A. brachiocephalica und der linken A. carotis. Ein Aortenclip wird mittels einer 32 Gauge (0,2 mm Durchmesser) Nadel auf eben diesen Durchmesser eingestellt und anschließend auf die Aorta appliziert. Eine deutlich stärker pulsierende A. carotis destra liefert die Bestätigung für eine erfolgreiche Konstriktion. Die Wunde der Sternotomie wird genäht und die Mäuse erwachen auf einer Wärmematte wieder aus der Narkose. Als Kontrollgruppe dienen Mäuse mit dem gleichen genetischen Hintergrund (kardiomyozytenspezi-

fische SIRT5<sup>(-/-)</sup>-Mäuse und SIRT5<sup>(+/+)</sup>-Mäuse), die lediglich einer Scheinoperation unterzogen werden (Schein-Gruppe). Auch hier werden die Mäuse narkotisiert, sternotomiert und die Aorta wird an beschriebener Stelle frei präpariert. Ohne nun aber den Clip zu applizieren, wird der Thorax wieder verschlossen, die Haut genäht und die Narkose ausgeleitet.

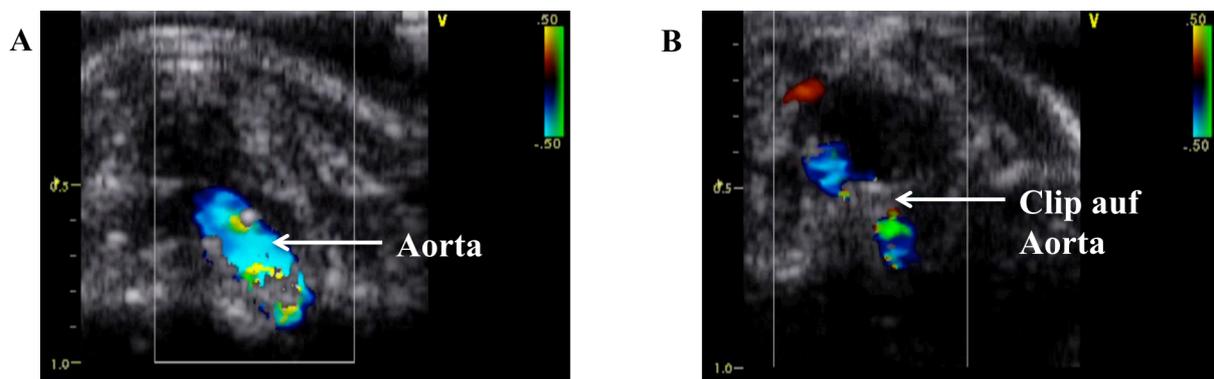


**Abbildung 8:** Situs der Maus vor und nach transverser Aortenkonstriktion. **A** und **B** Schematische Darstellung des Situs vor und nach TAC. **C** und **D** Situs *in vivo* vor und nach Applikation des Clips proximal des Abganges des Truncus Brachiocephalicus.

### 4.2.3 Transthorakale Echokardiographie

Zur Quantifizierung der vorliegenden kardialen Druckbelastung wurde bei den operierten Tieren eine transthorakale Echokardiographie (TTE) durchgeführt. Nach einer Nullpunkt-messung vor der TAC-Operation im Alter von acht Wochen erfolgte die Untersuchung in zweiwöchentlichem Abstand. Hierbei wurde ein Vivid 7 Dimension (GE, Healthcare, München, Deutschland) Echokardiographiergerät mit einem il3L Transducer (14 MHz) verwendet. Insgesamt wurde die kardiale Funktion über 12 Wochen mittels TTE beobachtet. Die Tiere werden 50 Sekunden lang mit 3%igem Isofluran betäubt. Während der restlichen Untersuchung wird die Narkose mit 1,5%igem Isofluran über eine Atemmaske konstant aufrecht-

erhalten. Die Maus liegt in Rückenlage auf einer Wärmematte, zum Schutz gegen Austrocknung wird eine Augensalbe aufgetragen. Um ein störungsfreies Sonographiebild zu ermöglichen, wird die Haut über dem Herzen der Maus mit Enthaarungscreme rasiert und ein erbsengroßer Klecks Ultraschallgel aufgetragen. In diesem Fall ist die Ultraschallsonde fixiert und kann ohne starke Beeinträchtigung des Untersuchungswinkels in ihrer Höhe verstellt werden. Die Untersuchung beginnt sieben Minuten nach Narkoseeinleitung im B-Mode mit der Einstellung der beiden Aa. Carotis Communis. Fortlaufend wird nun der Mauskörper, auf der Wärmematte fixiert, nach kaudal geschoben. Nacheinander werden die Aorta und der Aortenbogen parasternal in der Querachsebene eingestellt. Durch das Hinzuziehen des Farbdopplers kann der Sitz des Aortenclips kontrolliert werden. Die Verengung des Gefäßdurchmessers sorgt dafür, dass aus der linearen Strömung vor dem Clip eine turbulente Strömung wird, die mittels Farbdoppler detektierbar ist.

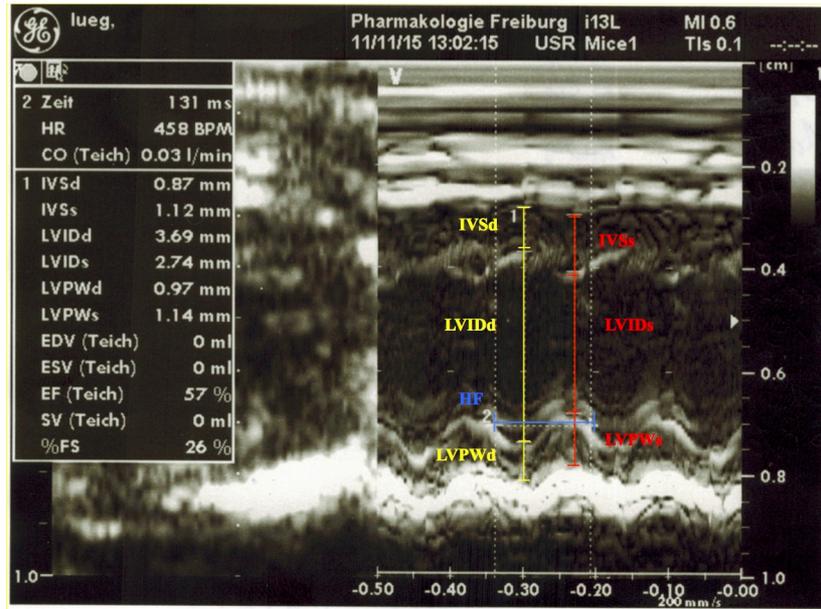


**99:** Exemplarische Darstellung des Aortenbogens der Maus mittels transthorakaler Echokardiographie. **A** nach Schein-Operation, **B** nach TAC-Operation.

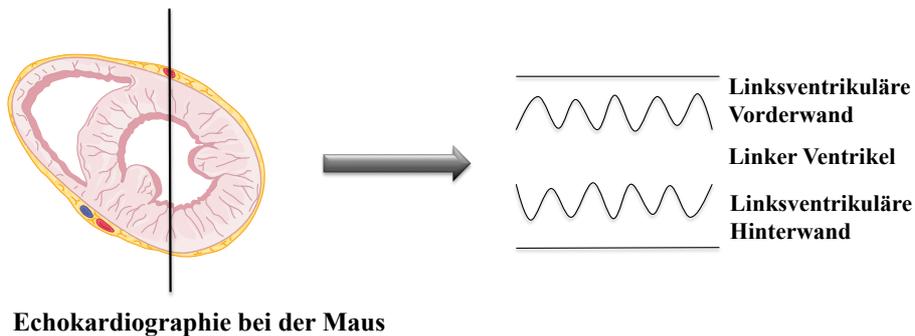
Zuletzt wird die Einstellung des linken Ventrikels in der links-parasternalen Querachsebene medioventrikulär optimiert, so dass beide Papillarmuskeln im Bild sichtbar sind. Das Gerät wird in den M-Mode umgestellt und im fixierten Bild wird der linke Ventrikel in Diastole und Systole ausgemessen. Weiterhin werden die Ejektionsfraktion (EF) und das *Fractional Shortening* (FS), sowie die Herzfrequenz bestimmt. Die Messung wird dreimal wiederholt.

**Tabelle 10: Parameter, die während einer Echokardiographie dreifach gemessen werden.**

Parameter	Bedeutung	Einheit
EF	Ejektionsfraktion: Prozentualer Anteil des im Herzen befindlichen Blutes, das pro Herzschlag durch die Aorta ausgeworfen wird.	[%]
FS	<i>Fractional Shortening</i> : Verkürzungsfraction, Prozentanteil des Volumenverlusts im linken Ventrikel im Übergang von Diastole in Systole, Berechnung: $[(LVIDd - LVIDs) : LVIDd]$ .	[%]
IVSd	<i>InterVentricular Septum diastolic</i> : Beim Menschen entspricht dieser Wert dem Ausmaß des interventrikulären Septums in der Diastole. Aufgrund vom leicht veränderten Aufbau der Echokardiographie bei der Maus entspricht dieser Messwert im Mäuseherzen dem Ausmaß der Vorderwand des linken Ventrikels in der Diastole (s. Abbildung 11, S. 39).	[mm]
IVSs	<i>InterVentricular Septum systolic</i> : Ausmaß der Vorderwand des linken Ventrikels in der Systole. (s.o. IVSd).	[mm]
LVIDd	<i>Left Ventricle Inner Diameter diastolic</i> : Durchmesser des linken Ventrikels in der Diastole.	[mm]
LVIDs	<i>Left Ventricle Inner Diameter systolic</i> : Durchmesser des linken Ventrikels in der Systole.	[mm]
LVPWd	<i>Left Ventricular Posterior Wall diastolic</i> : Ausmaß der Hinterwand des linken Ventrikels in der Diastole.	[mm]
LVPWs	<i>Left Ventricular Posterior Wall systolic</i> : Ausmaß der Hinterwand des linken Ventrikels in der Systole.	[mm]
HF	Herzfrequenz	[Schläge/min]



**Abbildung 10:** Beispielhafte Darstellung der Parameter, die während einer Echokardiographie dreifach gemessen werden.

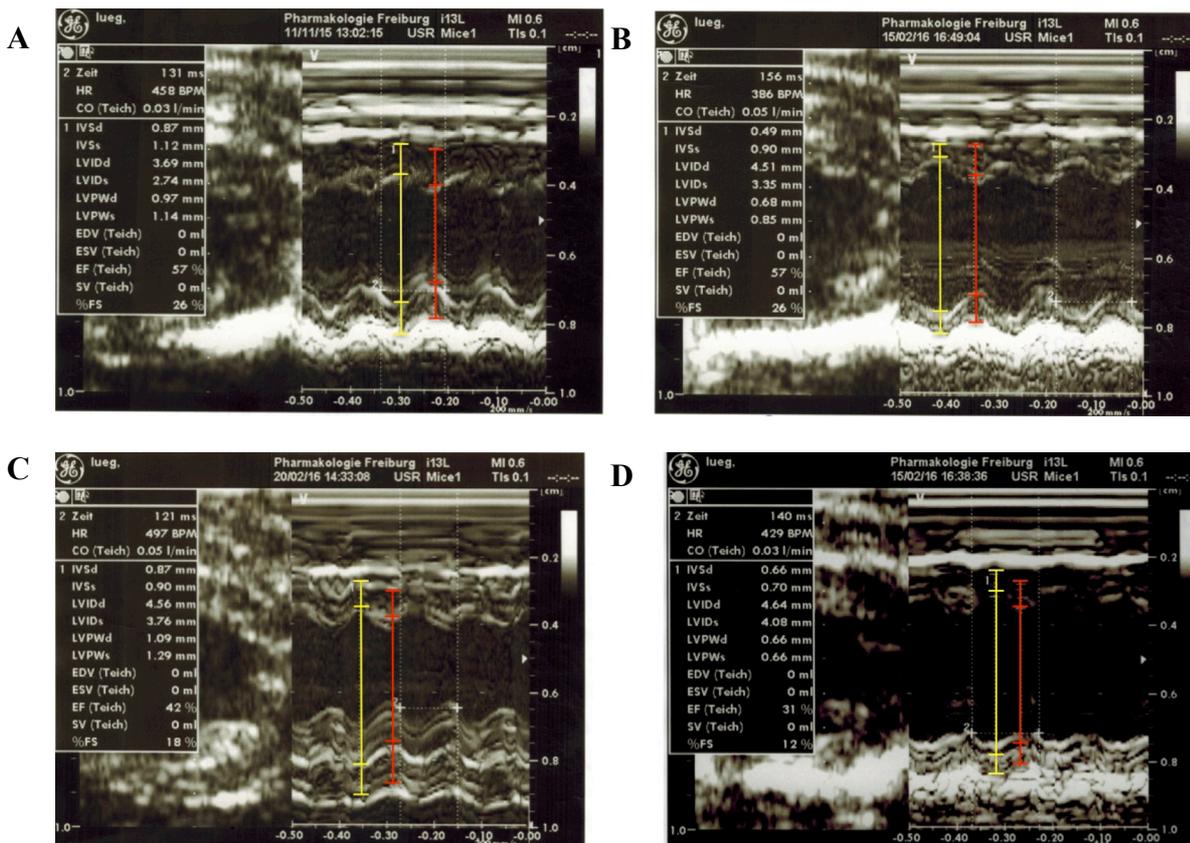


**Abbildung 11:** Schematische Darstellung der Echokardiographie bei der Maus. Das Herz wird in der links-parasternalen Querachsebene eingestellt (links), die in Abbildung 10 eingezeichneten Parameter werden im M-Mode ausgemessen (rechts).

Aus oben genannten Parametern kann im Anschluss an die Messung das Enddiastolische und Endsystolische Volumen, das Schlagvolumen und das Herzzeitvolumen berechnet werden (Gao et al. 2011). Nach Beendigung der dritten Messung wird die Atemmaske wieder entfernt und die Narkose somit ausgeleitet. Nach Bestimmung des Körpergewichts kann die Maus wieder zurück in den Käfig gesetzt werden.

**Tabelle 11: Parameter, die nachträglich aus den per Echokardiographie ermittelten Parametern errechnet wurden.**

Parameter	Bedeutung	Berechnung	Einheit
EDV	Enddiastolisches Volumen.	$LVIDd^3$	[ $\mu$ l]
ESV	Endsystolisches Volumen.	$LVIDs^3$	[ $\mu$ l]
SV	Schlagvolumen.	EDV-ESV	[ $\mu$ l]
HZV	Herzzeitvolumen.	HF * SV	[ml/min]
h/r	Indikator einer dilatativen oder konzentrischen Kardiomyopathie.	$(IVSd+LVPWd)/LVIDd$	-



**Abbildung 12:** Repräsentative Übersicht der Ergebnisse der transthorakalen Echokardiographie der Maus. **A** SIRT5<sup>(+/+)</sup>-Schein operiert 10 Wochen nach Schein-OP, **B** SIRT5<sup>(-/-)</sup>-Schein operiert 8 Wochen nach Schein-OP, **C** SIRT5<sup>(+/+)</sup>-TAC operiert 10 Wochen nach TAC-OP, **D** SIRT5<sup>(-/-)</sup>-TAC operiert 8 Wochen nach TAC-OP. Diastolische Messwerte gelb dargestellt, systolische Messwerte rot dargestellt. Auf die Angabe der einzelnen Messwerte und der Herzfrequenz wurde aus Übersichtsgründen verzichtet.

#### **4.2.4 Euthanasie**

12 Wochen nach dem jeweiligen Eingriff wird den TAC- und Schein-operierten Mäusen 0,3 mg/kg KG Thiopental intraperitoneal gespritzt, der Thorax eröffnet und das Herz entnommen. Zur angemessenen Interpretation der Ergebnisse wird in dieser Arbeit das Verhältnis von Herzgewicht und Tibialänge zum Körpergewicht der Maus herangezogen. Hierfür wird vor jeder Herzentnahme zunächst die Maus und im Anschluss das Herz gewogen. Zur Bestimmung der Tibialänge wird eines der beiden Beine der Maus am Oberschenkel abgetrennt, im Anschluss daran wird die Tibia frei präpariert und gemessen.

#### **4.2.5 Histologie**

##### **Organeinbettung und Probengenerierung**

Die Herzen werden in situ mit 3 ml 100%iger NaCl-Lösung über die V. cava inferior gespült und im Anschluss entnommen. Vor der Einbettung wird das Organ erneut in NaCl-Lösung gespült und kurz getrocknet. Die Herzen werden in Tissue Tac eingebettet und in Methylbutan, das mit Flüssigstickstoff gekühlt wird, gefroren. Im Konservierungsmedium Tissue Tac tiefgefroren kann das Herz bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt werden. Mittels Cryotom wird das eingebettete Herz von apikal in 14µm breite Schnitte geschnitten und auf elektrostatisch vorbehandelten Objektträgern bis zur endgültigen Färbung bei -20°C gelagert.

##### **Masson-Trichrome-Färbung**

Ein wichtiger Faktor zur Klassifizierung der Herzinsuffizienz ist der Fibrosegrad, der sich mithilfe der Masson-Trichrome-Färbung bestimmen lässt. Verwendet wurde der Accustain Trichrome Stain Kit (Sigma) nach den Angaben des Herstellers. Die Objektträger mit jeweils vier Schnitten eines Herzens werden zunächst für eine Stunde unter einem Abzug in 4%-igem Paraformaldehyd fixiert. Im Anschluss inkubieren die Schnitte über Nacht bei Raumtemperatur in der Bouin-Lösung. Alle weiteren Schritte werden ebenfalls bei Raumtemperatur durchgeführt. Zu Beginn der Färbung waschen die Schnitte ein bis zwei Minuten unter fließendem Leitungswasser und werden anschließend kurz in ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Für fünf Minuten inkubieren die Schnitte in der Weigerts-Eisen-Hämatoxylin-Lösung und werden im Anschluss zehn Minuten lang unter warmem, fließendem Leitungswasser gewaschen. Die Weigerts-

Eisen-Hämatoxylin-Lösung hat eine Schwarzfärbung der Kerne zur Folge. Nach einem weiteren einminütigen Waschschrift in  $\text{ddH}_2\text{O}$  werden die Herzen für fünf Minuten in der Bieberich-Scharlachrot-Säurefuchsin-Lösung gefärbt. Dies hat zur Folge, dass die Muskelfasern rot angefärbt werden. Hiernach werden die Schnitte dreimal für jeweils eine Minute in  $\text{ddH}_2\text{O}$  gewaschen und anschließend für zehn Minuten in Phosphorwolfram/Phosphormolybdän-säure-Arbeitslösung gefärbt. Im Anschluss inkubieren die Objektträger fünf Minuten lang in der Anilinblau-Lösung und werden erneut dreimal jeweils eine Minute lang in  $\text{ddH}_2\text{O}$  gewaschen. Aus dieser Färbung resultiert die Blaufärbung der Kollagenfasern. Als letzter Waschschrift schließt sich eine zweiminütige Inkubation in 1%-iger Essigsäure und ein zweimaliges Waschen in  $\text{ddH}_2\text{O}$  an. Zuletzt werden die Schnitte kurz abgetropft und mittels einer Alkoholreihe fixiert.

**Tabelle 12: Alkoholreihe.**

<b>Lösung</b>	<b>Inkubationszeit</b>
70% EtOH	60 Sekunden
90% EtOH	30 Sekunden
100% EtOH	30 Sekunden
Xylol-Substitute	30 Sekunden

Zuletzt werden die Schnitte mit Permount eingedeckt und können getrocknet bei Raumtemperatur gelagert werden. Die quantitative Auswertung erfolgt anhand von lichtmikroskopischen Bildern. Fotografiert werden pro Schnitt vier zufällig ausgewählte Bereiche die in 20-facher Vergrößerung abgelichtet werden. Da sich auf jedem Objektträger vier zufällig ausgewählte Schnitte befinden, werden also insgesamt 16 Bilder pro Objektträger gemacht. Im Programm ImageJ erfolgt dann die Bestimmung des prozentualen Fibroseanteils an der Gesamtfläche in jedem Schnitt.

### **Wheat-Germ-Agglutinin-Färbung**

Die Wheat-Germ-Agglutinin-Färbung (WGA-Färbung) ermöglicht es, die Zellgrenzen der Kardiomyozyten anzufärben und wurde zur genaueren Bestimmung der Kardiomyozytengröße als Ergänzung zur Masson-Trichrome-Färbung durchgeführt. Auch hier wurden  $14\mu\text{m}$

dicke Schnitte verwendet, die Schnitte werden großzügig mit einem Fettstift umrahmt und die Objektträger zunächst 15 Minuten lang in 4%-igem Paraformaldehyd unter einem Abzug fixiert. Das WGA wird in einer Konzentration von 1mg/ml in PBS gelöst, für die Färbung im Verhältnis 1:100 verdünnt und ansonsten bei -20°C gelagert. Die Schnitte werden im Anschluss an die Fixierung dreimal jeweils drei Minuten lang in PBS gewaschen und inkubieren anschließend eine Stunde lang im Dunkeln mit 800 µl WGA-Lösung pro Objektträger (10 µg/ml). Die Objektträger werden dann erneut dreimal jeweils drei Minuten lang in PBS gewaschen und anschließend mit einem Tropfen Dakos Fluorescent Mounting Medium eingedeckt. Bis zur Analyse unter dem Fluoreszenz-Mikroskop können die Schnitte bei 4°C im Dunkeln gelagert werden. Mittels Fluoreszenzmikroskopie (Wellenlänge: 488 nm) werden drei zufällig gewählte Schnitte pro Herz in 40-facher Vergrößerung fotografiert. Mit Hilfe des Programms Axio Vision Rel 4.6 wird in drei zufällig gewählten Bereichen pro Schnitt, die Größe von 30 Kardiomyozyten bestimmt.

#### **4.2.6 Mitochondrienisolation**

Zur vergleichenden Bestimmung der Mitochondrienfunktion wurden Mitochondrien aus den TAC- und Schein-operierten Herzen der SIRT5<sup>(-/-)</sup>-Mäuse und SIRT5<sup>(+/+)</sup>-Mäuse isoliert. Insgesamt können zwei Herzen gleichzeitig verarbeitet werden. Die Mäuse erhalten zu Beginn eine intraperitoneale Injektion von 300 µl Thiopental, werden gewogen und thorakotomiert. Das Herz wird frei präpariert und sofort in STE1-Puffer auf Eis gekühlt gelagert. Alle weiteren Schritte finden ebenfalls auf Eis gekühlt statt. Nach mehrmaligem Spülen in STE1-Puffer werden die Vorhöfe und mögliche Lungenreste entfernt und das Herz gewogen. In 3 ml STE1-Puffer werden die Herzen in zwei Schritten, zunächst grob, dann sehr fein zerkleinert. Anschließend inkubieren die Herzfragmente vier Minuten lang in Protease-haltigem STE2-Puffer, was die Aufspaltung der Proteine in Zellmembran und Gewebe bewirkt. Nach Hinzufügen von 2,5 ml STE1-Puffer werden die Herzfragmente mit einem Stabhomogenisator 60-90 Sekunden lang homogenisiert. Anschließend wird das Gemisch für 10 Minuten bei 4°C und 8000 g zentrifugiert. Der entstandene Überstand wird abpipettiert und verworfen, das Pellet nach Resuspension in weiteren 4 ml STE1-Puffer für 10 Minuten bei 4°C und 700 g zentrifugiert. Im nächsten Schritt wird der Überstand, in welchem sich nun die Mitochondrien befinden, in ein neues Zentrifugationsröhrchen pipettiert, während das Pellet verworfen wird. Nun wird der erste Zentrifugationsschritt noch zweimal, mit einem zwischengeschalte-

ten Waschschrift, wiederholt. Das entstandene Pellet wird jeweils wieder in STE1-Puffer resuspendiert. Zuletzt wird das Pellet in 100-120 µl STE1-Puffer vorsichtig resuspendiert. Die Mitochondrien können anschließend direkt zur Messung der mitochondrialen respiratorischen Kapazität, zur Generierung von ATP-Proben oder für Western Blots genutzt werden. Andernfalls werden sie bei -20°C bis zur endgültigen Verwendung gelagert.

**Tabelle 13: STE1-Puffer (pH: 7,4).**

---

Saccharose	250 mM
Tris/HCl	5 mM
EGTA	2 mM

---

**Tabelle 14: STE2-Puffer (pH: 7,4).**

---

Saccharose	250 mM
Tris/HCl	5 mM
EGTA	2 mM
BSA	0,5% (w/v)
MgCl	5 mM
ATP	1 mM
Protease	2,5 U/ml

---

### **Proteinbestimmung (BCA-Reaktion)**

Die Bestimmung der Mitochondrienkonzentration erfolgt mit Hilfe des Micro BCA Kits (Pierce, Rockford, IL, USA). In diesem Kit macht man sich die Reaktion von zweiwertigen Kupferionen mit den Proteinen zunutze, bei der einwertige Kupferionen entstehen. Durch die Komplexbildung aus Bicinchoninsäure (BCA) und diesen einwertigen Kupferionen kommt es zu einem violetten Farbumschlag, der bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch gemessen werden kann. Anhand von einer Standardkurve mit 0-2,5 mg/ml BSA kann die vorliegende Konzentration bestimmt werden. Jeweils 10 µl einer 1:10-Verdünnung der zu untersuchenden Probe und den Proben der Standardkurve inkubieren mit 190 µl des BCA Mix in einer 96-Well Platte für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Die Absorption wird in einem ELISA-Reader gemessen.

## 4.2.7 Mitochondriale respiratorische Kapazität

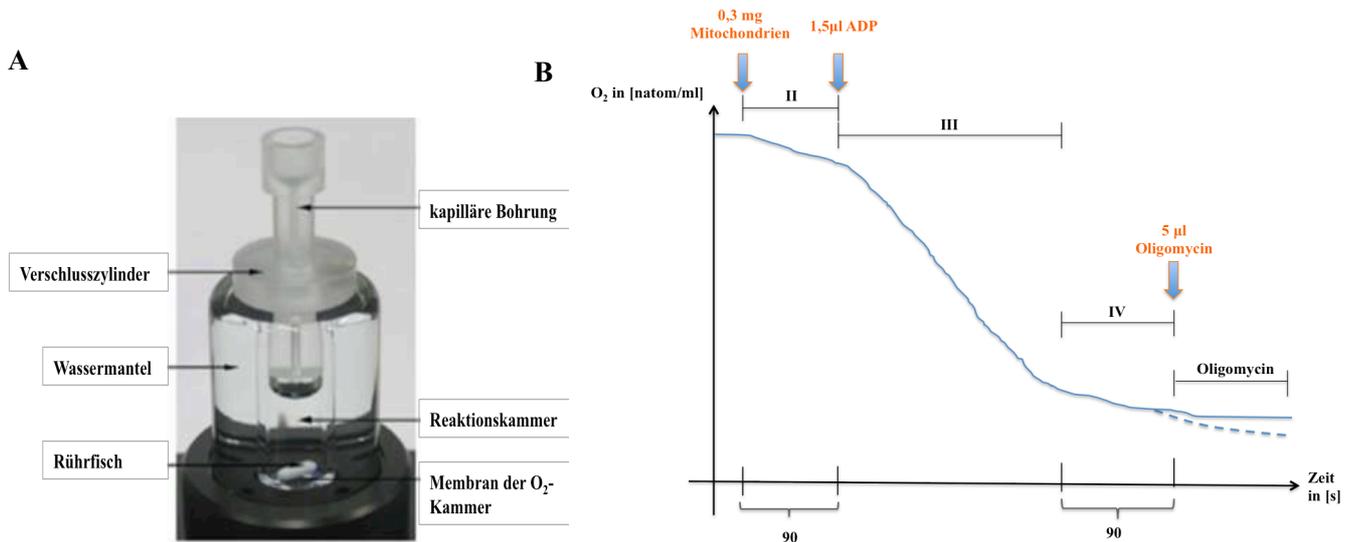
Die mitochondriale respiratorische Kapazität wird in frisch isolierten Mitochondrien bei 25°C im Messverfahren nach Clark et al. mit der Clark-Elektrode bestimmt (Clark et al. 1953). Die Reaktionskammer besteht aus einer 0,5 ml fassenden, doppelwandigen Glaskammer. Eine O<sub>2</sub>- durchlässige Ethylen-Propylen-Membran verbindet diese Kammer mit einer Elektrode, die aus einem Platin- und einem Silberdraht besteht. Die Drähte bilden Kathode und Anode der Elektrode und stehen über eine Elektrolytlösung in Verbindung. Sauerstoffmoleküle diffundieren aus der Reaktionskammer durch die Membran und werden an der Kathode reduziert. Dies führt zu einem Stromfluss, der zur, in der Reaktionskammer vorliegenden, Sauerstoffkonzentration proportional ist. Die Auswertung der Messung, also die Umrechnung der Stromstärke in Nanomol O<sub>2</sub>-Atome/min erfolgt mit der dazugehörigen Software (928, Software, Strathkelvin Instruments) und wird auf die Menge eingesetzter Mitochondrien bezogen [nmol/min/mg]. Die Mitochondrien durchlaufen während der Messung vier verschiedene Phasen (sog. *Respiratory States*) mit unterschiedlicher respiratorischer Aktivität. Die Messung des Sauerstoffgehalts entspricht dem Verfahren nach Clark et al. (Clark et al. 1953). Im *State I* wird die Abnahme der Sauerstoffkonzentration aufgezeichnet, die durch den Verbrauch von ausschließlich endogenen Substraten durch die Mitochondrien entsteht. Im *State II* nimmt der Sauerstoffverbrauch durch die Zugabe eines Substrates (Glutamat oder Palmitoylcarnitin) deutlich zu. Nach *State II* erfolgt eine Zugabe von ADP, was zur maximalen Stimulation des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs und der ATP-Produktion führt. Diese Atmungsrate wird in *State III* gemessen. In *State IV* ist schließlich das gesamte zugegebene ADP zu ATP phosphoryliert und hemmt so den O<sub>2</sub>-Verbrauch. Die noch zu messende Abnahme der Sauerstoffkonzentration beruht auf der physiologischen, mitochondrialen Entkopplung. Durch eine einmalige Zugabe von Oligomycin, welches die ATP-Synthase (Komplex V) hemmt, kann abschließend noch getestet werden, ob eine über den *State IV* hinausgehende Entkopplung der Mitochondrien vorliegt.

**Tabelle 15: Assay-Puffer (pH: 7,4).**

---

KCl	120 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 mM
EGTA	1 mM
BSA	1 mg/ml

HEPES	3 mM
Glutamat/Malat	5 mM/2 mM
oder	
Palmitoylcarnitin /Malat	20 $\mu$ M/5 mM



**Abbildung 13:** Beispielhafte Darstellung der Messung der mitochondrialen respiratorischen Kapazität. **A** Sauerstoffkammer mit Verschlusszylinder. **B** Schematische Darstellung des Verlaufs einer Sauerstoffkurve; da die Mitochondrien direkt in den Substratpuffer pipettiert werden, wird *State I* nicht bestimmt.

Die Elektrode wird zunächst mit 500  $\mu$ l Assay-Puffer, in dem eines der beiden Substrate gelöst ist, kalibriert. Hierfür und für die nachfolgenden Messungen kann die Reaktionskammer mit einem passgenauen Zylinder auf ein bestimmtes Volumen festgelegt und verschlossen werden. Nach Zugabe von 0,3 mg isolierten Mitochondrien wird die *State-II*-Atmung für 90 Sekunden gemessen. Durch eine kapilläre Bohrung im Zylinder der Messkammer können 1,5  $\mu$ l ADP zugegeben werden, ohne dass die Messkammer geöffnet werden muss. Die Atmungsrate in *State III* wird aufgezeichnet, die ständige Durchmischung der Substrate wird durch einen Rührmagneten in der Messkammer gewährleistet. Sobald aus der Messung erkennbar ist, dass das zugegebene ADP verbraucht ist, schließt sich die *State-IV*-Atmung für 90 Sekunden an. Nach *State IV* werden einmalig 5  $\mu$ l Oligomycin über die kapilläre Bohrung hinzugegeben. Flacht die Messkurve ab, wird also kein Sauerstoff mehr verbraucht, so findet keine zusätzliche Entkopplung im Mitochondrium statt. Folgt die Kurve weiterhin dem Verlauf in *State IV*, nimmt die Sauerstoffkonzentration also weiter ab, liegt eine zusätzliche Entkopplung am Mitochondrium vor (s. Abb.12 Verlauf der unterbrochenen blauen Linie). Die

Messung erfolgt jeweils zweimal mit dem metabolischen Substrat Glutamat/Malat und Palmitoylcarnitin/Malat.

#### 4.2.8 ATP-Synthese

Im Anschluss an die Messung der mitochondrialen respiratorischen Kapazität können im gleichen Ansatz Proben zur Bestimmung der ATP-Syntheserate gewonnen werden. Hierfür wird der Assay-Puffer mit 0,2 mg isolierten Mitochondrien in der Messkammer auf ein Volumen von 0,5 ml aufgefüllt. Im Anschluss werden 1,5 µl ADP hinzugegeben. Nun erfolgt alle 10 Sekunden im Gesamtzeitraum von einer Minute die Entnahme von 10 µl aus der Reaktionskammer. Diese werden auf 190 µl gefrorenes DMSO pipettiert und sofort bei -20°C tiefgefroren. Auch hier wurden jeweils Proben im Ansatz mit Glutamat/Malat und Palmitoylcarnitin/Malat generiert. Die Auswertungen der ATP-Synthese wurden von Frau Katharina Pfeil, Abteilung Kardiologie & Angiologie I, Universitäts-Herzzentrum Freiburg-Bad Krozingen, durchgeführt. Hierfür wird das ENLITEN®rLuciferase/Luciferin Kit der Firma Promega verwendet. Das Enzym Luciferase setzt mittels der Aussendung von Lichtquanten, ATP-abhängig Luciferin zu Oxyluciferin um. Mit einer ATP-Standardkurve lässt sich der ATP-Gehalt in der jeweiligen Probe bestimmen. Bezogen auf die bei der Probengenerierung eingesetzte Mitochondrienmenge kann so die ATP-Syntheserate bestimmt werden. Das ATP/O-Verhältnis gibt wiederum das Verhältnis von Sauerstoffverbrauch (Atmung im *State III*) und ATP-Syntheserate an. Die im Verhältnis 1:20 in DMSO verdünnte Probe, wird mit Tris-Acetat-Puffer weiterverdünnt. Wurden die Proben mit dem Substrat Palmitoylcarnitin generiert, werden sie im Verhältnis 1:40 verdünnt. Bei den Proben mit Glutamat wird eine 1:20 Verdünnung angewandt.

**Tabelle 16: Tris-Acetat Puffer (pH = 7,75).**

---

ddH<sub>2</sub>O

Tris-Acetat 100 mM

EDTA 2,5 mM

---

10 µl der jeweiligen Probe werden mit 100 µl Tris-Acetat Puffer in eine weiße Mikrotiterplatte gegeben. Für die Messung werden 25 µl „ENLITEN-ATP-Assay“-Puffer hinzugegeben.

Die Messung der entstehenden Lumineszenz erfolgt mit einem GLOMAX 96 Microplate Luminometer.

## 4.2.9 SDS-PAGE und Western Blot

### Herstellung von Ganzherzhomogenaten

Für die Herstellung von Ganzherzhomogenaten werden die Proben in 500 µl Homogenisierungs-Puffer für ungefähr 30 Sekunden auf Eis mit dem Homogenizer zerkleinert und inkubieren dann 20 bis 30 Minuten weiter auf Eis.

**Tabelle 17: Homogenisierungs-Puffer.**

---

$d_4H_2O$	
HEPES	50 mM
NaCl	150 mM
Glycerol	10%
Triton X-100	1%
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
EGTA	1 mM
Natriumfluorid	100 mM

---

Es folgen eine neunminütige Inkubation im Ultraschallbad, sowie weitere fünf Minuten auf Eis. Anschließend werden die Proben für 30 Minuten bei 16.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird zu 20 µl aliquotiert und die Proteinmenge wird mittels der BCA-Reaktion (s. 3.2.6) bestimmt.

### SDS-Page

Für die Auftrennung der Proteine in einer SDS-Page (*Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) werden die isolierten Mitochondrien oder Ganzherzhomogenatsproben je nach Proteinkonzentration mit Wasser auf ein Endvolumen von 10 µl aufgefüllt. 10 µl Ladepuffer werden hinzugegeben und die Proteine werden anschließend für 10 Minuten bei 95 °C denaturiert.

**Tabelle 18: Ladepuffer.**

---

Tris-Hcl (0,5M; pH 6,8)	62,5 mM
Glycerol	10%
SDS	2%
Bromphenolblau	Spatelspitze
β- Mercaptoethanol	5%

---

Zur elektrophoretischen Auftrennung der denaturierten Proteine wird zunächst ein 8 bis 12%-iges Polyacrylamid-Trenngel gegossen und mit 2 ml Isopropanol überschichtet. Das Isopropanol wird nach der Auspolymerisierung des Gels wieder abgegossen und ein 4%-iges Sammelgel wird darüber gegossen.

**Tabelle 19: Trenngel.**

---

Acrylamid	8%/10%/12%
Tris-Base (1,5 M; pH 6,8)	375 mM
SDS	0,01%
APS	0,0075 %
TEMED	0,15 %

---

**Tabelle 20: Sammelgel.**

---

Acrylamid	5%
Tris-Base (0,5 M; pH 6,8)	125 mM
SDS 10%	0,1%
APS 10%	0,1%
TEMED	0,2%

---

Das Gel wird mit dem Probevolumen von 20 µl beladen, weiterhin wird ein Proteinstandard im Volumen von 2,5 µl aufgetragen. Nach Anlegung einer Spannung von 100-120 V werden die Proben in SDS-Laufpuffer bei 4°C über eine Stunde elektrophoretisch aufgetrennt.

### **Transfer**

Der Transfer erfolgt über eine Stunde bei 100 V und 4°C auf eine PVDF-Membran, die zuvor

bis zu eine Minute lang in Methanol aktiviert wird. Es folgt ein Waschschrift mit PBS-Tween/TBS-Tween (0,1%), sowie eine einstündige Inkubation in 5%igem Milchpulver. So soll eine anschließende unspezifische Antikörperbindung verhindert werden. Nach einem weiteren Waschschrift in PBS-Tween/TBS-Tween inkubiert die Membran über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper, der in 5% BSA in PBS-Tween bzw. TBS-Tween gelöst ist. Nach drei weiteren Waschschriften mit PBS-Tween/TBS-Tween folgt die Inkubation mit dem sekundären Antikörper in 5% BSA in TBS-Tween für eine Stunde bei Raumtemperatur. Abschließend wird die Membran noch einmal für 5 Minuten in PBS-Tween/TBS-Tween gewaschen und kann entweder sofort ausgewertet oder in PBS bei 4°C gelagert werden. Es erfolgt eine Coomassie Blue R-250-Färbung zur Ladekontrolle. Das Fluoreszenzsignal wird mit dem Bio Rad Imaging System quantifiziert. Bei allen verwendeten Antikörpern handelt es sich um *Anti-Rabbit*-Antikörper.

**Tabelle 21: Verdünnungen der verwendeten Antikörper.**

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>
Alexa Fluor® IgG 647 (Secondary) Rabbit	1:10.000
HNE-Michael Adducts Ab	1:1.000
Malonyllysine Antibody	1:1.000
SirT5 (D8C3) Rabbit mAb	1:1.000
Succinyllysine Antibody	1:1.000

#### **4.2.10 RNA-Isolation, cDNA-Synthese und quantitative *Real-Time-PCR***

##### **RNA-Isolation**

Um mittels *Real-Time-PCR* die Expression verschiedener Gene quantitativ untersuchen zu können, muss zunächst RNA isoliert werden. 10 mg der in flüssigem Stickstoff gelagerten, Herzen werden mit 500 µl Trizol für 40 bis 60 Sekunden homogenisiert und inkubieren dann für 5 Minuten auf Eis. Nach Zugabe von 200 µl CHCl<sub>3</sub> werden die Proben gevortext und inkubieren erneut 3 Minuten bei Raumtemperatur. Es folgt ein Zentrifugationsschritt für 15 Minuten bei 12.000 g und 4°C. Die wässrige Phase wird nach der Zentrifugation in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 200 µl EtOH werden die Proben erneut gevor-

text und schließlich in eine Säule aus dem RNeasy® Midi kit (Quiagen) pipettiert. Die Säule wird für 30 Sekunden bei 8.000 g und 4°C zentrifugiert. Nach erneuter Zugabe von 700 µl Puffer wird die Zentrifugation wiederholt. Im Anschluss wird die Säule zwei Mal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen und jeweils für 2 Minuten bei 8.000 g und 4°C zentrifugiert. In einem neuen Reaktionsgefäß wird die Säule nun zwei Mal mit 30 µl RNase-freiem Wasser gespült und für 1 Minute bei 8.000 g und 4°C zentrifugiert. Das Eluat kann bei -80°C gelagert werden. Die vorliegende Konzentration an RNA wird mit dem Spectrophotometer NanoDrop ND-1000 anhand des Verhältnisses der Absorption bei 260/280 nm gemessen.

### **cDNA-Synthese**

Für die cDNA-Synthese müssen 1,5 µg RNA in einem Gesamtvolumen von 8,5 µl RNase freiem Wasser verdünnt werden. Nach Zugabe von 0,75 µl oligo (dT)- Nukleotiden findet die Hybridisierung für 10 Minuten bei 70°C statt. Hiernach werden 5,75 µl Master Mix zugegeben und während einer 90-minütigen Inkubation bei 50°C findet die Synthese der cDNA statt. Die Reaktion wird durch ein erneutes Erhitzen auf 70°C für 15 Minuten beendet. Nach Zugabe von weiteren 35 µl RNase freiem Wasser kann die synthetisierte cDNA bei -80°C gelagert werden. Die Bestimmung der Konzentration erfolgt mittels Spektrophotometrie (NanoDrop ND-1000) bei 260 nm. Weiterhin wird das Verhältnis cDNA zu Protein (260/280 nm) gemessen.

### **Tabelle 22: Mastermix.**

---

5x First Stand Buffer	3 µl
DTT 0,1 M	0,75 µl
dNTP 10 mM	0,75 µl
SuperScript III (200 U/µl)	1,25 µl

---

### **Quantitative Real-Time-PCR**

Die Quantifizierung der synthetisierten cDNA erfolgt mit dem iQ SYBR-Green Supermix (BioRad) als Sonde in einem CF X96 Real-Time PCR System (BioRad). Pro untersuchtem Gen werden die *Forward*- und *Reverse*-Primer im Verhältnis 1:80 verdünnt und bilden mit dem 2x konzentrierten SYBR-Green-Mix in einem Gesamtvolumen von 1188 µl bei 72 zu untersuchenden Genen den Mastermix. 8,5 µl der im Verhältnis 1:100 verdünnten cDNA werden mit jeweils 16,5 µl Mastermix in eine 96-Well-Platte pipettiert und mit ddH<sub>2</sub>O auf ein

Gesamtvolumen von 25 µl aufgefüllt. Innerhalb von zehn Minuten erfolgt bei 95°C die Aktivierung der Taq-Polymerase, nachfolgend denaturiert die cDNA in 15 Sekunden bei 95°C. Die Anlagerung der Primer erfolgt in 30 Sekunden bei 59°C und die Elongation in 45 Sekunden bei 72°C. Dieser Zyklus wird 40-mal wiederholt. Bei jeder RT-PCR laufen drei Negativkontrollen in Form von 25 µl H<sub>2</sub>O mit. Die Auswertung erfolgt anhand von einer Standardkurve mit standardisierten cDNA-Konzentrationen. Als Referenzgen wurde das Gen für 18sRNA (*18s ribosomal RNA, small ribosomal subunit component*) verwendet, das in allen vier Gruppen in gleicher Quantität exprimiert wurde.

#### **4.2.11 Statistik**

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit den Programmen Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, USA) oder Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, USA). Der zweiseitige T-Test für unabhängige Stichproben wurde für den Vergleich zweier Gruppen verwendet. Wurden alle vier Gruppen unter Berücksichtigung zweier Parameter verglichen, führten wir eine zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durch. Alle Abbildungen des Ergebnisteils zeigen die errechneten Mittelwerte ± Standardabweichung. Im Falle einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde ein Unterschied als signifikant gewertet und mit einem (\*) markiert.

## 5 Ergebnisse

Die Experimente dieser Arbeit zielen darauf ab, die Rolle von SIRT5 im Herzen zu untersuchen und zu charakterisieren, inwiefern es die kardiale Anpassungsfähigkeit an erhöhte Energieanforderungen beeinflusst. Hierfür wurden Mäuse mit oder ohne Deletion von SIRT5 einer chronischen Druckbelastung mittels TAC-OP oder einer Schein-OP ausgesetzt. Aus diesem experimentellen Design ergeben sich die folgenden vier Gruppen: Die SIRT5<sup>(+/+)</sup>-Gruppe, bei der die Schein-Operation durchgeführt wurde (SIRT5<sup>(+/+)</sup> Schein), die SIRT5<sup>(-/-)</sup>-Gruppe bei der ebenfalls die Schein-Operation durchgeführt wurde (SIRT5<sup>(-/-)</sup> Schein), die SIRT5<sup>(+/+)</sup>-Gruppe bei der die TAC-Operation durchgeführt wurde (SIRT5<sup>(+/+)</sup> TAC), sowie die SIRT5<sup>(-/-)</sup>-Gruppe, bei der ebenfalls die TAC-Operation durchgeführt wurde (SIRT5<sup>(-/-)</sup> TAC). In diesen Gruppen wurden die Herzfunktion, kardiale Umbauprozesse und Veränderungen im Herzstoffwechsel charakterisiert.

### 5.1 Nachweis des *Knockouts* von SIRT5 im Herzen

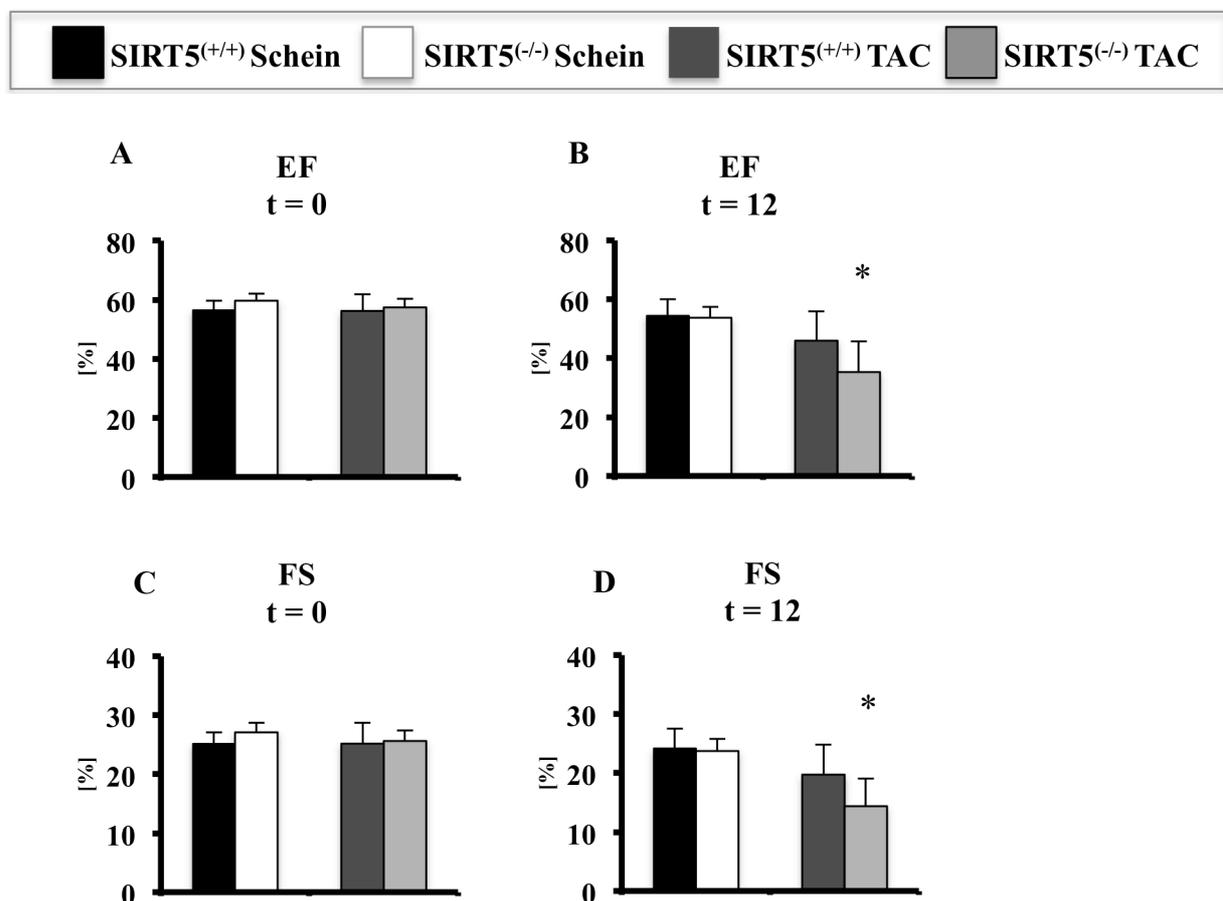
Um den kardialen SIRT5-*Knockout* nachzuweisen, wurde die Expression von SIRT5 in Homogenaten von Herz-, Leber- und Nierengewebe mittels Western-Blot untersucht (siehe Abbildung 14). Sowohl im Leber-, als auch im Nierengewebe konnte in den SIRT5<sup>(+/+)</sup>-, und den SIRT5<sup>(-/-)</sup>-Mäusen die Expression von SIRT5 nachgewiesen werden. Im Herzgewebe der SIRT5<sup>(-/-)</sup>-Mäuse wurde eine fehlende SIRT5-Expression nachgewiesen.



**Abbildung 14:** Kardialer *Knockout* von SIRT5. Western Blot: SIRT5-Expression in diversem Gewebe, SIRT5-Bande bei 30 kDa. 12 Wochen nach TAC oder Schein-OP, n=5-6 gepooltes Material.

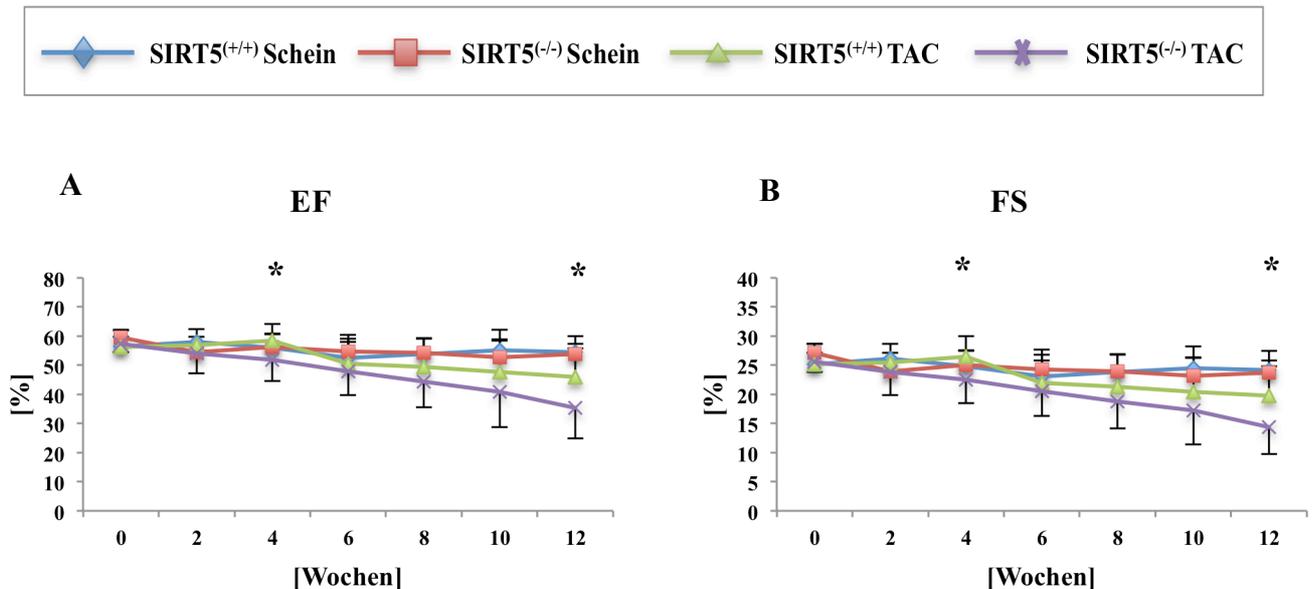
## 5.2 Kontraktile Herzfunktion *in vivo*

Die Untersuchung der kontraktile Herzfunktion *in vivo* wurde im Alter von 8 Wochen in allen vier Gruppen zur Festlegung des Nullpunktes vor TAC- oder Schein-OP durchgeführt (t=0). Die Messung erfolgte mittels transthorakaler Echokardiographie. Im Anschluss an die Operation wurden Verlaufsmessungen im Abstand von 14 Tagen über einen Gesamtzeitraum von 12 Wochen generiert. Aus Übersichtsgründen werden in den Abbildungen dieses Kapitels lediglich die signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen SIRT5<sup>(+/+)</sup> TAC und SIRT5<sup>(-/-)</sup> TAC angegeben.



**Abbildung 15:** Ejektionsfraktion und Verkürzungsfraktion *in vivo*. **A** Ejektionsfraktion (EF) zum Zeitpunkt vor TAC (t=0), **B** Ejektionsfraktion (EF) zum Zeitpunkt 12 Wochen nach TAC (t=12), **C** Verkürzungsfraktion (FS) zum Zeitpunkt vor TAC (t=0), **D** Verkürzungsfraktion (FS) zum Zeitpunkt 12 Wochen nach TAC (t=12). Gemessen mittels transthorakaler Echokardiographie; n=12-16 pro Gruppe; \*p<0,05 SIRT5<sup>(-/-)</sup> TAC vs. SIRT5<sup>(+/+)</sup> TAC.

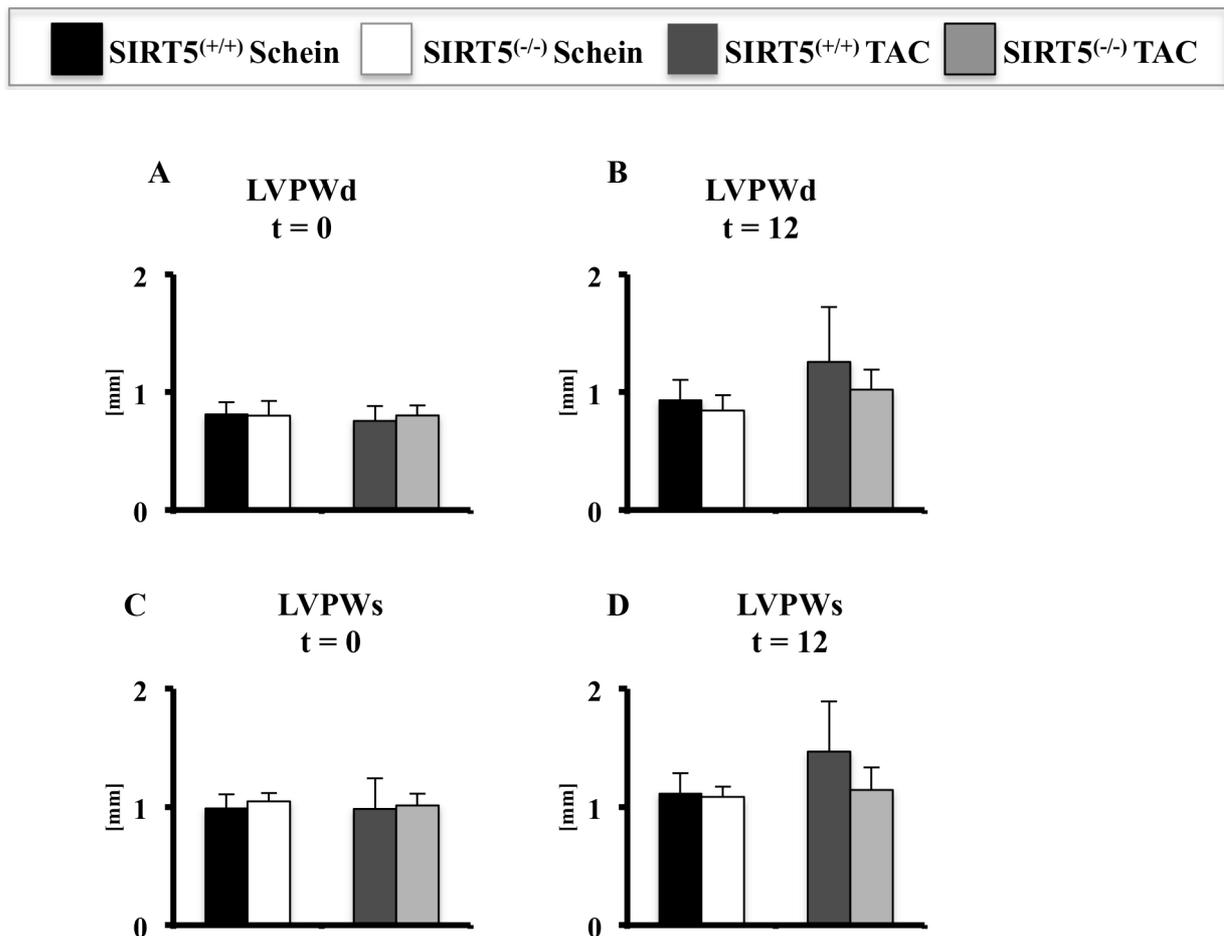
Wie in Abbildung 15 gezeigt, konnten im Alter von 8 Wochen ( $t=0$ ) keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Ejektionsfraktion und der Verkürzungsfraktion in den verschiedenen Gruppen gemessen werden. Zwischen den beiden Schein-operierten Gruppen zeigten sich auch nach 12 Wochen ( $t=12$ ) keine signifikanten Unterschiede. In der Gruppe der TAC-operierten  $SIRT5^{(-/-)}$ -Mäuse waren Ejektions- und Verkürzungsfraktion bei der letzten Messung ( $t=12$ ) jeweils signifikant niedriger als bei den TAC-operierten  $SIRT5^{(+/+)}$ -Mäuse.



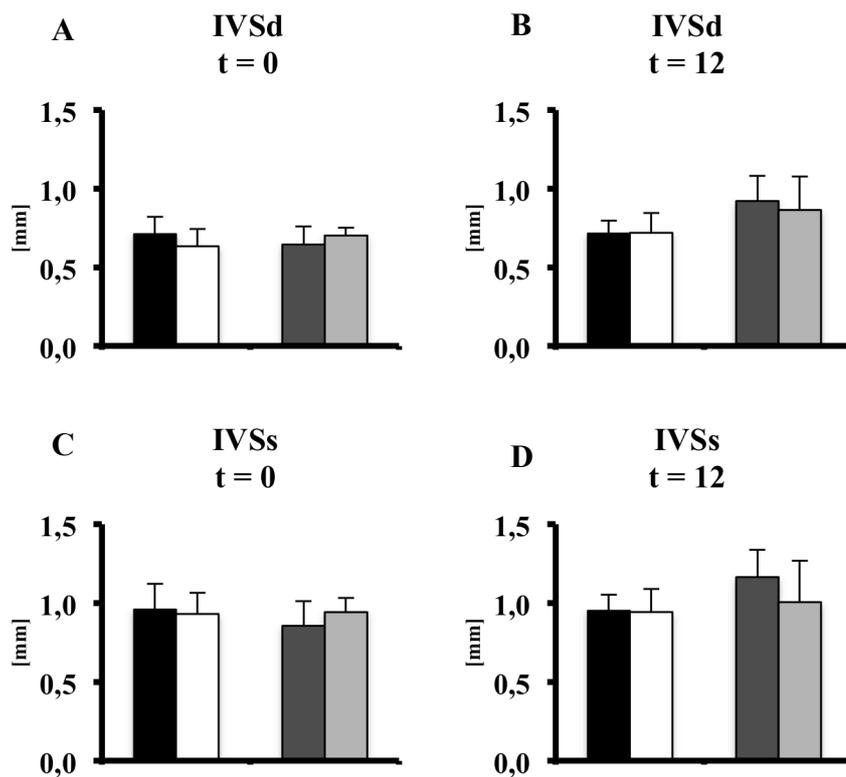
**Abbildung 16:** **A** Ejektionsfraktion (EF) im Verlauf Woche 0 bis Woche 12 nach TAC ( $t=0$  bis  $t=12$ ), **B** Verkürzungsfraktion (FS) im Verlauf Woche 0 bis Woche 12 nach TAC ( $t=0$  bis  $t=12$ ). Gemessen mittels transthorakaler Echokardiographie;  $n=12-16$  pro Gruppe;  $*p<0,05$   $SIRT5^{(-/-)}$  TAC vs.  $SIRT5^{(+/+)}$  TAC.

Abbildung 16 zeigt die Parameter Ejektions- und Verkürzungsfraktion im Verlauf über die 12 Wochen in denen Echokardiographien durchgeführt wurden. Auch im Verlauf zeigten sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den beiden Schein-operierten Gruppen bezüglich der beiden Parameter. In Woche 4 und Woche 12 zeigten sich jeweils signifikant niedrigere Werte in der Gruppe der  $SIRT5^{(-/-)}$  TAC-operierten Mäuse im Vergleich zu den  $SIRT5^{(+/+)}$  TAC-operierten Mäusen.

Wie in Abbildung 17 und 18 dargestellt, unterschieden sich die Dicke der Hinterwand (LVPWd und LVPWs) und der Vorderwand (IVSd und IVSs, s. Tabelle 10 und Abbildung 11, S. 38 und 39) zum Nullpunkt der Messung (t=0) weder diastolisch, noch systolisch zwischen den vier Gruppen. Auch zum Zeitpunkt t=12 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der vier Werte in den vier Gruppen. Die Mittelwerte der Dicke von Hinter- und Vorderwand waren diastolisch und systolisch in der Gruppe der TAC-operierten SIRT5<sup>(+/+)</sup>-Mäuse höher als in der Gruppe der TAC-operierten SIRT5<sup>(-/-)</sup>-Mäuse. Der Unterschied erreichte jedoch nicht das Signifikanzniveau.



**Abbildung 17:** Ausmaß der Hinterwand in Diastole und Systole *in vivo*. **A** Hinterwand diastolisch (LVPWd) zum Zeitpunkt vor TAC (t=0), **B** Hinterwand diastolisch (LVPWd) zum Zeitpunkt 12 Wochen nach TAC (t=12), **C** Hinterwand systolisch (LVPWs) zum Zeitpunkt vor TAC (t=0), **D** Hinterwand systolisch (LVPWs) zum Zeitpunkt 12 Wochen nach TAC (t=12). Gemessen mittels transthorakaler Echokardiographie; n=12-16 pro Gruppe; \*p<0,05 SIRT5<sup>(+/+)</sup> TAC vs. SIRT5<sup>(-/-)</sup> TAC.

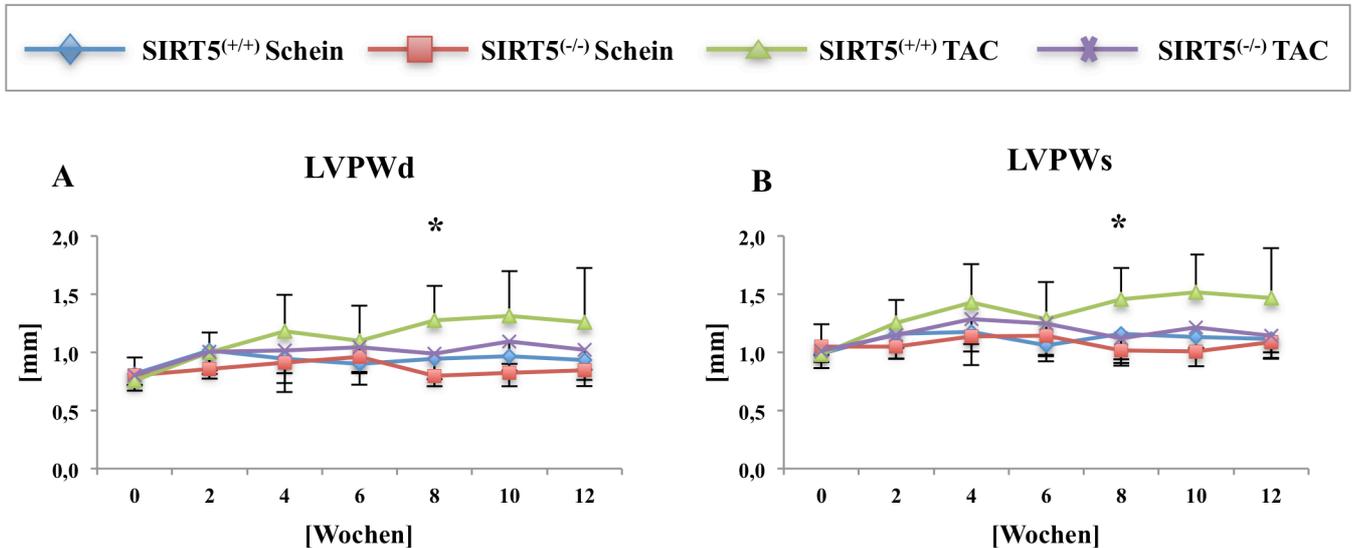


**Abbildung 18:** Ausmaß der Vorderwand in Diastole und Systole *in vivo*. **A** Vorderwand diastolisch zum Zeitpunkt vor TAC (t=0), **B** Vorderwand diastolisch zum Zeitpunkt 12 Wochen nach TAC (t=12), **C** Vorderwand systolisch zum Zeitpunkt vor TAC (t=0), **D** Vorderwand systolisch zum Zeitpunkt 12 Wochen nach TAC (t=12). Gemessen mittels transthorakaler Echokardiographie; n=12-16 pro Gruppe; \*p<0,05 SIRT5<sup>(+/+)</sup> TAC vs. SIRT5<sup>(-/-)</sup> TAC.

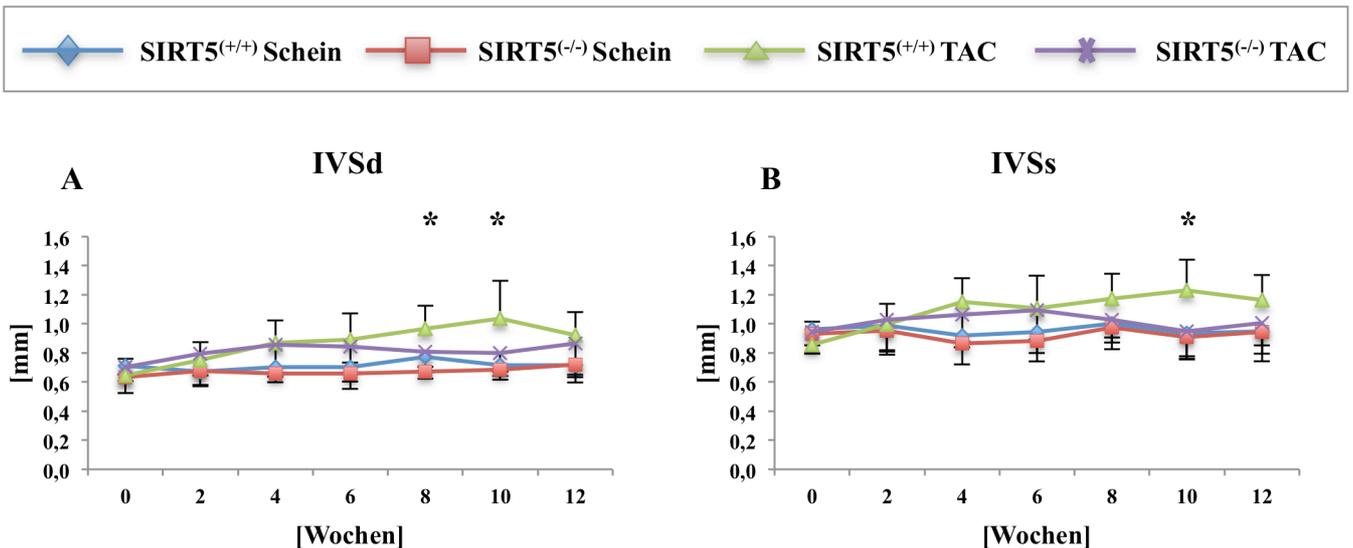
Im Verlauf der Messungen der Dicke von systolischer und diastolischer Hinterwand zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den beiden Schein-operierten Gruppen (siehe Abbildung 19). In Woche acht war die Dicke der Hinterwand diastolisch und systolisch signifikant höher in der Gruppe der SIRT5<sup>(+/+)</sup>-TAC-operierten Mäuse im Vergleich zur Gruppe der SIRT5<sup>(-/-)</sup>-TAC-operierten Mäuse.

Auch bezüglich der Dicke der Vorderwand zeigten sich im Verlauf weder systolisch noch diastolisch signifikante Unterschiede in den beiden Schein-operierten Gruppen (siehe Abbildung 20). In Woche acht wurde ein signifikanter Unterschied bezüglich der Dicke der Vorderwand in der Diastole in den beiden TAC-operierten Gruppen gemessen. Auch in Woche zehn zeigte sich ein signifikanter Unterschied sowohl diastolisch, als auch systolisch zwischen der Gruppe der SIRT5<sup>(+/+)</sup>-TAC-operierten Mäuse und den TAC-operierten SIRT5<sup>(-/-)</sup>-Mäusen. In allen drei benannten Fällen waren die Werte in der Gruppe der TAC-operierten

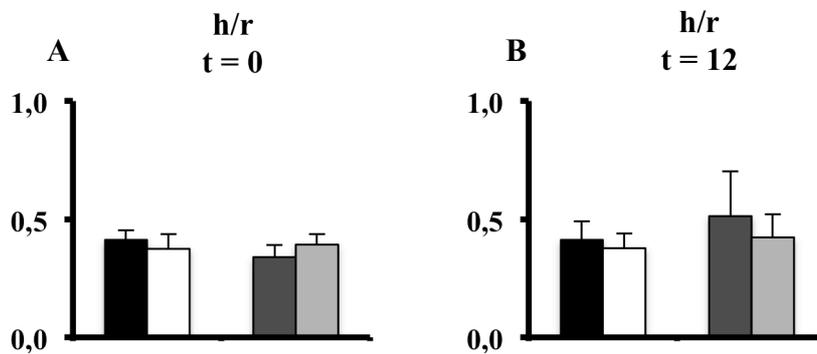
SIRT5<sup>(+/+)</sup>-Mäusen höher, als bei den SIRT5<sup>(-/-)</sup>-Mäusen, bei denen ebenfalls eine TAC-Operation durchgeführt wurde.



**Abbildung 19:** **A** Hinterwand diastolisch (LVPWd) im Verlauf Woche 0 bis Woche 12 nach TAC (t=0 bis t=12), **B** Hinterwand systolisch (LVPWs) im Verlauf Woche 0 bis Woche 12 nach TAC (t=0 bis t=12). Gemessen mittels transthorakaler Echokardiographie; n=12-16 pro Gruppe; \*p<0,05 SIRT5<sup>(+/+)</sup> TAC vs. SIRT5<sup>(-/-)</sup> TAC.

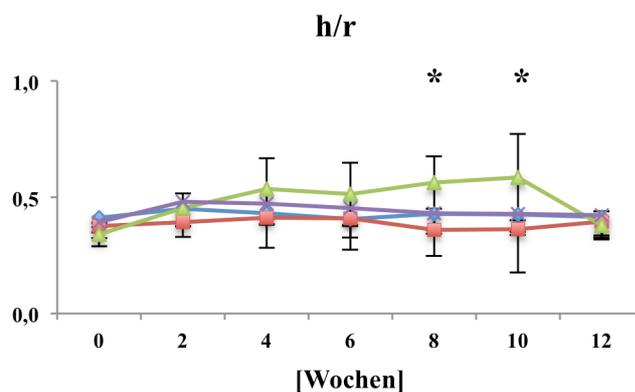


**Abbildung 20:** **A** Vorderwand diastolisch (IVSd) im Verlauf Woche 0 bis Woche 12 nach TAC (t=0 bis t=12), **B** Vorderwand systolisch (IVSs) im Verlauf Woche 0 bis Woche 12 nach TAC (t=0 bis t=12). Gemessen mittels transthorakaler Echokardiographie; n=12-16 pro Gruppe; \*p<0,05 SIRT5<sup>(+/+)</sup> TAC vs. SIRT5<sup>(-/-)</sup> TAC.



**Abbildung 21:** h/r als Indikator für eine dilatative oder konzentrische Hypertrophie *in vivo*. **A** h/r zum Zeitpunkt vor TAC (t=0), **B** h/r zum Zeitpunkt 12 Wochen nach TAC (t=12). Gemessen mittels transthorakaler Echokardiographie; n=12-16 pro Gruppe; \*p<0,05 SIRT5<sup>(+/+)</sup> TAC vs. SIRT5<sup>(-/-)</sup> TAC.

Der Wert h/r gibt einen Hinweis darauf, ob es sich im Rahmen des kardialen Remodeling um eine hypertrophische oder dilatative Verlaufsform handelt und berechnet sich aus [(IVSd+LVPWd)/LVIDd]. Je höher der Quotient, desto eher handelt es sich um eine hypertrophische Verlaufsform.

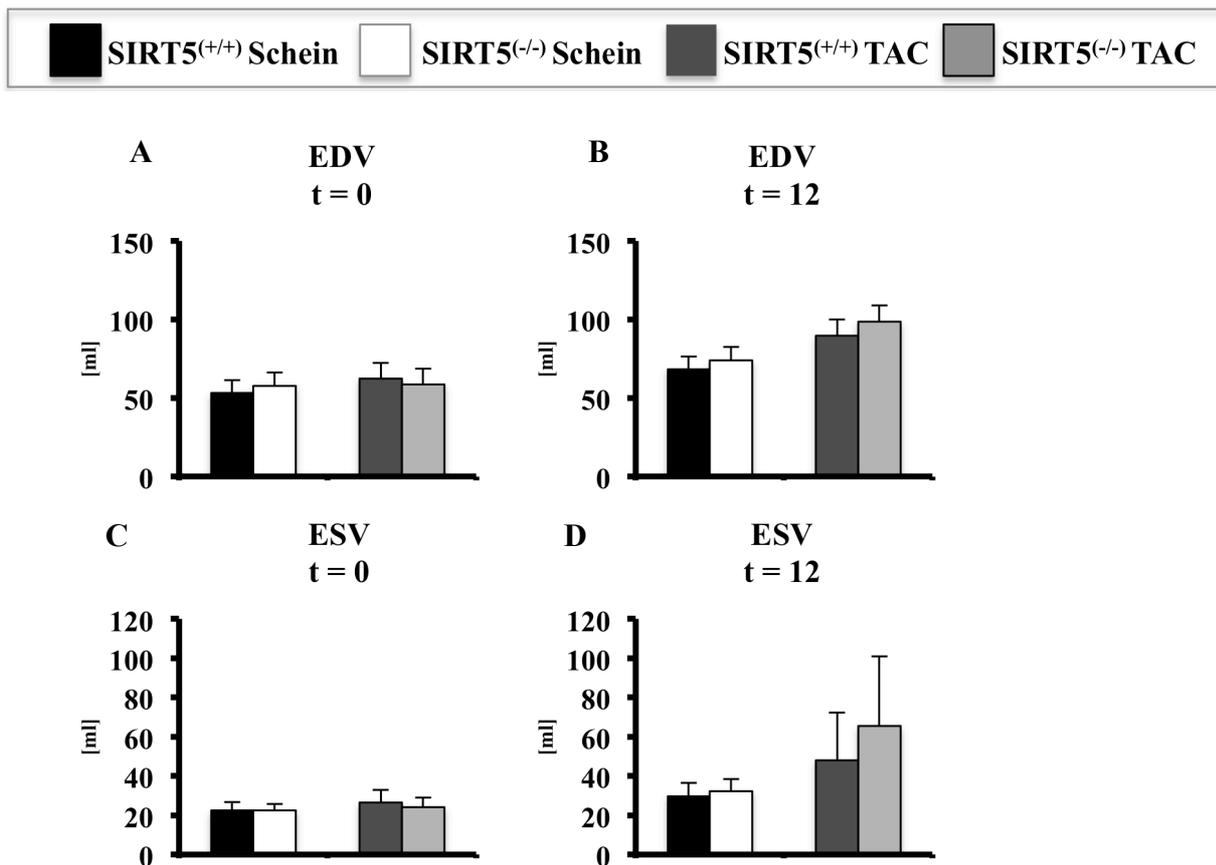


**Abbildung 22:** h/r im Verlauf Woche 0 bis Woche 12 nach TAC (t=0 bis t=12). Gemessen mittels transthorakaler Echokardiographie; n=12-16 pro Gruppe; \*p<0,05 SIRT5<sup>(+/+)</sup> TAC vs. SIRT5<sup>(-/-)</sup> TAC.

Im vorliegenden Fall zeigten sich wie in Abbildung 21 dargestellt weder zum Zeitpunkt t=0 noch zum Zeitpunkt t=12 Unterschiede in den vier Gruppen bezüglich dieses Faktors. Die Mittelwerte für h/r waren in der Gruppe der TAC-operierten SIRT5<sup>(+/+)</sup>-Mäuse zum Zeitpunkt

t=12 höher als in der Gruppe der TAC-operierten SIRT5<sup>(-/-)</sup>-Mäuse ohne, dass jedoch das Signifikanzniveau erreicht wurde.

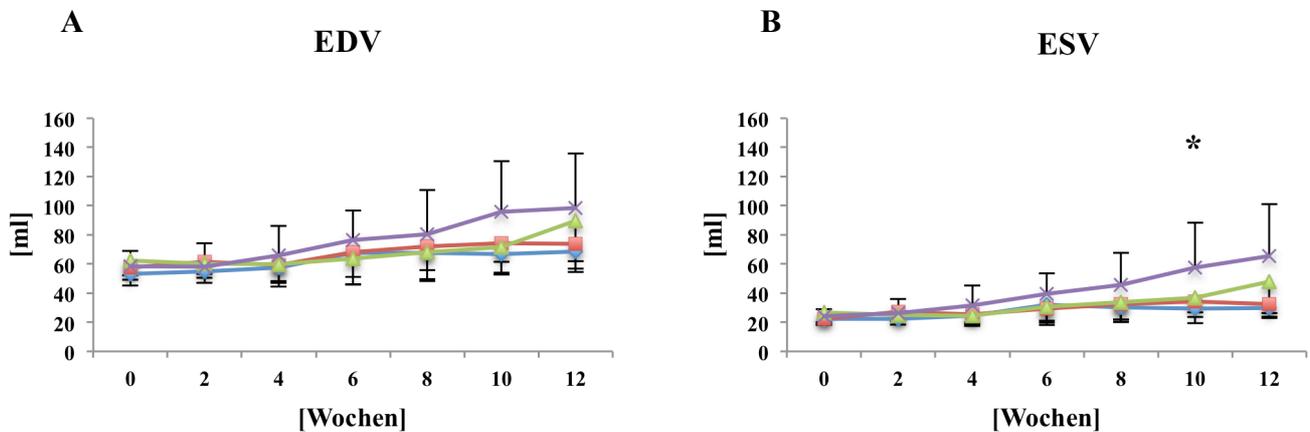
Im Verlauf der Messungen (s. Abbildung 22) zeigte sich in Woche acht und Woche zehn ein jeweils statistisch signifikant erhöhter Wert in der Gruppe der SIRT5<sup>(+/+)</sup>-TAC im Vergleich zu den TAC-operierten SIRT5<sup>(-/-)</sup>-Mäusen.



**Abbildung 23:** Endsystolisches und Enddiastolisches Volumen *in vivo*. **A** Enddiastolisches Volumen (EDV) zum Zeitpunkt vor TAC (t=0), **B** Enddiastolisches Volumen (EDV) zum Zeitpunkt 12 Wochen nach TAC (t=12), **C** Endsystolisches Volumen (ESV) zum Zeitpunkt vor TAC (t=0), **D** Endsystolisches Volumen (ESV) zum Zeitpunkt 12 Wochen nach TAC (t=12). Gemessen mittels Transthorakaler Echokardiographie; n=12-16 pro Gruppe; \*p<0,05 SIRT5<sup>(-/-)</sup> TAC vs. SIRT5<sup>(+/+)</sup> TAC.

Weder zum Zeitpunkt t=0 noch zum Zeitpunkt t=12 zeigten sich signifikante Unterschiede bezüglich des enddiastolischen und endsystolischen Volumens in den vier Gruppen (siehe Abbildung 23). Zum Zeitpunkt t=12 waren die Mittelwerte der beiden Parameter in der Gruppe der SIRT5<sup>(-/-)</sup>-TAC jeweils höher als in der Gruppe SIRT5<sup>(+/+)</sup>-TAC. Die Unterschiede erreichten jedoch nicht das Signifikanzniveau.

◆ SIRT5<sup>(+/+)</sup> Schein   
 ■ SIRT5<sup>(-/-)</sup> Schein   
 ▲ SIRT5<sup>(+/+)</sup> TAC   
 ✱ SIRT5<sup>(-/-)</sup> TAC

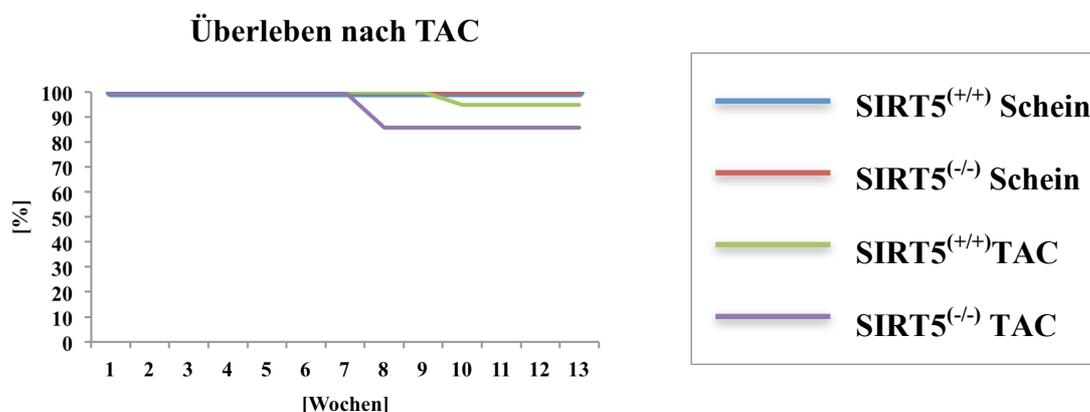


**Abbildung 24:** **A** Enddiastolisches Volumen (EDV) im Verlauf Woche 0 bis Woche 12 nach TAC (t=0 bis t=12), **B** Endsystolisches Volumen (ESV) im Verlauf Woche 0 bis Woche 12 nach TAC (t=0 bis t=12). Gemessen mittels Transthorakaler Echokardiographie; n=12-16 pro Gruppe; \*p<0,05 SIRT5<sup>(-/-)</sup>TAC vs. SIRT5<sup>(+/+)</sup>TAC.

Im Verlauf der zwölf Wochen post OP stiegen die Mittelwerte des Volumens sowohl enddiastolisch, als auch endsystolisch in der Gruppe der SIRT5<sup>(-/-)</sup>-TAC-operierten Mäuse an (siehe Abbildung 24). In Woche zehn zeigte sich ein signifikant größeres endsystolisches Volumen in der Gruppe der SIRT5<sup>(-/-)</sup>-TAC-operierten Mäuse im Vergleich zu den SIRT5<sup>(+/+)</sup>-TAC-operierten Mäusen.

### 5.3 Überleben nach transverser Aortenkonstriktion

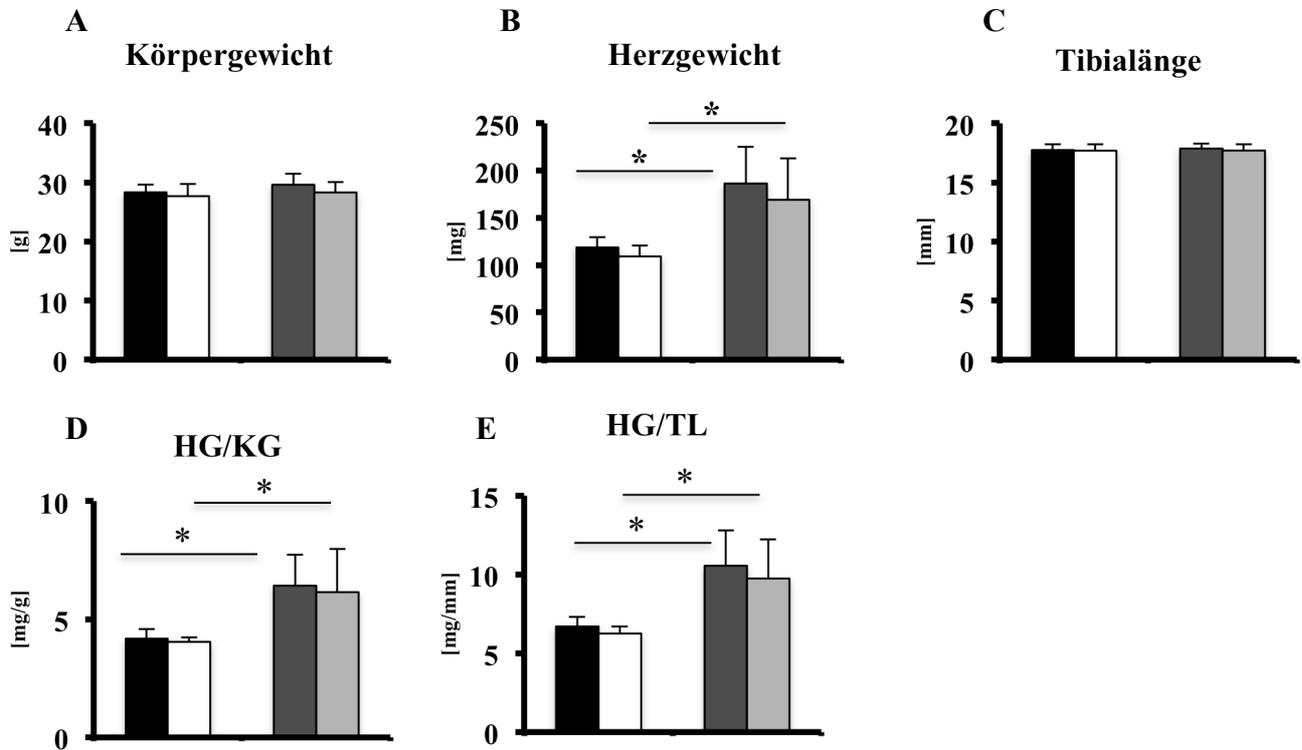
Aus den Gruppen der Schein-operierten Mäuse überlebten alle Tiere den Beobachtungszeitraum von 12 Wochen. Von den TAC-operierten  $SIRT5^{(-/-)}$ -Mäusen verstarben zwei Tiere unabhängig voneinander in Woche 7. Bei der in Woche 6 durchgeführten Echokardiographie betrug die Ejektionsfraktion der Maus weniger als 30%. In der Gruppe der TAC-operierten  $SIRT5^{(+/+)}$ -Mäuse verstarb eine Maus 9 Wochen nach TAC-OP mit einer Ejektionsfraktion unter 30%. Wie in Abbildung 25 dargestellt, lag das mediane Überleben bei den TAC-operierten  $SIRT5^{(-/-)}$ -Mäusen bei 89% (n=19). In der Gruppe der TAC-operierten  $SIRT5^{(+/+)}$ -Mäuse betrug das mediane Überleben 95% (n=20).



**Abbildung 25:** Überleben nach transverser Aortenkonstriktion; n=15-20; \*p<0,05  $SIRT5^{(-/-)}$  TAC vs.  $SIRT5^{(+/+)}$  TAC.

### 5.4 Herz- und Körpergewicht

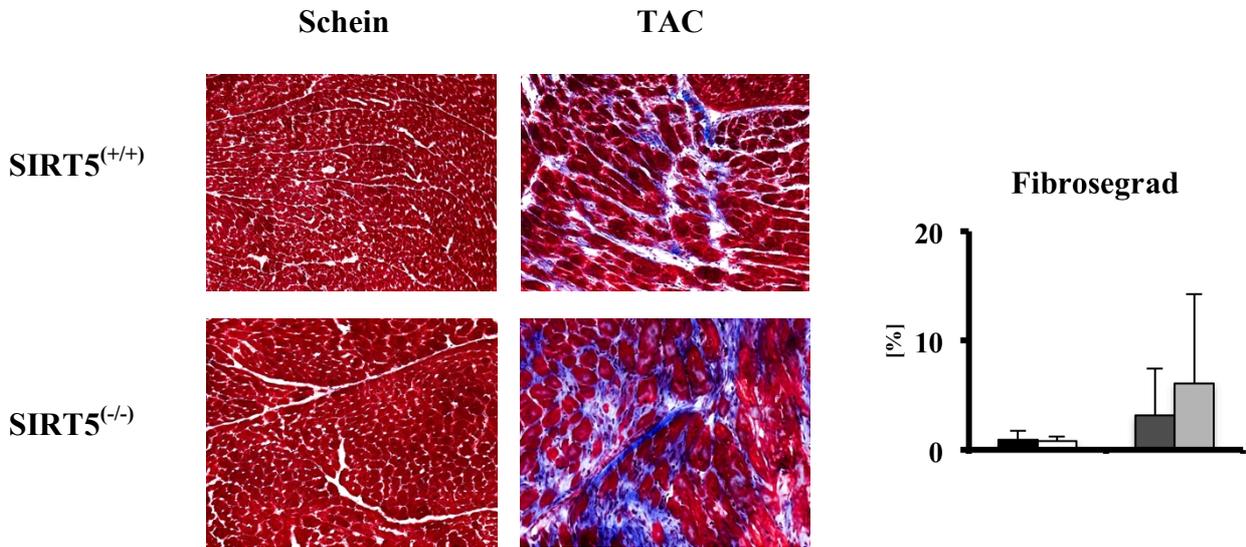
Körper- und Herzgewicht wurden 12 Wochen nach dem TAC- oder Schein-Eingriff bestimmt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Gruppen bezüglich des Körpergewichts (siehe Abbildung 26 A). Das Herzgewicht war in beiden TAC-operierten Gruppen im Vergleich zu den jeweils Schein-operierten Gruppen signifikant erhöht (s. Abb. 26 B). Die Tibialänge war vergleichbar in allen vier Gruppen (s. Abb. 26 C). Somit war auch das Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht, sowie das Verhältnis von Herzgewicht zu Tibialänge in den Gruppen der TAC-operierten Mäuse im Verhältnis zu den Schein-operierten Mäusen signifikant erhöht (s. Abb. 26 D und E).



**Abbildung 26:** Herz- und Körpergewicht 12 Wochen nach TAC oder Schein-OP. **A** Körpergewicht (KG), **B** Herzgewicht (HG), **C** Tibialänge (TL), **D** Verhältnis von Herzgewicht (HG) zu Körpergewicht (KG), **E** Verhältnis von Herzgewicht (HG) zu Tibialänge (TL); n=10-19; \*p<0,05 SIRT5<sup>(-/-)</sup>TAC und SIRT5<sup>(+/+)</sup>TAC vs. SIRT5<sup>(-/-)</sup>Schein und SIRT5<sup>(+/+)</sup>Schein.

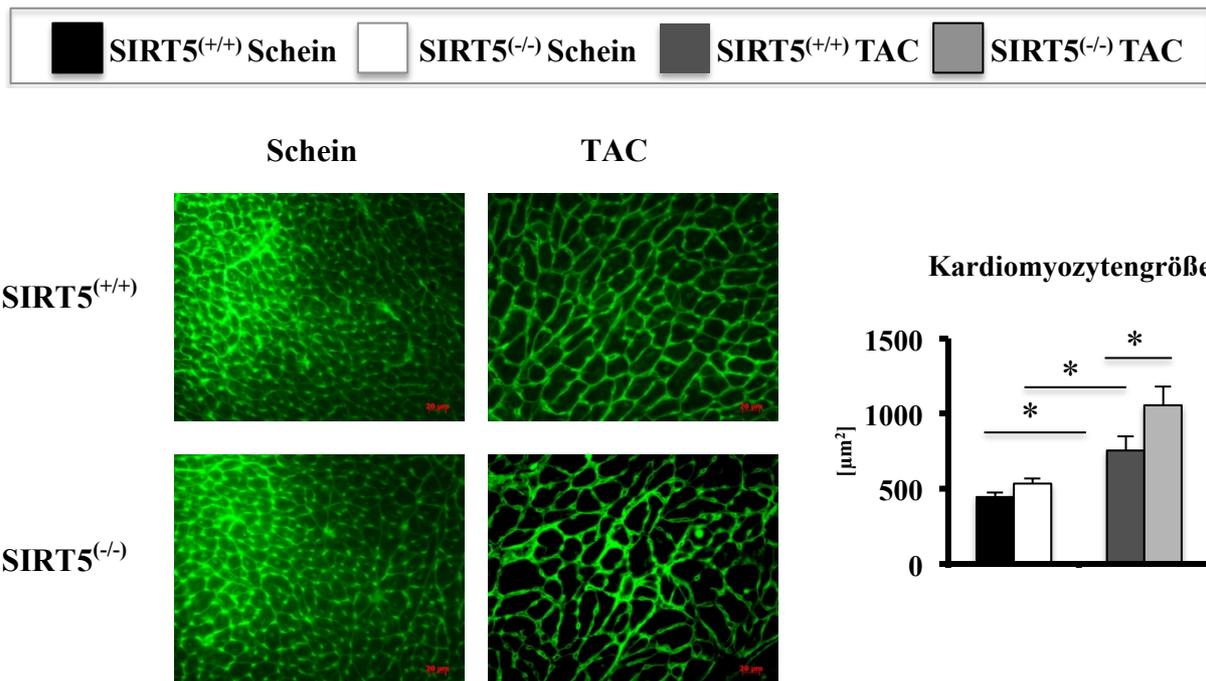
## 5.5 Histologie

Mit der Masson-Trichrome-Färbung wurde in allen vier Gruppen der interstitielle Fibrosegrad im Herzmuskel 12 Wochen nach TAC-OP bestimmt. Quantifiziert wurde jeweils der Anteil der blau-angefärbten Kollagenstränge. Der Anteil an Kollagenfasern in der Gruppe der SIRT5<sup>(-/-)</sup>-TAC-Mäuse war im Vergleich zu den SIRT5<sup>(-/-)</sup>-Schein-operierten-Mäusen 7,5 mal höher. In der Gruppe der SIRT5<sup>(+/+)</sup>-TAC-Mäuse wurde im Vergleich zur Gruppe der SIRT5<sup>(+/+)</sup>-Schein-operierten-Mäuse 3,5 mal mehr Kollagen nachgewiesen. Abbildung 27 zeigt, dass die Mittelwerte bezüglich des zellulären Fibrosegrades bei den SIRT5<sup>(-/-)</sup>-TAC-Mäusen doppelt so hoch waren, wie bei den SIRT5<sup>(+/+)</sup>-TAC-Mäusen. Das Signifikanzniveau wurde jedoch aufgrund von einer hohen Streuung der Werte nicht erreicht.



**Abbildung 27:** Repräsentative Bilder der Masson-Trichrome-Färbung und Quantifizierung des interstitiellen Fibrosegrades 12 Wochen nach TAC oder Schein-OP; n=6-8; \*p<0,05 SIRT5<sup>(-/-)</sup> TAC und SIRT5<sup>(+/+)</sup> TAC vs. SIRT5<sup>(-/-)</sup> Schein und SIRT5<sup>(+/+)</sup> Schein, SIRT5<sup>(-/-)</sup> TAC vs. SIRT5<sup>(+/+)</sup> TAC.

Die Zellgröße der Kardiomyozyten wurde in allen vier Gruppen 12 Wochen nach TAC-OP mit der WGA-Färbung bestimmt. Wie in Abbildung 28 dargestellt, war die Größe der Kardiomyozyten in der Gruppe der SIRT5<sup>(-/-)</sup>-und der SIRT5<sup>(+/+)</sup>-TAC-operierten Mäuse signifikant größer, als in den jeweils Schein-operierten Gruppen. Im Vergleich der TAC-operierten Mäuse zeigten sich signifikant größere Kardiomyozyten in der Gruppe der TAC-operierten SIRT5<sup>(-/-)</sup>-Mäuse.

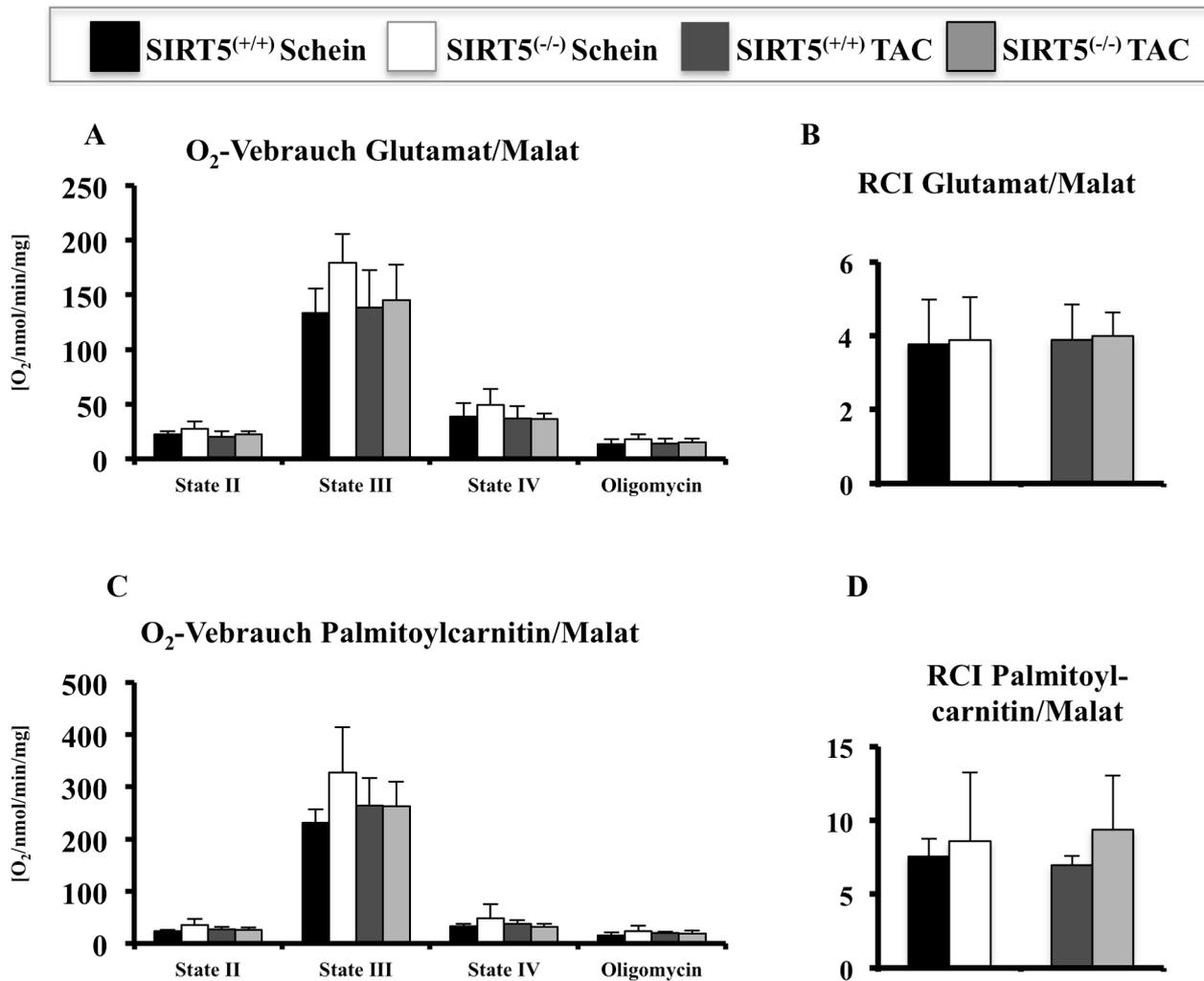


**Abbildung 28:** Repräsentative Bilder der WGA-Färbungen und Quantifizierung der Kardiomyozytengröße 12 Wochen nach TAC oder Schein-OP; n=6-8; \*p<0,05 SIRT5<sup>(-/-)</sup> TAC und SIRT5<sup>(+/+)</sup> TAC vs. SIRT5<sup>(-/-)</sup> Schein und SIRT5<sup>(+/+)</sup> Schein, SIRT5<sup>(-/-)</sup> TAC vs. SIRT5<sup>(+/+)</sup> TAC.

## 5.6 Myokardiale mitochondriale Atmungskapazität

Die respiratorische mitochondriale Kapazität wurden in allen vier Gruppen jeweils mit den Substraten Glutamat/Malat und Palmitoylcarnitin/Malat bestimmt. In Abbildung 29 dargestellt ist der Sauerstoffverbrauch in den *Respiratory States II – IV*, sowie nach der Zugabe von Oligomycin. Weiterhin wird der von Chance und Williams definierte respiratorische Kontrollindex (*Respiratory Control Index*, RCI) betrachtet (Chance and Williams 1956). Dieser berechnet sich als Quotient der *State III*- und *State IV*-Atmung und beschreibt die Variation des Sauerstoffverbrauchs in Abhängigkeit von der Gegenwart (*State III*) oder Abwesenheit (*State IV*) von ADP. Je mehr ADP im mitochondrialen Matrixraum vorhanden ist, desto höher kann der mitochondriale Sauerstoffverbrauch werden. Durch die externe Zugabe des ADP, ist der Sauerstoffverbrauch in *State III* also maximiert. Je höher dieser Verbrauch im Vergleich zu dem in *State IV* ist, je höher also der RCI ausfällt, desto besser ist die Steuerung des mitochondrialen Energieflusses an das ADP-Angebot gekoppelt. Je höher der RCI, desto effizienter kann also das Mitochondrium ein hohes Angebot an ADP nutzen. In den meisten

Gewebe liegt der RCI zwischen 3 und 7, je nach Substrat und Qualität der Präparierung der Mitochondrien.

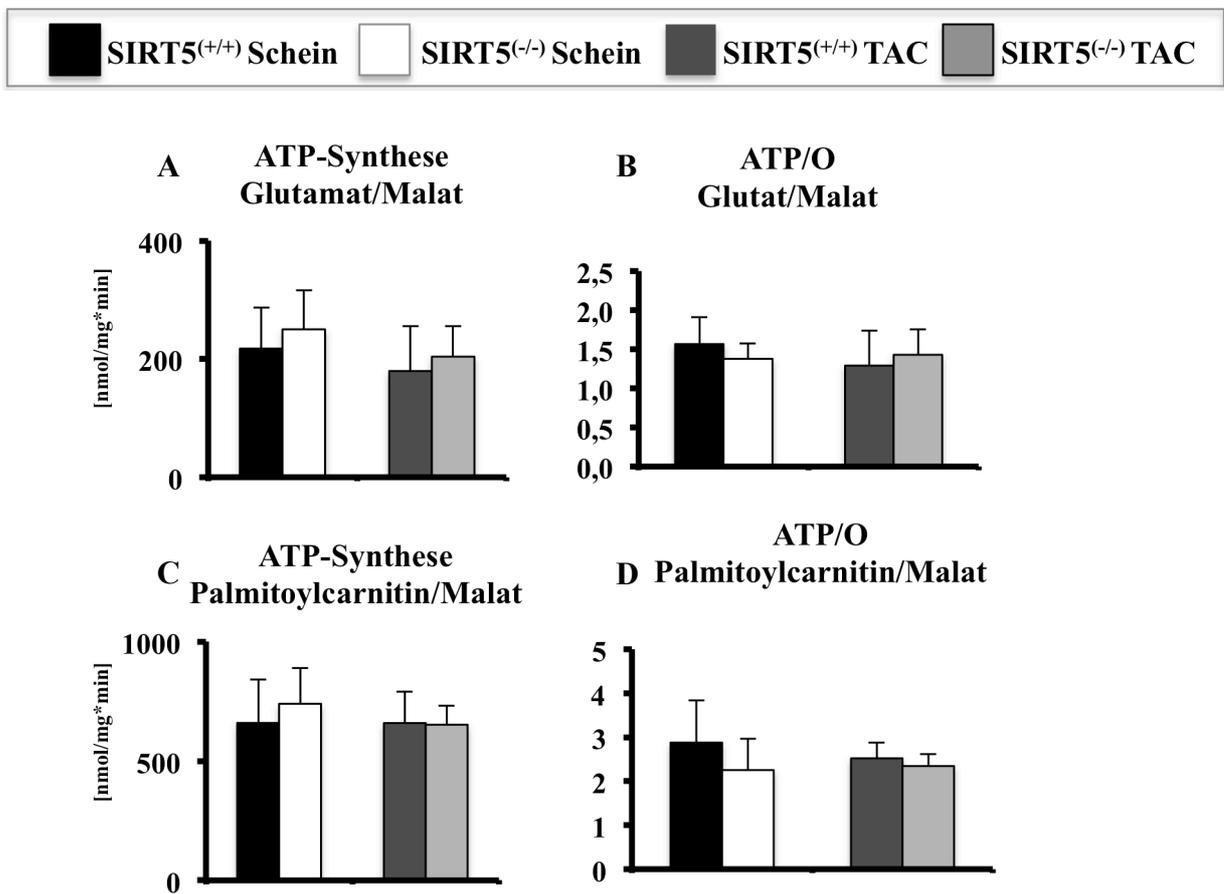


**Abbildung 29:** Myokardiale mitochondriale Atmungskapazität. **A** und **B** Sauerstoffverbrauch und RCI mit den Substraten Glutamat/Malat. **C** und **D** RCI und Sauerstoffverbrauch mit den Substraten Palmitoylcarnitin/Malat. 12 Wochen nach TAC oder Schein-OP; n=6-7; \*p<0,05 SIRT5<sup>(-/-)</sup> TAC und SIRT5<sup>(+/+)</sup> TAC vs. SIRT5<sup>(-/-)</sup> Schein und SIRT5<sup>(+/+)</sup> Schein.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den SIRT5<sup>(-/-)</sup>- und SIRT5<sup>(+/+)</sup>-Mäusen mit TAC- oder Schein-OP bezüglich *State II*, *III* und *IV*. Auch die errechneten Werte für den RCI unterschieden sich nicht signifikant in den vier Gruppen. Sowohl in den Messungen mit den Substratkombinationen Glutamat/Malat, als auch mit Palmitoylcarnitin/Malat zeigten sich in der Gruppe der SIRT5<sup>(-/-)</sup>-Schein-operierten Mäuse erhöhte Mittelwerte in *State III* und *State IV*. Das Signifikanzniveau wurde nicht erreicht.

## 5.7 Myokardiale ATP-Syntheseraten

Für eine Analyse des, in den Mitochondrien generierten, ATPs als direkter Parameter der mitochondrialen Synthesekapazität wurde der ATP-Gehalt nach einer Stimulation mit ADP bestimmt. Mittels des ATP/O-Quotienten konnte weiterhin die ATP-Synthese indirekt zum Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien in Verhältnis gesetzt werden (Estabrook 1967). Je höher also das ATP/O-Verhältnis, desto effektiver ist die ATP-Synthese in Bezug auf den gleichzeitigen Sauerstoffverbrauch. Beide Werte wurden mit den Substraten Glutamat/Malat und Palmitoylcarnitin/Malat bestimmt und sind in Abbildung 30 dargestellt. Weder bezüglich der ATP-Syntheserate, noch bezüglich des ATP/O-Quotienten konnten signifikante Unterschiede in den vier Gruppen bestimmt werden.



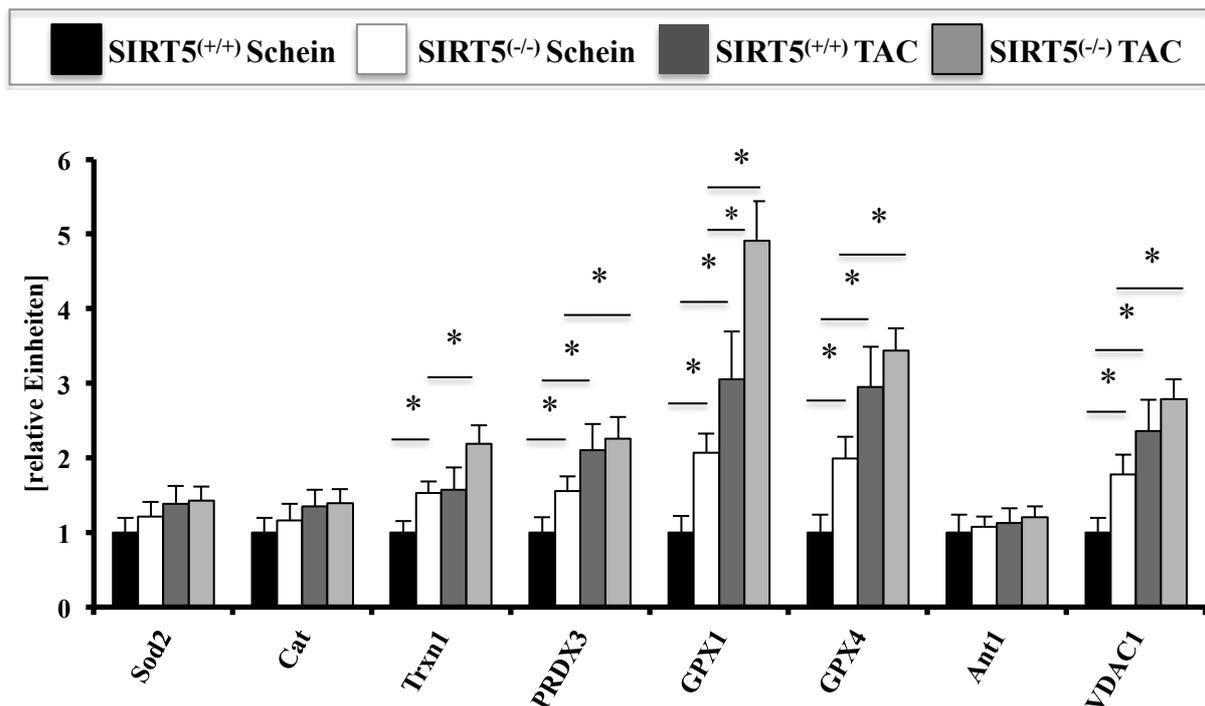
**Abbildung 30:** ATP-Syntheserate und ATP/O-Quotient. A und B ATP-Synthese und ATP/O mit den Substraten Glutamat/Malat. C und D ATP-Synthese und ATP/O mit den Substraten Palmitoylcarnitin/Malat. 12 Wochen nach TAC oder Schein-OP; n=6-7; \*p<0,05 SIRT5<sup>(-/-)</sup> TAC und SIRT5<sup>(+/+)</sup> TAC vs. SIRT5<sup>(-/-)</sup> Schein und SIRT5<sup>(+/+)</sup> Schein.

Im Vergleich zu den SIRT5<sup>(+/+)</sup>-Schein-operierten Mäusen zeigte sich in der Gruppe der SIRT5<sup>(-/-)</sup>-Schein-operierten Mäuse mit beiden Substraten eine leicht erhöhte ATP-Synthese,

hingegen ein erniedrigter ATP/O-Quotient. In beiden Fällen waren die Unterschiede jedoch nicht statistisch signifikant.

## 5.8 Genexpression

Mittels qPCR konnte die Expression verschiedener, am mitochondrialen Stoffwechsel beteiligten, Enzyme auf mRNA-Ebene bestimmt werden (siehe Abbildung 31).

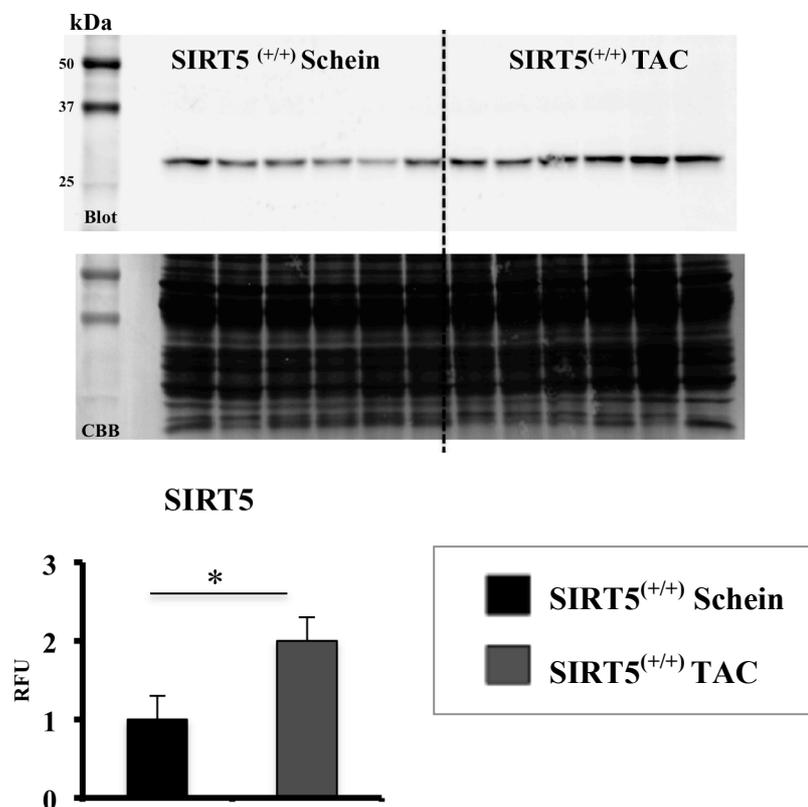


**Abbildung 31:** Bestimmung des mRNA-Gehaltes mittels quantitativer RT-PCR für mitochondriale Superoxid-Dismutase (Sod2); Catalase (Cat); Thioredoxin 1 (Trxn1); Peroxiredoxin 3 (PRDX3); Glutathion-Peroxidase 1 (GPX1); Glutathion-Peroxidase 4 (GPX4); Adenin-Nukleotid-Translokator 1 (Ant1); *Voltage-Dependent Anion-Selective Channel Protein 1* (VDAC1). 12 Wochen nach TAC oder Schein-OP; n=8-9; \*p<0,05 SIRT5<sup>(-/-)</sup> TAC und SIRT5<sup>(+/+)</sup> TAC vs. SIRT5<sup>(-/-)</sup> Schein und SIRT5<sup>(+/+)</sup> Schein.

Die Expression der mitochondrialen Superoxid-Dismutase (Sod2), der Catalase (Cat) und des Adenin-Nukleotid-Translokators 1 (Ant1) unterschieden sich nicht signifikant zwischen den vier Gruppen. Die Expression von Thioredoxin 1 (Trxn1), Peroxiredoxin 3 (PRDX3), Glutathion-Peroxidase 1 (GPX1), Glutathion-Peroxidase 4 (GPX4) und dem *Voltage-Dependent Anion-Selective Channel Protein 1* (VDAC1) waren in der Gruppe der SIRT5<sup>(-/-)</sup>-Scheinoperierten Mäuse im Vergleich zu den SIRT5<sup>(+/+)</sup>-Scheinoperierten Mäuse signifikant erhöht. Die Expression dieser Enzyme war nach der TAC-Operation in der Gruppe der SIRT5<sup>(-/-)</sup>-

Mäuse zusätzlich statistisch signifikant höher als in der Schein-operierten Kontrollgruppe. PRDX3, GPX1, GPX4 und VDAC1 waren nach der TAC-Operation in der Gruppe der SIRT5<sup>(+/+)</sup>-Mäuse signifikant stärker exprimiert, als bei den Schein-operierten Mäusen des gleichen Genotyps. Bei der Glutathion-Peroxidase 1 zeigte sich weiterhin eine signifikant höhere Expression in der Gruppe der TAC-operierten SIRT5<sup>(-/-)</sup>-Mäuse im Vergleich zu den SIRT5<sup>(+/+)</sup>-operierten Mäusen.

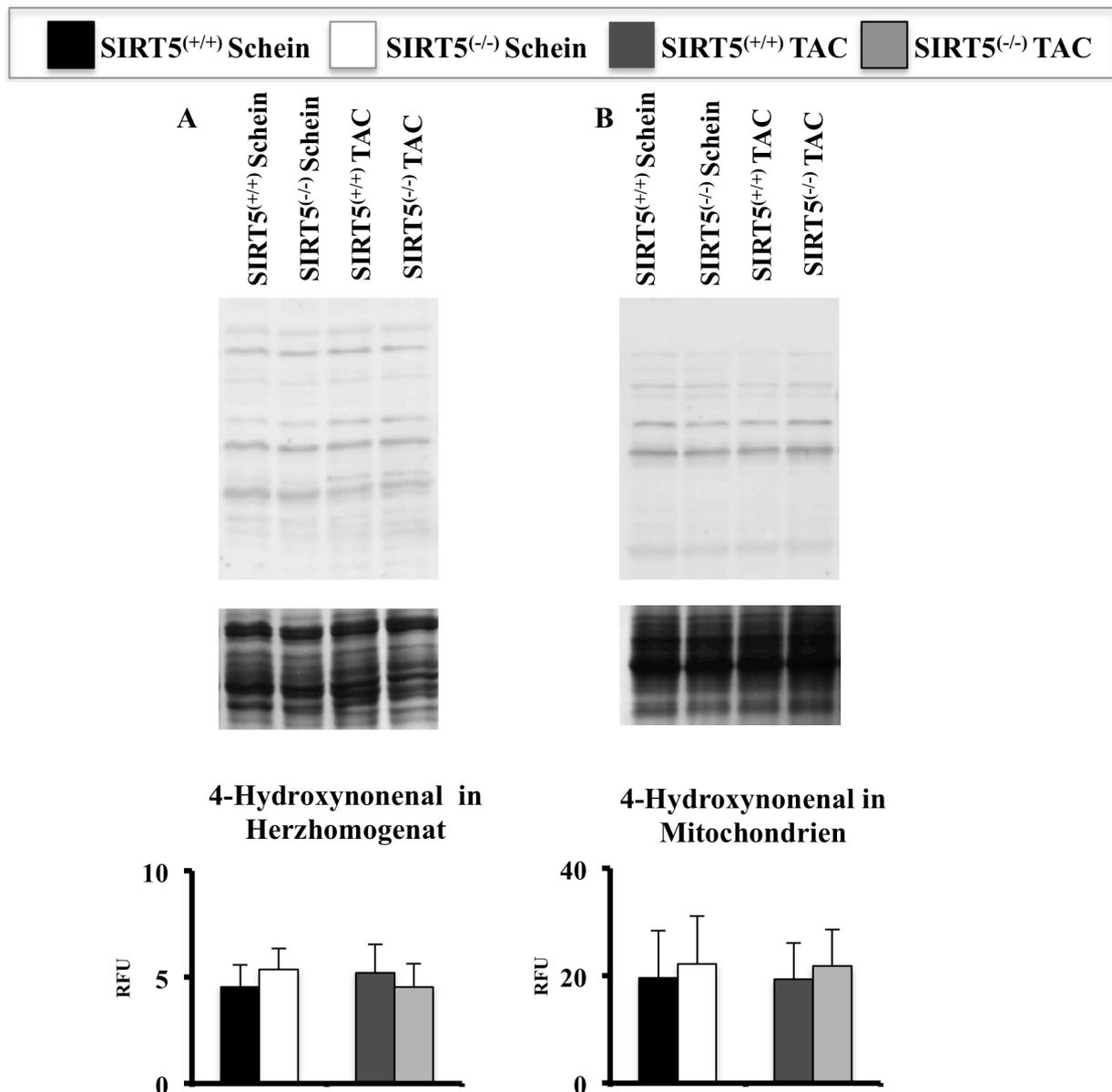
Wie in Abbildung 32 dargestellt, wurde mittels Western Blot auch die Expression von SIRT5 in den SIRT5<sup>(+/+)</sup>-Mäusen nach TAC- und Schein-Operation gemessen. Es zeigte sich eine signifikant höhere Expression des Enzyms in der Gruppe der Mäuse, die der TAC-Operation unterzogen wurden.



**Abbildung 32:** Proteinlevel von SIRT5 in Herzhomogenaten. Gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot mit dem SIRT5-Antikörper, sowie die Coomassie Färbung (CBB: Coomassie Brilliant Blue) nach SDS-PAGE; 12 Wochen nach TAC oder Schein-OP, n=5-6; \*p<0,05 SIRT5<sup>(+/+)</sup> Schein vs. SIRT5<sup>(+/+)</sup> TAC.

## 5.9 Abschätzung der Lipidperoxidation

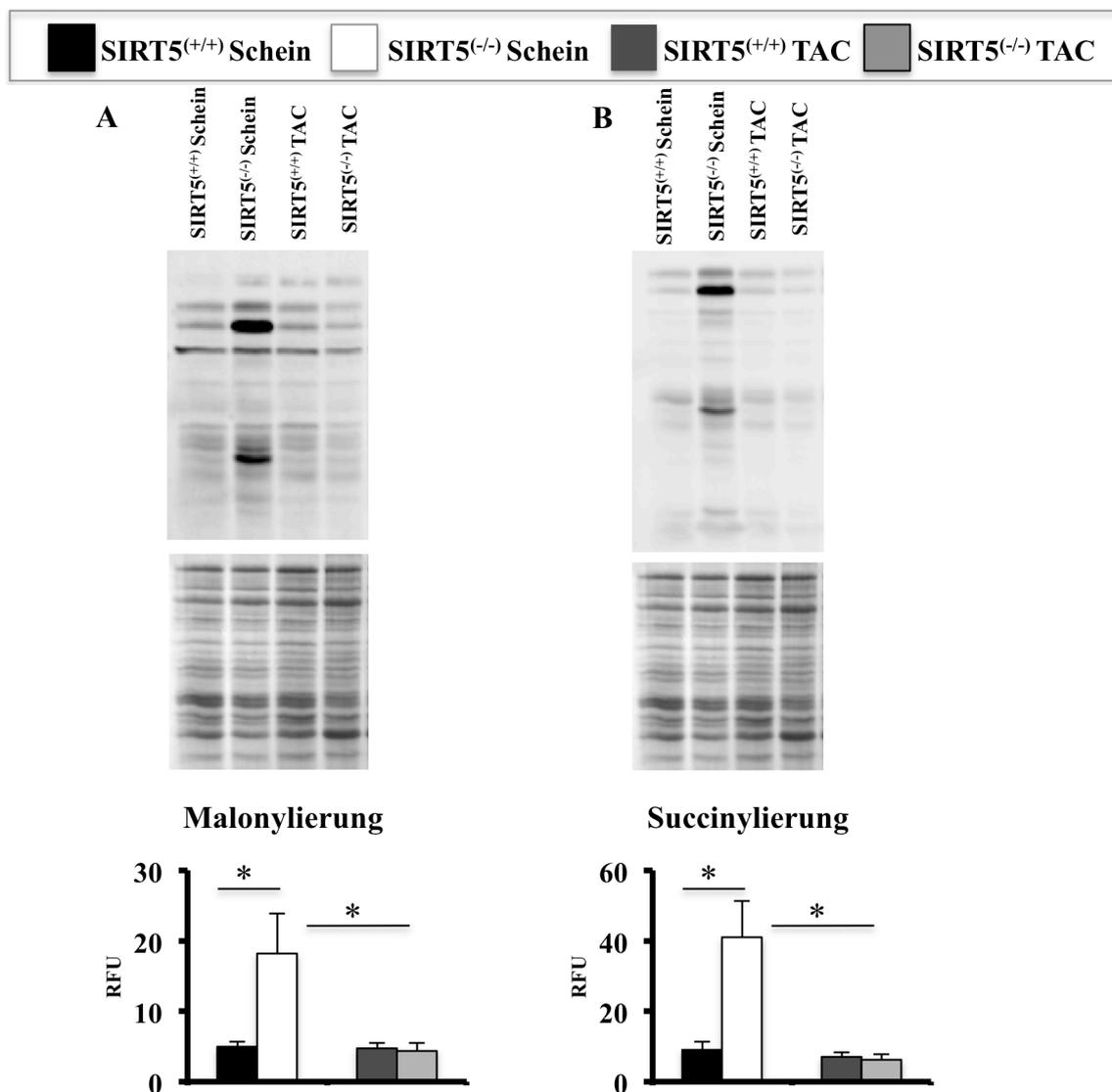
Das reaktive, ungesättigte Aldehyd 4-Hydroxynoneal (4-HNE) geht aus einer unphysiologischen Lipidperoxidation durch ROS hervor und ermöglicht so eine Quantifizierung der vorliegenden Beeinflussung des Stoffwechsels durch oxidativen Stress. Die Konzentration an 4-HNE wurde in kardialen Mitochondrien und in Herzhomogenat mittels Western Blot untersucht. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Gruppen (s. Abbildung 33).



**Abbildung 33:** Proteinlevel von 4-Hydroxynoneal in Herzhomogenat (A) und Mitochondrien (B) mit repräsentativem Western-Blot und Coomassie Färbung nach SDS-PAGE; 12 Wochen nach TAC bzw. Schein-OP; n=8-9; \*p<0,05 SIRT5<sup>(-/-)</sup> TAC und SIRT5<sup>(+/+)</sup> TAC vs. SIRT5<sup>(-/-)</sup> Schein und SIRT5<sup>(+/+)</sup> Schein.

## 5.10 Succinylierung und Malonylierung

Um die Succinylierung und Malonylierung nach TAC zu untersuchen, wurde die Konzentration an succinylierten und malonylierten Proteinen in den Mitochondrien mittels Western Blot bestimmt (siehe Abbildung 34). Besonders deutlich war eine signifikant höhere Succinylierung und Malonylierung in der Gruppe der SIRT5<sup>(-/-)</sup>-Schein-operierten Gruppe im Vergleich zu den SIRT5<sup>(+/+)</sup>-Schein-operierten und den SIRT5<sup>(-/-)</sup>-TAC-operierten Gruppen zu beobachten. Nach der TAC-Operation zeigte sich allerdings eine signifikant niedrigere Malonylierung und Succinylierung in beiden Genotypen.



**Abbildung 34:** **A** Proteinlevel von malonylierten Lysinen in Herzhomogenat mit repräsentativem Western-Blot und Coomassie Färbung nach SDS-PAGE; **B** Proteinlevel von succinylierten Lysinen in Herzhomogenat mit repräsentativem Western-Blot und Coomassie Färbung nach SDS-PAGE; 12 Wochen nach TAC bzw. Schein-OP; n=8-9; \*p<0,05 SIRT5<sup>(-/-)</sup> TAC und SIRT5<sup>(+/+)</sup> TAC vs. SIRT5<sup>(-/-)</sup> Schein und SIRT5<sup>(+/+)</sup> Schein.

## 6 Diskussion

Eine suffiziente Kontraktion des Herzmuskels ist Voraussetzung für die Aufrechterhaltung eines funktionsfähigen Körpermetabolismus. Essentiell ist hierbei die Ausschöpfung verschiedener Adaptationsmechanismen des Herzens an unterschiedliche Energieanforderungen. Die Sirtuine spielen als  $\text{NAD}^+$ -abhängige Enzyme eine wichtige Rolle im Stoffwechsel der Zelle und nehmen vor allem durch posttranslationale Modifikationen Einfluss auf die empfindlichen Anpassungsmechanismen verschiedener Organe. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen von SIRT5 die kardiale Anpassungsfähigkeit an erhöhte Energiebedürfnisse einschränkt und nach erhöhter chronischer Druckbelastung zu einer reduzierten kardialen Leistung führt. Eine SIRT5-Defizienz im Herzen führt im *pressure-overload*-Modell zu einer signifikant verstärkten Hypertrophie der Kardiomyozyten. Weiterhin konnte ein Trend zu vermehrter interstitieller Fibrose festgestellt werden, ohne, dass jedoch das Signifikanzniveau erreicht wurde. Es wurde ebenfalls eine erhöhte Expression von Genen gemessen, die antioxidative Enzyme kodieren. Überraschenderweise findet auch im Falle des *Knockouts* von SIRT5 bei chronischer Druckbelastung des Herzens eine signifikante Desuncinylierung und Demalonylierung statt. Der mitochondriale Sauerstoffverbrauch, so wie die ATP-Synthese zeigten sich in den TAC-operierten  $\text{SIRT5}^{(-/-)}$ -Mäusen nicht eingeschränkt. Der zugrunde liegende Pathomechanismus des beobachteten Phänotyps konnte noch nicht endgültig geklärt werden. Die einzelnen Ergebnisse und ihre jeweiligen möglichen Konsequenzen sollen im Folgenden anhand von zugehörigen Publikationen diskutiert werden. Abbildung 35 auf S. 81 liefert weiterhin eine zusammenfassende Übersicht der Ergebnisse.

Die kontraktile Herzfunktion wurde *in vivo* mittels Echokardiographie nach TAC- oder Schein-Operation untersucht. Der kardiomyozytenspezifische *Knockout* von SIRT5 führte ohne Erhöhung der Nachlast innerhalb von 12 Wochen nicht zu einer Veränderung der Herzfunktion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies steht im Kontrast zu den Ergebnissen von Sadhukhan et al., die bei acht Wochen alten  $\text{SIRT5}^{(-/-)}$ -Mäusen ohne TAC-Operation bereits eine reduzierte EF und FS maßen, wobei sich diese Entwicklungen mit zunehmendem Alter der Mäuse noch verstärkten (Sadhukhan et al. 2016). Hershberger et al. beschreiben im Gegensatz dazu ebenfalls einen unauffälligen Phänotypen für die SIRT5-defiziente Maus ohne erhöhte Energieanforderungen, allerdings beschränkt sich der untersuchte Zeitraum in diesem Fall nur auf vier Wochen (Hershberger et al. 2017). Es bleibt in diesem Zusammenhang darauf hinzuweisen, dass in den Arbeiten von Sadhukhan et al. und Hershberger et al. kein kar-

diomyozytenspezifischer, sondern ein globaler SIRT5-*Knockout* in Mäusen mit gemischtem genetischen Hintergrund verwendet wurde (Hershberger et al. 2017). Weiterhin bleibt zu bedenken, dass eine eingeschränkte kardiale Funktion ohne chronische Druckbelastung im SIRT5<sup>(-/-)</sup>-defizienten Herzen auch erst nach einem längeren Beobachtungszeitraum eintreffen könnte. So konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass das Fehlen von SIRT3 im Herzen ohne zusätzliche Druck- oder Volumenbelastung erst nach 24 Wochen zu einem in der Echokardiographie nachweisbaren kontraktile Defizit führt (Koentges et al. 2015). Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit schlussfolgern wir jedoch zunächst, dass ein Fehlen von SIRT5 unter physiologischen Bedingungen keinen negativen Einfluss auf die kontraktile Funktion des Herzens hat.

Die Auswirkungen des Fehlens von SIRT5 bei erhöhten energetischen Anforderungen an das Herz nach der TAC-Operation zeigten sich bereits in den ersten Wochen nach dem Eingriff. Die EF und FS als Parameter der Auswurfleistung des Herzens sanken bei den SIRT5<sup>(-/-)</sup>-Mäusen ab und waren in Woche 4 und Woche 12 jeweils signifikant niedriger als in der TAC-operierten Kontrollgruppe. Passend hierzu stiegen das endsystolische und enddiastolische Volumen bei Fehlen von SIRT5 nach TAC an. In Woche 10 war das endsystolische Volumen signifikant höher als bei den SIRT5<sup>(+/+)</sup>-TAC-operierten Mäusen. Auch Hershberger et al. beschreiben eine stärker eingeschränkte kardiale Funktion gemessen an der EF und FS im Falle eines SIRT5-*Knockouts* nach TAC-Operation (Hershberger et al. 2017). Wir schlussfolgern, dass das Fehlen von SIRT5 im Herzen die kardiale Auswurfleistung im Falle einer chronischen Druckbelastung reduziert.

In unseren Messungen konnte in den SIRT5-defizienten Herzen keine signifikante Zunahme der Hinterwand- oder Septumdicke nach TAC gemessen werden. Eine progressive Hypertrophie des Muskelgewebes als Reaktion auf die chronisch erhöhte Nachlast fand über den Zeitraum von 12 Wochen nicht erkennbar statt. Die SIRT5<sup>(+/+)</sup>-Mäuse reagierten hingegen mit einer Zunahme von Hinterwand- und Septumdicke auf die TAC-Operation. Passend hierzu war auch der Parameter h/r als Indikator für eine hypertrophische Verlaufsform in dieser Gruppe signifikant höher als bei Fehlen von SIRT5 nach TAC. Dies steht in Kontrast zu den Ergebnissen von Hershberger et al., die auch für die Gruppe der SIRT5<sup>(-/-)</sup>-Mäuse nach TAC-Operation die Entstehung einer konzentrischen Hypertrophie mit zunehmender Wanddicke beobachteten (Hershberger et al. 2017). Auch zahlreiche andere TAC-Studien beschreiben als initiale Reaktion auf die Erhöhung der kardialen Nachlast die Entstehung einer Hypertrophie

(Nakamura et al. 2001, Luo, Chen and Wang 2015, Zhou et al. 2015). Wir vermuten, dass das Fehlen von SIRT5 zur beschleunigten Entstehung einer dilatativen Kardiomyopathie führt, während es bei den TAC-operierten SIRT5<sup>(+/+)</sup>-Mäusen zu einer hypertrophischen Verlaufsform kommt (s. Abbildung 35, S. 81). Dies verhinderte eine adäquate Kompensation der erhöhten Nachlast bei den SIRT5<sup>(-/-)</sup>-TAC-operierten Mäusen, so dass bereits in Woche 4 eine signifikant geringere Ejektionsfraktion und der Anstieg von ESV und EDV im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beobachten waren.

Auch bezüglich des Überlebens nach TAC scheint sich das Fehlen von SIRT5 im Herzen negativ auszuwirken. So starben in dieser Gruppe mehr Mäuse zu einem früheren Zeitpunkt als in der Vergleichsgruppe. Alle frühzeitig verstorbenen Mäuse wiesen eine pathologisch niedrige Ejektionsfraktion kurz vor ihrem Tod auf, sodass eine dekompenzierte Herzinsuffizienz als Todesursache vermutet werden kann. Eine massiv erhöhte Mortalität, wie in der Arbeit von Hershberger et al. publiziert, zeigte sich in unserer Studie nicht (Hershberger et al. 2017). Dieser Unterschied könnte allerdings durch verschiedene Ausmaße der transversen Aortenkonstriktion erklärt werden, wobei in der Studie von Hershberger et al. nicht näher definiert wird, auf welchen Innendurchmesser die Aorta verengt wurde. Weiterhin könnte die im Vergleich zu dieser Arbeit stark erhöhte Mortalität, die in der Arbeit von Hershberger et al. beschrieben wird, auch auf bislang nicht untersuchte Pathologien in anderen Organsystemen zurückgeführt werden, die ein globaler *Knockout* von SIRT5 verursacht. Im Gegensatz dazu wurden in dieser Arbeit, wie bereits beschrieben, Mäuse verwendet, in denen SIRT5 kardiomyozytenspezifisch nicht exprimiert wurde. Dies unterstützt die These, dass die von uns gemessene erhöhte Mortalität in der Gruppe der SIRT5 KO TAC-Mäuse vor allem auf eine dekompenzierte Herzinsuffizienz in dieser Gruppe zurückzuführen ist. Somit kann geschlossen werden, dass das kardiomyozytenspezifische Fehlen von SIRT5 die Mortalität nach TAC-Operation aufgrund von kardialer Dekompensation erhöht.

Um die zelluläre Grundlage der makroskopisch beobachteten Veränderungen nach TAC-Operation zu analysieren, wurden histologische Gewebeuntersuchungen durchgeführt. Das Fehlen von SIRT5 führte im Herzen nach chronischer Druckbelastung zu einem erhöhten kollagenen Fibrosegehalt im Herzmuskel ohne, dass jedoch das Signifikanzniveau erreicht wurde. Es ist bereits bekannt, dass kardiales Remodeling als Folge von chronischer Druckbelastung zu einer Zunahme des Kollagengehalts im Herzmuskel und zu einer hierdurch insgesamt eingeschränkten Pumpleistung des Herzens führen kann (Mihl, Dassen and Kuipers

2008, Weng et al. 2014). So untersuchen viele Studien inwiefern Fibrose die Adaptation des Herzens an erhöhte Energieanforderungen beeinflussen kann. Skrbic et al. präsentieren Kollagen VII als einflussreichen Bestandteil der extrazellulären Matrix in Bezug auf die Entstehung einer Herzinsuffizienz (Skrbic et al. 2013). Kim et al. zeigten weiterhin, dass Veränderungen in der Kollagenstruktur des Herzmuskelgewebes in direktem Zusammenhang mit der Entstehung einer Herzinsuffizienz stehen können (Kim et al. 2000). Lombard et al. wiederum beschreiben, dass Sirtuine, vor allem SIRT3 Einfluss auf die Entstehung von Hypertrophie und Fibrose im energetisch belasteten Herzen haben (Lombard, Tishkoff and Bao 2011). Angesichts unserer Ergebnisse könnte eine Untersuchung des Zusammenspiels von SIRT5 und Bestandteilen der extrazellulären Matrix Aufschluss über den zugrunde liegenden Pathomechanismus liefern. Möglicherweise könnte SIRT5, ähnlich wie SIRT1, über zelluläre Signalwege Einfluss auf die Matrix-Metalloproteasen nehmen, die am Abbau des Kollagens beteiligt sind (Liu et al. 2017). Fällt eine hemmende Wirkung auf diese Proteasen durch SIRT5 im Falle des *Knockout* weg, käme es zu einer verstärkten Zunahme des Kollagengehalts im Herzen, was sich wie oben beschrieben potentiell negativ auf die kardiale Funktion auswirken kann. Weiterhin nimmt beispielsweise SIRT3 über den TGF- $\beta$ /Smad-3-Signalweg einen hemmenden Einfluss auf die kardiale Fibrose (Chen et al. 2015). Es könnte also untersucht werden, ob SIRT5 ein ähnlicher Einfluss nachgewiesen werden kann. Anhand der vorliegenden Ergebnisse liegt es nahe zu vermuten, dass eine Veränderung in der Kollagenstruktur des Herzen zu der Entstehung einer dilatativen Kardiomyopathie im SIRT5-defizienten Herzen im *pressure-overload*-Modell beiträgt.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Kardiomyozytengröße 12 Wochen nach der TAC-Operation signifikant stärker in der Gruppe der SIRT5<sup>(-/-)</sup>-Mäuse als in der Gruppe der SIRT5<sup>(+/+)</sup>-Mäuse zugenommen hatte (s. Abbildung 35, S. 81). Diese Beobachtung findet sich auch in anderen Arbeiten zum *pressure-overload*-Modell, ebenfalls in Zusammenhang mit einer verstärkten Fibrose und Apoptose der Kardiomyozyten (Ha et al. 2006, Beetz et al. 2016). Die Arbeitsgruppe um Vanessa van Empel zeigte auf, dass zahlreiche der Signalwege, die zu einer Hypertrophie der Kardiomyozyten führen auch eine Apoptose der Zellen zur Folge haben können (van Empel and De Windt 2004). Liu et al. stellen weiterhin eine möglicherweise protektive Funktion von SIRT5 in Bezug auf eine durch oxidativen Stress verursachte Apoptose der Kardiomyozyten vor (Liu et al. 2013). Somit bliebe noch zu differenzieren, ob es in den SIRT5-defizienten Herzen nach TAC-Operation zu einer verstärkten Apoptose der Kardiomyozyten kommt. Anhand dieser Ergebnisse kann dann ge-

schlussfolgert werden, inwiefern die morphologischen Veränderungen in den Kardiomyozyten im SIRT5-defizienten Herzen nach TAC-Operation zur Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie und der reduzierten kardialen Pumpfunktion beitragen.

Überraschenderweise fand sich auf mitochondrialer Ebene weder in den Sauerstoffmessungen, noch in der Messung der ATP-Syntheserate ein spezifischer Phänotyp für die Gruppe der SIRT5<sup>(-/-)</sup>-TAC-operierten Mäuse im Vergleich zu den Kontrollgruppen (s. Abbildung 35, S. 81). Es zeigte sich weiterhin kein Unterschied bezüglich der verschiedenen Substrate Glutamat/Malat und Palmitoylcarnitin/Malat. Zahlreiche Arbeiten unterstreichen hingegen die Rolle von Funktionsstörungen der Mitochondrien und oxidativem Stress in der Pathogenese einer eingeschränkten Herzfunktion (Sharov et al. 2000, Suematsu et al. 2003). Wie bereits beschrieben, sollte der mitochondriale Stoffwechsel mit zunehmend eingeschränkter kardialer Funktion stetig abnehmen (Dzeja et al. 2000, Bugger et al. 2016). Hershberger et al. stellen als Erklärungsansatz die Hypothese auf, dass es im SIRT5-defizienten Herzen durch eine verstärkte Succinylierung der an der oxidativen Phosphorylierung beteiligten Enzyme zu einer geringeren NADH-Oxidation und hierdurch eingeschränkter mitochondrialer Funktion kommt (Hershberger et al. 2017). Zhang et al. beschreiben, dass SIRT5 an Kardiolipin in der inneren Mitochondrienmatrix von Hepatozyten bindet und die Komplexe I und II als Targets für eine Desuccinylierung durch SIRT5 fungieren (Zhang et al. 2017). Es werden Einschränkungen in der Funktionsweise des mitochondrialen Elektronentransports und der Aktivität von Komplex II und der ATP-Synthase in der SIRT5-defizienten Leber beschrieben (Zhang et al. 2017). Anhand der vorliegenden Daten muss aber zum jetzigen Zeitpunkt geschlussfolgert werden, dass eine eingeschränkte mitochondriale Funktion nicht für die Entstehung der reduzierten Herzfunktion im SIRT5-defizienten Herzen nach TAC-Operation verantwortlich ist.

Ein möglicher Erklärungsansatz könnte sich mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Michael Schwarzer beschäftigen. Diese beschreibt Unterschiede in verschiedenen mitochondrialen Subtypen, die unterschiedlich stark mit einer Funktionseinschränkung auf eine chronische Druckbelastung reagieren (Schwarzer et al. 2013). So könnte es lohnenswert sein, die Zusammensetzung der Mitochondrien in den SIRT5<sup>(-/-)</sup>-Mäusen bezüglich dieser mitochondrialen Subtypen zu überprüfen. Schwarzer et al. beschreiben, dass der Subtyp *subsarcolemmal mitochondria* (SSM) in seiner Funktion resistenter gegenüber der chronischen Drucküberbelastung durch TAC bliebe, während der Subtyp *interfibrillar mitochondria* (IFM) deutlich

anfälliger einer solchen Belastung gegenüber sei (Schwarzer et al. 2013). Je nach Zusammensetzung der mitochondrialen Subtypen könnte so eine konservierte mitochondriale Funktion nach TAC erklärt werden. Unsere Beobachtungen sollten auch in Form einer Beschreibung von SIRT5 im Zellmodell überprüft werden, da die Untersuchung der mitochondrialen Funktion im gesamten Organ dazu führen kann, dass das Ausmaß der Regulationen an den einzelnen Komponenten der Atmungskette unterschätzt wird (Zhang et al. 2017).

In dieser Arbeit zeigten sich weiterhin überraschende Ergebnisse bezüglich der posttranslationalen Succinylierung und Malonylierung in den TAC-operierten SIRT5<sup>(-/-)</sup>-Mäusen. Zahlreiche Arbeiten beschreiben die Wirkung von SIRT5 als wichtige Desuccinylase und Demalonylase in den Mitochondrien (Nakagawa et al. 2009, Nakamura et al. 2012, Yu et al. 2013). Somit erwarteten wir, nach *Knockout* von SIRT5 einen hohen Malonylierungs- und Succinylierungsgrad in den SIRT5-defizienten Herzen. Überraschenderweise konnte aber in dieser Arbeit dargestellt werden, dass es auch nach dem kardiomyozytenspezifischen *Knockout* von SIRT5 nach TAC weiterhin zu einer Desuccinylierung und Demalonylierung im Herzen kommt (s. Abbildung 35, S. 81). Wir vermuten, dass die chronische Druckbelastung nach der TAC-Operation über einen bislang unbekanntem Mechanismus dazu führt, dass die Desuccinylierungs- und Demalonylierungsfunktion von SIRT5 von einem anderen Enzym übernommen wird und so auch möglicherweise die mitochondriale Funktion erhalten bleibt.

Die fehlende Desuccinylierungs- und Demalonylierungsfunktion von SIRT5 kam hingegen in der Gruppe der SIRT5<sup>(-/-)</sup>-Schein-operierten Mäuse zum Ausdruck (s. Abbildung 35, S. 81). In diesem Zusammenhang bleibt auch zu diskutieren, inwiefern der *Knockout* von SIRT5 ohne chronische Druckbelastung zu einer ineffizienten mitochondrialen ATP-Synthese führt. So zeigte sich in der Gruppe der Schein-operierten SIRT5<sup>(-/-)</sup>-Mäuse ein erhöhter Sauerstoffverbrauch, sowie eine erhöhte ATP-Synthese im Vergleich zu der Schein-operierten Kontrollgruppe ohne das jedoch Signifikanzniveau erreicht wurde. Der Parameter ATP/O ist allerdings in dieser Gruppe reduziert, was darauf hinweist, dass mehr Sauerstoff verbraucht wird, als für die gemessene ATP-Synthese nötig wäre. Es ist überraschend, dass sich derartige Veränderungen nicht unmittelbar in einer Reduktion der kardialen Funktion auswirken. Die gemessenen Echoparameter der SIRT5<sup>(-/-)</sup>-Schein-operierten Mäuse unterschieden sich nicht signifikant von denen der SIRT5<sup>(+/+)</sup>-Schein-operierten Mäuse.

Weitere Erklärungsansätze für unsere Ergebnisse bezüglich der TAC-operierten SIRT5<sup>(-/-)</sup>-Mäuse bieten beispielsweise auch Dai et al. mit der Beobachtung, dass die antioxidativen Peptide SS31 und SS20 die kardialen Mitochondrien vor einem Funktionsverlust nach TAC schützen können (Dai et al. 2013). SS31 kann an Kardiolipin binden, an dem wie bereits beschrieben auch eine Bindung von SIRT5 möglich ist (Dai et al. 2013). So wäre es denkbar, dass es durch eine Aktivierung der Peptide durch SIRT5 zu einem antioxidativen Schutz in den Mitochondrien kommt, was auch nach TAC eine intakte Mitochondrienfunktion erklären könnte. Gehen wir davon aus, dass diese Aktivierung mittels Desuccinylierung oder Demalonylierung erreicht wird, würde diese auch nach dem *Knockout* von SIRT5 ablaufen, da sich die Desuccinylierungs- und Demalonylierungsraten wie oben beschrieben in beiden TAC-Gruppen vergleichbar hoch darstellten.

In weiterführenden Experimenten müsste also zunächst untersucht werden, ob es einen Mechanismus gibt, der zu einer Desuccinylierung und Demalonylierung trotz Fehlen von SIRT5 führt und wie genau dieser aussieht. So beschrieben beispielsweise Du et al. eine Demalonylierung zahlreicher Stoffwechsellzyme, die auch als Targets von SIRT5 gehandelt werden, in Hepatozyten diabetischer Mäuse (Du et al. 2015). Weiterhin böte sich die Untersuchung der Aktivität von SIRT3 und SIRT4 im SIRT5-defizienten Herzen nach TAC an. Hershberger et al. vermuten in gleichem Zusammenhang, dass es unter den Bedingungen einer chronischen Druckbelastung im Herzen zu Veränderungen im Succinyl-CoA-Metabolismus kommt, die eine intakte mitochondriale Funktion ebenfalls erklären könnten (Hershberger et al. 2017).

Weiterhin muss analysiert werden, welche mitochondrialen Enzyme im SIRT5-defizienten Herzen in ihrer Funktion beeinflusst sind. So beschreiben Sadhukhan et al. 124 Proteine, die potenziell von SIRT5 reguliert werden (Sadhukhan et al. 2016), wobei Hershberger et al. diese Zahl in ihrer Arbeit noch auf 776 Proteine erhöhen konnten (Hershberger et al. 2017). Es bleibt zu überprüfen, welche Stoffwechselwege in diesem Zusammenhang eingeschränkt sind, ob die Glykolyse, die Glukoneogenese, der Harnstoffzyklus, die Ketogenese oder die  $\beta$ -Oxidation im SIRT5-defizienten Herzen vornehmlich reduziert ablaufen. In SIRT5<sup>(-/-)</sup>-Hepatozyten wurde von Rardin et al. eine eingeschränkte  $\beta$ -Oxidation und eine globale Hypersuccinylierung der beteiligten Proteine festgestellt (Rardin et al. 2013). Auch Hershberger et al. betonen die Bedeutung der eingeschränkten Fettsäureoxidation im SIRT5-defizienten Herzen nach TAC-Operation, was sich in der Ansammlung langkettiger Fettsäuren im Mito-

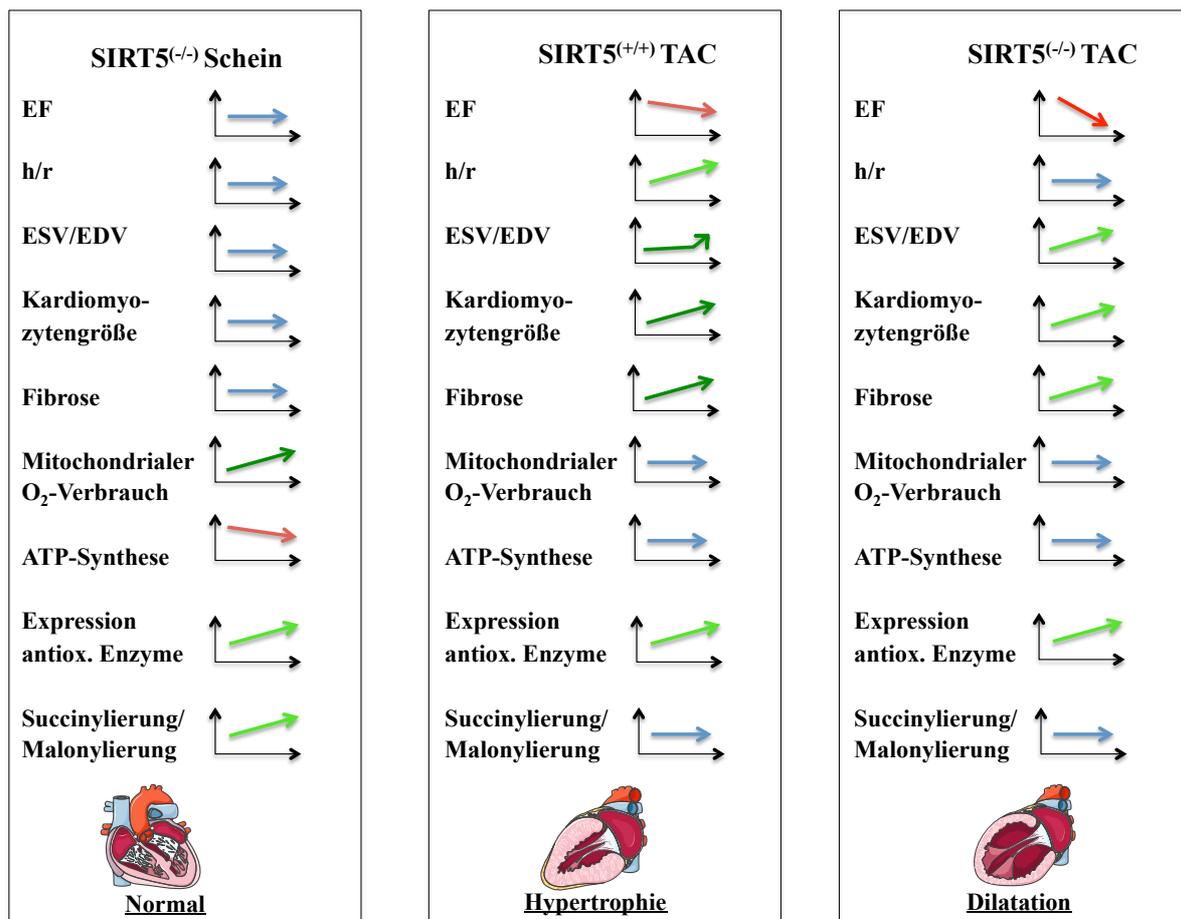
chondrium äußere (Hershberger et al. 2017). Nishida et al. wiederum definieren die Glykolyse und die Glukoneogenese als die von SIRT5 am stärksten beeinflussten Stoffwechselwege (Nishida et al. 2015). So könnten die Aldolase B oder die GAPDH, die VLCAD oder die ECHA interessante Targets für weitergehende Untersuchungen sein (Nishida et al. 2015).

Die chronische Druckbelastung in Form von TAC in der Gruppe der SIRT5<sup>(+/+)</sup>-Mäuse führte zu einer signifikant stärkeren Expression des Proteins SIRT5. Wie bereits einleitend beschrieben, könnte eine verstärkte Expression von PGC1  $\alpha$ , PPAR  $\alpha$ - und ERR  $\alpha$ -abhängig, zu einer erhöhten Expression von SIRT5 führen. Dies würde im Falle einer Energiemangelsituation durchaus Sinn machen, haben die TAC-operierten SIRT5<sup>(+/+)</sup>-Mäuse doch eine bessere kardiale Funktion als die TAC-operierte SIRT5<sup>(-/-)</sup>-Mäuse. In Kontrast dazu stehen die Ergebnisse der Arbeitsgruppen um Ventura-Clapier und Buler, die eine erniedrigte Expression von PGC1  $\alpha$ - und NRF-2 im *pressure-overload*-Modell beschreiben (Ventura-Clapier et al. 2004, Buler et al. 2014). Weiterhin kommt es im energetisch belasteten Herzen zu erniedrigten NAD<sup>+</sup>-Spiegeln und einer Aktivierung der AMPK, was ebenfalls eine reduzierte SIRT5-Expression zur Folge haben sollte (Nakagawa et al. 2009, Nakamura et al. 2012). So bleibt zu untersuchen über welchen Signalweg es im energetisch beanspruchten Herzen zu einer verstärkten SIRT5-Expression kommt und inwiefern dies mit der Entstehung einer hypertrophen Kardiomyopathie in Zusammenhang steht.

Nach dem *Knockout* von SIRT5 zeigte sich eine verstärkte Expression wichtiger antioxidativer Enzyme. So kommt es in den SIRT5-defizienten Herzen ohne chronische Druckbelastung zu einer signifikant stärkeren Expression von Thioredoxin 1 (Trxn1), Peroxiredoxin 3 (PRDX3), Glutathion-Peroxidase 1 (GPX1), Glutathion-Peroxidase 4 (GPX4) und dem *Voltage-Dependent Anion-Selective Channel Protein 1* (VDAC1) als bei der SIRT5<sup>(+/+)</sup>-Kontrollgruppe. Diese verstärkte Expression der antioxidativen Enzyme kann als eine Reaktion auf erhöhten oxidativen Stress nach dem *Knockout* von SIRT5 gedeutet werden. Dies wird gestützt durch die Erkenntnis, dass SIRT5 mittels Desuccinylierung der Superoxid-Dismutase 1 eine protektive Wirkung gegenüber ROS besitzt (Lin et al. 2013). Auch in der Arbeit von Liu et al. konnte nachgewiesen werden, dass eine SIRT5-Überexpression vor einer durch oxidativen Stress ausgelösten Apoptose schützen kann (Liu et al. 2013). Erstaunlicherweise zeigte sich die antioxidative Funktion der verstärkt exprimierten Enzyme allerdings nicht in Form einer reduzierten Konzentration an 4-Hydroxynonenal. Möglicherweise sorgt die Überexpression der benannten Enzyme somit dafür, dass trotz Erhöhung des oxida-

tiven Stresses im *SIRT5-Knockout*, die Konzentration der oxidativ schädlichen Metaboliten insgesamt konstant gehalten werden kann.

Bei beiden Genotypen war die Expression der benannten Enzyme nach TAC zusätzlich signifikant höher als in den jeweils Schein-operierten Kontrollgruppen. Die Expression der Glutathion-Peroxidase 1 war als einziges der untersuchten Enzyme nach *Knockout* von SIRT5 und TAC-Operation zusätzlich signifikant erhöht im Vergleich zu den TAC-operierten  $SIRT5^{(+/+)}$ -Mäusen. Einige Arbeitsgruppen haben bereits eine vermehrte kardiale Belastung durch oxidativen Stress im *pressure-overload*-Modell beschrieben (Ha et al. 2006, Muthuramu et al. 2015, Ghule et al. 2015). Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe sprechen weiterhin dafür, dass das Fehlen von SIRT5 nach Ischämie/Reperfusion zu vermehrtem oxidativem Stress und daraus resultierendem reduziertem kardialen Output führt. Auch die Arbeitsgruppe um Jennifer Boylston beschreibt einen Einfluss von SIRT5 auf die Entstehung von oxidativem Stress nach Ischämie/Reperfusion (Boylston et al. 2015). Wie bereits oben beschrieben, beobachteten wir eine verstärkte Expression von SIRT5 nach TAC in den  $SIRT5^{(+/+)}$ -Mäusen. Dies könnte ebenfalls damit zusammenhängen, dass eine verstärkte Expression von SIRT5 im energetisch beanspruchten Herzen vor erhöhtem oxidativem Stress schützen soll. Über eine verstärkte Expression der antioxidativen Enzyme könnten so die Auswirkungen des oxidativen Stresses reduziert werden. Um genau zu definieren, inwiefern es im SIRT5-defizienten Herzen zu einer erhöhten Belastung durch oxidativen Stress kommt, wäre jedoch die Durchführung weitere Experimente notwendig. Beispielsweise könnte die Bestimmung der Konzentration an  $H_2O_2$  in  $SIRT5^{(-/-)}$ -Herzen mit und ohne chronischer Druckbelastung mittels eines Amplex Red Assays sinnvoll sein. So bleibt noch zu klären, inwieweit die Ursache für die reduzierte kardiale Funktion nach TAC-Operation im SIRT5-defizienten Herzen mit einer vermehrten Entstehung von oxidativem Stress begründet werden kann.



**Abbildung 35:** Übersicht über die beobachteten Phänotypen bezüglich der untersuchten Parameter Herzfunktion *in vivo*, histologische Veränderungen, mitochondriale Funktion, oxidativer Stress, Succinylierung und Malonylierung.

Letztendlich zielt die genauere Charakterisierung des Enzyms SIRT5 im Herzen auf die Nutzung des Proteins als therapeutisches Target in der Behandlung der Herzinsuffizienz ab. Mit den vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit erscheint die Verstärkung der SIRT5-Aktivität im Herzen als potenziell protektive Maßnahme gegen die Herzinsuffizienz. Dies bleibt im SIRT5-Überexpressionsmodell zu beweisen. Weiterhin bleibt ein Zusammenspiel von SIRT5 mit den transkriptionalen Coaktivatoren PGC1- $\alpha$  und AMPK zu untersuchen, die als vielversprechende Targets in der Therapie der Herzinsuffizienz gehandelt werden (Bayeva et al. 2013). Liu et al. suggerieren weiter, dass SIRT5 durch die Regulation des Apoptosefaktors Bcl-Xl als therapeutisches Target fungieren kann (Liu et al. 2013).

Es bleibt zu prüfen, ob die Funktion von SIRT5 auch durch das Polyphenol Resveratrol aktiviert und durch Kalorienrestriktion beeinflusst werden kann, wie es im Falle von anderen

Sirtuinen beobachtet wurde (Lakshminarasimhan et al. 2013). So führt beispielsweise die Aktivierung von SIRT3 mit Resveratrol zur Reduktion kardialer Fibrose (Chen et al. 2015). Auch das Polyphenol Honokiol ist mit einer aktivierenden Funktion für SIRT3 beschrieben und könnte auf eine mögliche Interaktion mit SIRT5 überprüft werden (Pillai et al. 2015). In Zusammenhang mit der Untersuchung von oxidativem Stress in der Herzinsuffizienz bleibt auch zu überprüfen, inwiefern SIRT5 ähnlich wie SIRT1 und SIRT3 auf die Beeinflussung des mitochondrialen NAD-Angebots reagiert (Pillai et al. 2010).

Angesichts der bestehenden Bedeutung kardiovaskulärer Pathologien in der heutigen Zeit erscheint die weiterführende Exploration der Bedeutung und Funktion der Sirtuine im kardialen Stoffwechsel besonders erfolgversprechend. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, welche Auswirkungen ein Fehlen von SIRT5 in der Entstehung der Herzinsuffizienz hat. Das Herz scheint in seinen Adaptationsmechanismen an einen erhöhten Energiebedarf nachhaltig gestört, was in einer dilatativen Kardiomyopathie mit eingeschränkter kardialer Auswurfleistung resultiert. Der zugrunde liegende Regulationsmechanismus rückt somit als potenzieller Angriffspunkt in der Therapie der Herzinsuffizienz zunehmend ins Interesse weitergehender Forschung.

## 7 Zusammenfassung

Das Herz ist mittels verschiedener Anpassungsmechanismen bis zu einem gewissen Punkt in der Lage, den Körper auch unter erhöhten energetischen Anforderungen ausreichend mit Blut und Sauerstoff zu versorgen. Sind diese Anpassungsmechanismen eingeschränkt, kann es zu pathologischen Remodeling-Prozessen, einer Einschränkung der kardialen Funktion und zur Herzinsuffizienz kommen. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern SIRT5 als eine NAD<sup>+</sup>-abhängige Desuccinylase und Demalonylase, diese kardialen Anpassungsmechanismen bei einer chronischen Drucküberbelastung beeinflusst. Diese Druckbelastung wurde mit einer transversen Aortenkonstriktion herbeigeführt, mittels Echokardiographie konnte *in vivo* über 12 Wochen die Entwicklung der kardialen Funktion dokumentiert werden. Ohne energetische Belastung führt der kardiomyozytenspezifischen Knockout zu keiner Einschränkung der kardialen Funktion und keinen histologischen Auffälligkeiten. Die chronische Druckbelastung führt bei Vorhandensein von SIRT5 im Herzen zur Entstehung einer kardialen Hypertrophie, wodurch die kardiale Funktion jedoch nur leicht eingeschränkt wird. Eine erhöhte Expression von SIRT5 nach TAC kann als mögliche, protektive Reaktion auf verstärkten oxidativen Stress nach TAC gesehen werden. Gleichzeitig sind zahlreiche antioxidative Enzyme in ihrer Expression verstärkt. Das Fehlen von SIRT5 bei chronisch erhöhter Druckbelastung führt zu einer Abnahme der kardialen Auswurfleistung und der Entstehung einer dilatativen Kardiomyopathie. Die Mortalität nach TAC ist erhöht. Es kommt zu einer stärkeren Zunahme der Kardiomyozytengröße, die Zunahme der interstitiellen Fibrose war hingegen nicht statistisch signifikant. Überraschenderweise bleibt die mitochondriale Funktion bei beiden Genotypen intakt und auch die Desuccinylierung und Demalonylierung in beiden TAC-operierten Gruppen erhalten. Wir schlussfolgern, dass das Fehlen von SIRT5 bei chronischer Drucküberbelastung die energetischen Anpassungsmechanismen negativ beeinträchtigt und die kardiale Funktion verschlechtert. Der zugrunde liegende Pathomechanismus müssen Gegenstand weiterer Forschung sein.

## 8 Literaturverzeichnis

- Bai, Z., Y. Ye, B. Liang, F. Xu, H. Zhang, Y. Zhang, J. Peng, D. Shen, Z. Cui, Z. Zhang & S. Wang (2011) Proteomics-based identification of a group of apoptosis-related proteins and biomarkers in gastric cancer. *Int J Oncol*, 38, 375-83.
- Baur, J. A., K. J. Pearson, N. L. Price, H. A. Jamieson, C. Lerin, A. Kalra, V. V. Prabhu, J. S. Allard, G. Lopez-Lluch, K. Lewis, P. J. Pistell, S. Poosala, K. G. Becker, O. Boss, D. Gwinn, M. Wang, S. Ramaswamy, K. W. Fishbein, R. G. Spencer, E. G. Lakatta, D. Le Couteur, R. J. Shaw, P. Navas, P. Puigserver, D. K. Ingram, R. de Cabo & D. A. Sinclair (2006) Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, 444, 337-42.
- Bayeva, M., M. Gheorghide & H. Ardehali (2013) Mitochondria as a therapeutic target in heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 61, 599-610.
- Beetz, N., C. Rommel, T. Schnick, E. Neumann, A. Lothar, E. B. Monroy-Ordonez, M. Zeeb, S. Preissl, R. Gilsbach, A. Melchior-Becker, B. Rylski, M. Stoll, L. Schaefer, F. Beyersdorf, B. Stiller & L. Hein (2016) Ablation of biglycan attenuates cardiac hypertrophy and fibrosis after left ventricular pressure overload. *J Mol Cell Cardiol*, 101, 145-155.
- Bellizzi, D., G. Rose, P. Cavalcante, G. Covello, S. Dato, F. De Rango, V. Greco, M. Maggiolini, E. Feraco, V. Mari, C. Franceschi, G. Passarino & G. De Benedictis (2005) A novel VNTR enhancer within the SIRT3 gene, a human homologue of SIR2, is associated with survival at oldest ages. *Genomics*, 85, 258-63.
- Boylston, J. A., J. Sun, Y. Chen, M. Gucek, M. N. Sack & E. Murphy (2015) Characterization of the cardiac succinylome and its role in ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*, 88, 73-81.
- Bugger, H., M. Schwarzer, D. Chen, A. Schrepper, P. A. Amorim, M. Schoepe, T. D. Nguyen, F. W. Mohr, O. Khalimonchuk, B. C. Weimer & T. Doenst (2010) Proteomic remodelling of mitochondrial oxidative pathways in pressure overload-induced heart failure. *Cardiovasc Res*, 85, 376-84.
- Bugger, H., C. N. Witt & C. Bode (2016) Mitochondrial sirtuins in the heart. *Heart Fail Rev*, 21, 519-28.
- Buler, M., S. M. Aatsinki, V. Izzi, J. Uusimaa & J. Hakkola (2014) SIRT5 is under the control of PGC-1alpha and AMPK and is involved in regulation of mitochondrial energy metabolism. *FASEB J*, 28, 3225-37.
- Campbell, F. M., R. Kozak, A. Wagner, J. Y. Altarejos, J. R. Dyck, D. D. Belke, D. L. Severson, D. P. Kelly & G. D. Lopaschuk (2002) A role for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the control of cardiac malonyl-CoA levels: reduced fatty acid oxidation rates and increased glucose oxidation rates in the hearts of mice lacking PPARalpha are associated with higher concentrations of malonyl-CoA and reduced expression of malonyl-CoA decarboxylase. *J Biol Chem*, 277, 4098-103.
- Casademont, J. & O. Miro (2002) Electron transport chain defects in heart failure. *Heart Fail Rev*, 7, 131-9.
- Chance, B. & G. R. Williams (1956) The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem*, 17, 65-134.
- Chandler, M. P., J. Kerner, H. Huang, E. Vazquez, A. Reszko, W. Z. Martini, C. L. Hoppel, M. Imai, S. Rastogi, H. N. Sabbah & W. C. Stanley (2004) Moderate severity heart failure does not involve a downregulation of myocardial fatty acid oxidation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287, H1538-43.

- Chen, T., J. Li, J. Liu, N. Li, S. Wang, H. Liu, M. Zeng, Y. Zhang & P. Bu (2015) Activation of SIRT3 by resveratrol ameliorates cardiac fibrosis and improves cardiac function via the TGF-beta/Smad3 pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 308, H424-34.
- Clark, L. C., Jr., R. Wolf, D. Granger & Z. Taylor (1953) Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. *J Appl Physiol*, 6, 189-93.
- Dai, D. F., E. J. Hsieh, T. Chen, L. G. Menendez, N. B. Basisty, L. Tsai, R. P. Beyer, D. A. Crispin, N. J. Shulman, H. H. Szeto, R. Tian, M. J. MacCoss & P. S. Rabinovitch (2013) Global proteomics and pathway analysis of pressure-overload-induced heart failure and its attenuation by mitochondrial-targeted peptides. *Circ Heart Fail*, 6, 1067-76.
- Du, J., Zhou, Y., Su, X., Yu, J.J., Khan, S., Jiang, H., Kim, J., Woo, J., Kim, J.H., Choi, B.H., He, B., Chen, W., Zhang, S., Cerione, R.A., Auwerx, J., Hao Q., and Lin H. (2011) Sirt5 Is an NAD-Dependent Protein Lysine Demalonylase and Desuccinylase. *Science*.
- Du, Y., T. Cai, T. Li, P. Xue, B. Zhou, X. He, P. Wei, P. Liu, F. Yang & T. Wei (2015) Lysine malonylation is elevated in type 2 diabetic mouse models and enriched in metabolic associated proteins. *Mol Cell Proteomics*, 14, 227-36.
- Dzeja, P. P., M. M. Redfield, J. C. Burnett & A. Terzic (2000) Failing energetics in failing hearts. *Curr Cardiol Rep*, 2, 212-7.
- Estabrook, R. W. (1967) Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios. *Methods in Enzymology*, 10, 41-47.
- Frye, R. A. (1999) Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 260, 273-9.
- Fu, Q. Q., L. Wei, J. Sierra, J. Z. Cheng, M. T. Moreno-Flores, H. You & H. R. Yu (2016) Olfactory Ensheathing Cell-Conditioned Medium Reverts Abeta25-35-Induced Oxidative Damage in SH-SY5Y Cells by Modulating the Mitochondria-Mediated Apoptotic Pathway. *Cell Mol Neurobiol*.
- Gao, S., D. Ho, D. E. Vatner & S. F. Vatner (2011) Echocardiography in Mice. *Curr Protoc Mouse Biol*, 1, 71-83.
- Ghule, A. E., A. D. Kandhare, S. S. Jadhav, A. A. Zanwar & S. L. Bodhankar (2015) Omega-3-fatty acid adds to the protective effect of flax lignan concentrate in pressure overload-induced myocardial hypertrophy in rats via modulation of oxidative stress and apoptosis. *Int Immunopharmacol*, 28, 751-63.
- Giorgianni, F., M. Usman Khan, K. T. Weber, I. C. Gerling & S. Beranova-Giorgianni (2014) Phosphoproteome mapping of cardiomyocyte mitochondria in a rat model of heart failure. *Mol Cell Biochem*, 389, 159-67.
- Grillon, J. M., K. R. Johnson, K. Kotlo & R. S. Danziger (2012) Non-histone lysine acetylated proteins in heart failure. *Biochim Biophys Acta*, 1822, 607-14.
- Gulick, T., S. Cresci, T. Caira, D. D. Moore & D. P. Kelly (1994) The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 11012-6.
- Guzman Montesana, G., A. L. Baez, M. S. Lo Presti, R. Dominguez, R. Cordoba, C. Bazan, M. Strauss, R. Fretes, H. W. Rivarola & P. Paglini-Oliva (2014) Functional and structural alterations of cardiac and skeletal muscle mitochondria in heart failure patients. *Arch Med Res*, 45, 237-46.
- Ha, T., F. Hua, Y. Li, J. Ma, X. Gao, J. Kelley, A. Zhao, G. E. Haddad, D. L. Williams, I. W. Browder, R. L. Kao & C. Li (2006) Blockade of MyD88 attenuates cardiac hypertrophy and decreases cardiac myocyte apoptosis in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290, H985-94.

- Haigis, M. C. & L. P. Guarente (2006) Mammalian sirtuins--emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev*, 20, 2913-21.
- Hansson, A., N. Hance, E. Dufour, A. Rantanen, K. Hultenby, D. A. Clayton, R. Wibom & N. G. Larsson (2004) A switch in metabolism precedes increased mitochondrial biogenesis in respiratory chain-deficient mouse hearts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 3136-41.
- Heilbronn, L. K. & E. Ravussin (2003) Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans. *Am J Clin Nutr*, 78, 361-9.
- Hershberger, K. A., D. M. Abraham, A. S. Martin, L. Mao, J. Liu, H. Gu, J. W. Locasale & M. D. Hirschey (2017) Sirtuin 5 is required for mouse survival in response to cardiac pressure overload. *J Biol Chem*.
- Huss, J. M. & D. P. Kelly (2004) Nuclear receptor signaling and cardiac energetics. *Circ Res*, 95, 568-78.
- Huss, J. M., I. P. Torra, B. Staels, V. Giguere & D. P. Kelly (2004) Estrogen-related receptor alpha directs peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling in the transcriptional control of energy metabolism in cardiac and skeletal muscle. *Mol Cell Biol*, 24, 9079-91.
- Imai, S., C. M. Armstrong, M. Kaerberlein & L. Guarente (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*, 403, 795-800.
- Ingwall, J. S. (2007) On substrate selection for ATP synthesis in the failing human myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293, H3225-6.
- Ingwall, J. S. & R. G. Weiss (2004) Is the failing heart energy starved? On using chemical energy to support cardiac function. *Circ Res*, 95, 135-45.
- Jastroch, M., A. S. Divakaruni, S. Mookerjee, J. R. Treberg & M. D. Brand (2010) Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays Biochem*, 47, 53-67.
- Kaerberlein, M., M. McVey & L. Guarente (1999) The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev*, 13, 2570-80.
- Karamanlidis, G., C. F. Lee, L. Garcia-Menendez, S. C. Kolwicz, Jr., W. Suthammarak, G. Gong, M. M. Sedensky, P. G. Morgan, W. Wang & R. Tian (2013) Mitochondrial complex I deficiency increases protein acetylation and accelerates heart failure. *Cell Metab*, 18, 239-50.
- Kim, H. E., S. S. Dalal, E. Young, M. J. Legato, M. L. Weisfeldt & J. D'Armiento (2000) Disruption of the myocardial extracellular matrix leads to cardiac dysfunction. *J Clin Invest*, 106, 857-66.
- Kim, S. C., R. Sprung, Y. Chen, Y. Xu, H. Ball, J. Pei, T. Cheng, Y. Kho, H. Xiao, L. Xiao, N. V. Grishin, M. White, X. J. Yang & Y. Zhao (2006) Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey. *Mol Cell*, 23, 607-18.
- Koentges, C., C. Bode & H. Bugger (2016a) SIRT3 in Cardiac Physiology and Disease. *Front Cardiovasc Med*, 3, 38.
- Koentges, C., K. Pfeil, M. Meyer-Steenbuck, A. Lothar, M. M. Hoffmann, K. E. Odening, L. Hein, C. Bode & H. Bugger (2016b) Preserved recovery of cardiac function following ischemia-reperfusion in mice lacking SIRT3. *Can J Physiol Pharmacol*, 94, 72-80.
- Koentges, C., K. Pfeil, T. Schnick, S. Wiese, R. Dahlbock, M. C. Cimolai, M. Meyer-Steenbuck, K. Cenkerova, M. M. Hoffmann, C. Jaeger, K. E. Odening, B. Kammerer, L. Hein, C. Bode & H. Bugger (2015) SIRT3 deficiency impairs mitochondrial and contractile function in the heart. *Basic Res Cardiol*, 110, 36.

- Lakshminarasimhan, M., U. Curth, S. Moniot, S. Mosalaganti, S. Raunser & C. Steegborn (2013) Molecular architecture of the human protein deacetylase Sirt1 and its regulation by AROS and resveratrol. *Biosci Rep*, 33.
- Landry, J., A. Sutton, S. T. Tafrov, R. C. Heller, J. Stebbins, L. Pillus & R. Sternglanz (2000) The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 5807-11.
- Lauritzen, K. H., L. Kleppa, J. M. Aronsen, L. Eide, H. Carlsen, O. P. Haugen, I. Sjaastad, A. Klungland, L. J. Rasmussen, H. Attramadal, J. Storm-Mathisen & L. H. Bergersen (2015) Impaired dynamics and function of mitochondria caused by mtDNA toxicity leads to heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 309, H434-49.
- Lehman, J. J., P. M. Barger, A. Kovacs, J. E. Saffitz, D. M. Medeiros & D. P. Kelly (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest*, 106, 847-56.
- Lei, B., V. Lionetti, M. E. Young, M. P. Chandler, C. d'Agostino, E. Kang, M. Altarejos, K. Matsuo, T. H. Hintze, W. C. Stanley & F. A. Recchia (2004) Paradoxical downregulation of the glucose oxidation pathway despite enhanced flux in severe heart failure. *J Mol Cell Cardiol*, 36, 567-76.
- Lesnefsky, E. J., S. Moghaddas, B. Tandler, J. Kerner & C. L. Hoppel (2001) Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia--reperfusion, aging, and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*, 33, 1065-89.
- Liao, Y., F. Ishikura, S. Beppu, M. Asakura, S. Takashima, H. Asanuma, S. Sanada, J. Kim, H. Ogita, T. Kuzuya, K. Node, M. Kitakaze & M. Hori (2002) Echocardiographic assessment of LV hypertrophy and function in aortic-banded mice: necropsy validation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 282, H1703-8.
- Lin, Z. F., H. B. Xu, J. Y. Wang, Q. Lin, Z. Ruan, F. B. Liu, W. Jin, H. H. Huang & X. Chen (2013) SIRT5 desuccinylates and activates SOD1 to eliminate ROS. *Biochem Biophys Res Commun*, 441, 191-5.
- Liu, B., W. Che, C. Zheng, W. Liu, J. Wen, H. Fu, K. Tang, J. Zhang & Y. Xu (2013) SIRT5: a safeguard against oxidative stress-induced apoptosis in cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem*, 32, 1050-9.
- Liu, S., H. Yang, B. Hu & M. Zhang (2017) Sirt1 regulates apoptosis and extracellular matrix degradation in resveratrol-treated osteoarthritis chondrocytes via the Wnt/beta-catenin signaling pathways. *Exp Ther Med*, 14, 5057-5062.
- Lombard, D. B., D. X. Tishkoff & J. Bao (2011) Mitochondrial sirtuins in the regulation of mitochondrial activity and metabolic adaptation. *Handb Exp Pharmacol*, 206, 163-88.
- Luo, T., B. Chen & X. Wang (2015) 4-PBA prevents pressure overload-induced myocardial hypertrophy and interstitial fibrosis by attenuating endoplasmic reticulum stress. *Chem Biol Interact*, 242, 99-106.
- Maniatis, T. & B. Tasic (2002) Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. *Nature*, 418, 236-43.
- Matsushima, S. & J. Sadoshima (2015) The role of sirtuins in cardiac disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 309, H1375-89.
- Matsushita, N., R. Yonashiro, Y. Ogata, A. Sugiura, S. Nagashima, T. Fukuda, R. Inatome & S. Yanagi (2011) Distinct regulation of mitochondrial localization and stability of two human Sirt5 isoforms. *Genes Cells*, 16, 190-202.
- Michishita, E., J. Y. Park, J. M. Burneskis, J. C. Barrett & I. Horikawa (2005) Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol Biol Cell*, 16, 4623-35.
- Mihl, C., W. R. Dassen & H. Kuipers (2008) Cardiac remodelling: concentric versus eccentric hypertrophy in strength and endurance athletes. *Neth Heart J*, 16, 129-33.

- Mosterd, A. & A. W. Hoes (2007) Clinical epidemiology of heart failure. *Heart*, 93, 1137-46.
- Muthuramu, I., N. Singh, R. Amin, E. Nefyodova, M. Debasse, I. Van Horenbeeck, F. Jacobs & B. De Geest (2015) Selective homocysteine-lowering gene transfer attenuates pressure overload-induced cardiomyopathy via reduced oxidative stress. *J Mol Med (Berl)*, 93, 609-18.
- Nakagawa, T., D. J. Lomb, M. C. Haigis & L. Guarente (2009) SIRT5 Deacetylates carbamoyl phosphate synthetase 1 and regulates the urea cycle. *Cell*, 137, 560-70.
- Nakamura, A., D. G. Rokosh, M. Paccanaro, R. R. Yee, P. C. Simpson, W. Grossman & E. Foster (2001) LV systolic performance improves with development of hypertrophy after transverse aortic constriction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 281, H1104-12.
- Nakamura, Y., M. Ogura, K. Ogura, D. Tanaka & N. Inagaki (2012) SIRT5 deacetylates and activates urate oxidase in liver mitochondria of mice. *FEBS Lett*, 586, 4076-81.
- Neubauer, S. (2007) The failing heart--an engine out of fuel. *N Engl J Med*, 356, 1140-51.
- Nishida, Y., M. J. Rardin, C. Carrico, W. He, A. K. Sahu, P. Gut, R. Najjar, M. Fitch, M. Hellerstein, B. W. Gibson & E. Verdin (2015) SIRT5 Regulates both Cytosolic and Mitochondrial Protein Malonylation with Glycolysis as a Major Target. *Mol Cell*, 59, 321-32.
- Osorio, J. C., W. C. Stanley, A. Linke, M. Castellari, Q. N. Diep, A. R. Panchal, T. H. Hintze, G. D. Lopaschuk & F. A. Recchia (2002) Impaired myocardial fatty acid oxidation and reduced protein expression of retinoid X receptor-alpha in pacing-induced heart failure. *Circulation*, 106, 606-12.
- Park, J., Y. Chen, D. X. Tishkoff, C. Peng, M. Tan, L. Dai, Z. Xie, Y. Zhang, B. M. Zwaans, M. E. Skinner, D. B. Lombard & Y. Zhao (2013) SIRT5-mediated lysine desuccinylation impacts diverse metabolic pathways. *Mol Cell*, 50, 919-30.
- Pillai, V. B., S. Samant, N. R. Sundaresan, H. Raghuraman, G. Kim, M. Y. Bonner, J. L. Arbiser, D. I. Walker, D. P. Jones, D. Gius & M. P. Gupta (2015) Honokiol blocks and reverses cardiac hypertrophy in mice by activating mitochondrial Sirt3. *Nat Commun*, 6, 6656.
- Pillai, V. B., N. R. Sundaresan, G. Kim, M. Gupta, S. B. Rajamohan, J. B. Pillai, S. Samant, P. V. Ravindra, A. Isbatan & M. P. Gupta (2010) Exogenous NAD blocks cardiac hypertrophic response via activation of the SIRT3-LKB1-AMP-activated kinase pathway. *J Biol Chem*, 285, 3133-44.
- Rardin, M. J., W. He, Y. Nishida, J. C. Newman, C. Carrico, S. R. Danielson, A. Guo, P. Gut, A. K. Sahu, B. Li, R. Uppala, M. Fitch, T. Riiff, L. Zhu, J. Zhou, D. Mulhern, R. D. Stevens, O. R. Ilkayeva, C. B. Newgard, M. P. Jacobson, M. Hellerstein, E. S. Goetzman, B. W. Gibson & E. Verdin (2013) SIRT5 regulates the mitochondrial lysine succinylome and metabolic networks. *Cell Metab*, 18, 920-33.
- Razeghi, P., M. E. Young, J. L. Alcorn, C. S. Moravec, O. H. Frazier & H. Taegtmeier (2001) Metabolic gene expression in fetal and failing human heart. *Circulation*, 104, 2923-31.
- Rosca, M. G., B. Tandler & C. L. Hoppel (2013) Mitochondria in cardiac hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*, 55, 31-41.
- Sadhukhan, S., X. Liu, D. Ryu, O. D. Nelson, J. A. Stupinski, Z. Li, W. Chen, S. Zhang, R. S. Weiss, J. W. Locasale, J. Auwerx & H. Lin (2016) Metabolomics-assisted proteomics identifies succinylation and SIRT5 as important regulators of cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, 4320-5.
- Schilling, J. & D. P. Kelly (2011) The PGC-1 cascade as a therapeutic target for heart failure. *J Mol Cell Cardiol*, 51, 578-83.

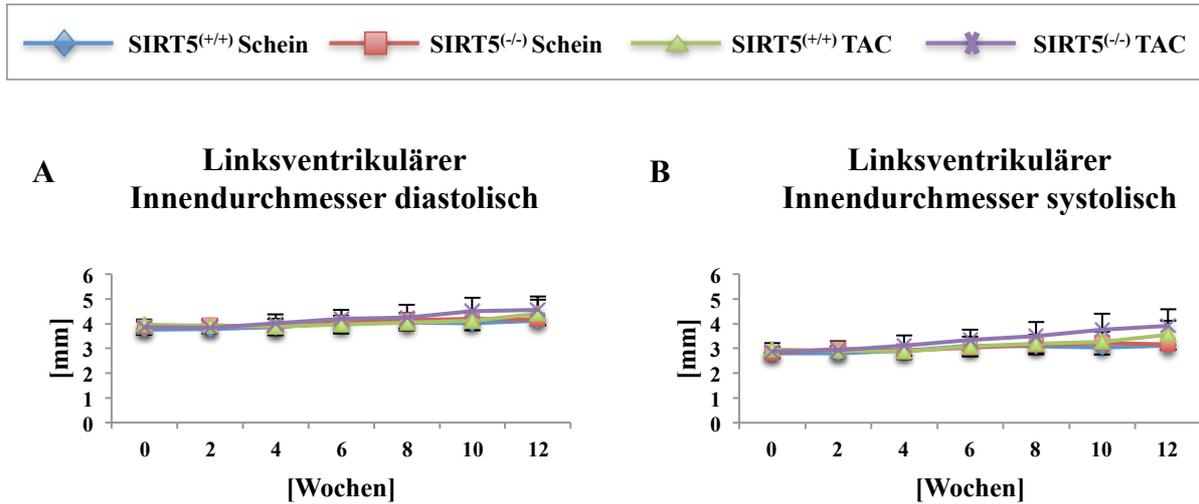
- Schlicker, C., M. Gertz, P. Papatheodorou, B. Kachholz, C. F. Becker & C. Steegborn (2008) Substrates and regulation mechanisms for the human mitochondrial sirtuins Sirt3 and Sirt5. *J Mol Biol*, 382, 790-801.
- Schwarzer, M., A. Schreppe, P. A. Amorim, M. Osterholt & T. Doenst (2013) Pressure overload differentially affects respiratory capacity in interfibrillar and subsarcolemmal mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 304, H529-37.
- Sharov, V. G., A. V. Todor, N. Silverman, S. Goldstein & H. N. Sabbah (2000) Abnormal mitochondrial respiration in failed human myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 32, 2361-7.
- Shekar, K. C., L. Li, E. R. Dabkowski, W. Xu, R. F. Ribeiro, Jr., P. A. Hecker, F. A. Recchia, R. G. Sadygov, B. Willard, T. Kasumov & W. C. Stanley (2014) Cardiac mitochondrial proteome dynamics with heavy water reveals stable rate of mitochondrial protein synthesis in heart failure despite decline in mitochondrial oxidative capacity. *J Mol Cell Cardiol*, 75, 88-97.
- Skrbic, B., J. L. Bjornstad, H. S. Marstein, C. R. Carlson, I. Sjaastad, S. Nygard, S. Bjornstad, G. Christensen & T. Tonnessen (2013) Differential regulation of extracellular matrix constituents in myocardial remodeling with and without heart failure following pressure overload. *Matrix Biol*, 32, 133-42.
- Smith, J. S., C. B. Brachmann, I. Celic, M. A. Kenna, S. Muhammad, V. J. Starai, J. L. Avalos, J. C. Escalante-Semerena, C. Grubmeyer, C. Wolberger & J. D. Boeke (2000) A phylogenetically conserved NAD<sup>+</sup>-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 6658-63.
- Stanley, W. C., F. A. Recchia & G. D. Lopaschuk (2005) Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev*, 85, 1093-129.
- Suematsu, N., H. Tsutsui, J. Wen, D. Kang, M. Ikeuchi, T. Ide, S. Hayashidani, T. Shiomi, T. Kubota, N. Hamasaki & A. Takeshita (2003) Oxidative stress mediates tumor necrosis factor-alpha-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in cardiac myocytes. *Circulation*, 107, 1418-23.
- Tsai, Y. C., T. M. Greco, A. Boonmee, Y. Miteva & I. M. Cristea (2012) Functional proteomics establishes the interaction of SIRT7 with chromatin remodeling complexes and expands its role in regulation of RNA polymerase I transcription. *Mol Cell Proteomics*, 11, 60-76.
- van Empel, V. P. & L. J. De Windt (2004) Myocyte hypertrophy and apoptosis: a balancing act. *Cardiovasc Res*, 63, 487-99.
- van Riet, E. E., A. W. Hoes, K. P. Wagenaar, A. Limburg, M. A. Landman & F. H. Rutten (2016) Epidemiology of heart failure: the prevalence of heart failure and ventricular dysfunction in older adults over time. A systematic review. *Eur J Heart Fail*, 18, 242-52.
- Ventura-Clapier, R., A. Garnier & V. Veksler (2004) Energy metabolism in heart failure. *J Physiol*, 555, 1-13.
- Virbasius, C. A., J. V. Virbasius & R. C. Scarpulla (1993) NRF-1, an activator involved in nuclear-mitochondrial interactions, utilizes a new DNA-binding domain conserved in a family of developmental regulators. *Genes Dev*, 7, 2431-45.
- Walsh, C. T., S. Garneau-Tsodikova & G. J. Gatto, Jr. (2005) Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Int Ed Engl*, 44, 7342-72.
- Wang, Y., Y. Zhu, S. Xing, P. Ma & D. Lin (2015) SIRT5 prevents cigarette smoke extract-induced apoptosis in lung epithelial cells via deacetylation of FOXO3. *Cell Stress Chaperones*, 20, 805-10.

- Wende, A. R., B. T. O'Neill, H. Bugger, C. Riehle, J. Tuinei, J. Buchanan, K. Tsushima, L. Wang, P. Caro, A. Guo, C. Sloan, B. J. Kim, X. Wang, R. O. Pereira, M. A. McCrory, B. G. Nye, G. A. Benavides, V. M. Darley-USmar, T. Shioi, B. C. Weimer & E. D. Abel (2015) Enhanced cardiac Akt/protein kinase B signaling contributes to pathological cardiac hypertrophy in part by impairing mitochondrial function via transcriptional repression of mitochondrion-targeted nuclear genes. *Mol Cell Biol*, 35, 831-46.
- Weng, L. Q., W. B. Zhang, Y. Ye, P. P. Yin, J. Yuan, X. X. Wang, L. Kang, S. S. Jiang, J. Y. You, J. Wu, H. Gong, J. B. Ge & Y. Z. Zou (2014) Aliskiren ameliorates pressure overload-induced heart hypertrophy and fibrosis in mice. *Acta Pharmacol Sin*, 35, 1005-14.
- Xiao, C. Y., M. Chen, Z. Zsengeller, H. Li, L. Kiss, M. Kollai & C. Szabo (2005) Poly(ADP-Ribose) polymerase promotes cardiac remodeling, contractile failure, and translocation of apoptosis-inducing factor in a murine experimental model of aortic banding and heart failure. *J Pharmacol Exp Ther*, 312, 891-8.
- Young, L. H., R. R. Russell, 3rd, R. Yin, M. J. Caplan, J. Ren, R. Bergeron, G. I. Shulman & A. J. Sinusas (1999) Regulation of myocardial glucose uptake and transport during ischemia and energetic stress. *Am J Cardiol*, 83, 25H-30H.
- Yu, J., S. Sadhukhan, L. G. Noriega, N. Moullan, B. He, R. S. Weiss, H. Lin, K. Schoonjans & J. Auwerx (2013) Metabolic characterization of a Sirt5 deficient mouse model. *Sci Rep*, 3, 2806.
- Zhang, J., R. Sprung, J. Pei, X. Tan, S. Kim, H. Zhu, C. F. Liu, N. V. Grishin & Y. Zhao (2009) Lysine acetylation is a highly abundant and evolutionarily conserved modification in *Escherichia coli*. *Mol Cell Proteomics*, 8, 215-25.
- Zhang, Y., S. S. Bharathi, M. J. Rardin, J. Lu, K. V. Maringer, S. Sims-Lucas, E. V. Prochownik, B. W. Gibson & E. S. Goetzman (2017) Lysine desuccinylase SIRT5 binds to cardiolipin and regulates the electron transport chain. *J Biol Chem*, 292, 10239-10249.
- Zhang, Y., S. S. Bharathi, M. J. Rardin, R. Uppala, E. Verdin, B. W. Gibson & E. S. Goetzman (2015) SIRT3 and SIRT5 regulate the enzyme activity and cardiolipin binding of very long-chain acyl-CoA dehydrogenase. *PLoS One*, 10, e0122297.
- Zhou, Q., S. Kesteven, J. Wu, P. Aidery, M. Gawaz, M. Gramlich, M. P. Feneley & R. P. Harvey (2015) Pressure Overload by Transverse Aortic Constriction Induces Maladaptive Hypertrophy in a Titin-Truncated Mouse Model. *Biomed Res Int*, 2015, 163564.
- Zordoky, B. N., I. M. Robertson & J. R. Dyck (2015) Preclinical and clinical evidence for the role of resveratrol in the treatment of cardiovascular diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1852, 1155-77.

## 9 Anhang

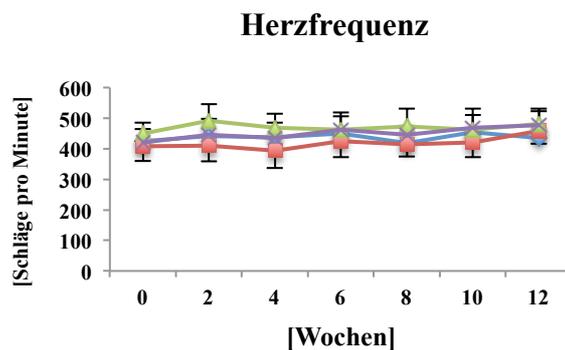
### 9.1 Ergänzende Messparameter zur kontraktiven Herzfunktion in vivo (4.1)

#### Linksventrikulärer Innendurchmesser in Diastole und Systole



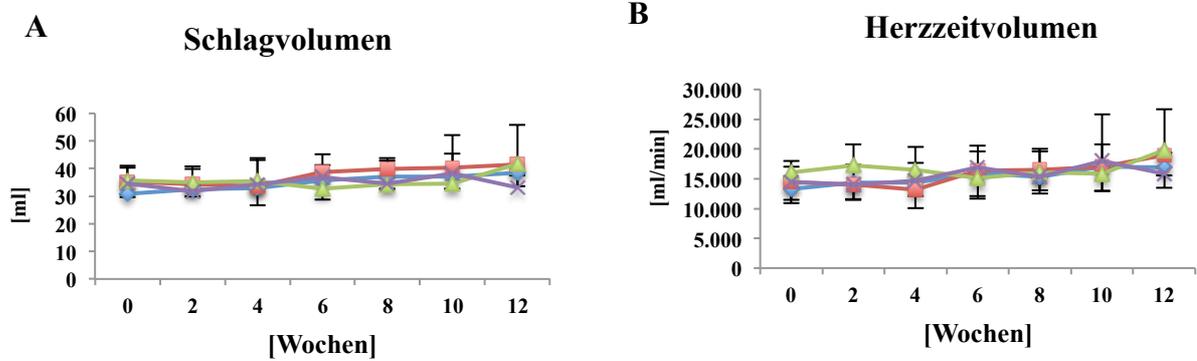
**Abbildung 36:** Linksventrikulärer Innendurchmesser. **A** Linksventrikulärer Innendurchmesser diastolisch im Verlauf Woche 0 bis Woche 12 nach TAC, **B** Linksventrikulärer Innendurchmesser systolisch im Verlauf Woche 0 bis Woche 12 nach TAC. Gemessen mittels Transthorakaler Echokardiographie an 8 bis 20 Wochen alten Mäusen; n=12-16; \*p<0,05 SIRT5<sup>(+/+)</sup> TAC vs. SIRT5<sup>(-/-)</sup> TAC.

#### Herzfrequenz



**Abbildung 37:** Herzfrequenz im Verlauf Woche 0 bis Woche 12 nach TAC. Gemessen mittels Transthorakaler Echokardiographie an 8 bis 20 Wochen alten Mäusen; n=12-16; \*p<0,05 SIRT5<sup>(+/+)</sup> TAC vs. SIRT5<sup>(-/-)</sup> TAC.

## Schlagvolumen und Herzzeitvolumen



**Abbildung 38:** Schlagvolumen und Herzzeitvolumen. **A** Schlagvolumen im Verlauf Woche 0 bis Woche 12 nach TAC, **B** Herzzeitvolumen im Verlauf Woche 0 bis Woche 12 nach TAC. Gemessen mittels Transthorakaler Echokardiographie an 8 bis 20 Wochen alten Mäusen; n=12-16; \*p<0,05 SIRT5<sup>(+/+)</sup> TAC vs. SIRT5<sup>(-/-)</sup> TAC.

## 9.2 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

---

Geboren:	30.04.1992 in Siegen
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

### Akademische Ausbildung:

---

1998 - 2002	Grundschule Obersdorf
2002 - 2011	Abitur Gymnasium Wilnsdorf
09/2008 - 12/2008	Lycée Louis Pasteur Avignon, Frankreich
10/2011 – 12/2018	Studium der Humanmedizin an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
11/2011 – 12/2018	Stipendiatin der Stiftung der Deutschen Wirtschaft
02/2016 - 07/2016	Erasmussemester in Padua, Italien
03/2017 – 02/2022	Promotion in der experimentellen Kardiologie bei PD Dr. med. Heiko Bugger
08/2018	Promotionskolloquium
05/2019 – heute	Assistenzärztin in der Klinik für Kardiologie und Angiologie Universitätsmedizin Charité, Berlin

### Famulaturen

---

02/2014	Famulatur in der Chirurgie, St. Marien-Krankenhaus Siegen
08/2015	Famulatur in der Notaufnahme, Hôpital St. Antoine, Paris, Frankreich
06/2016	Famulatur in der Kinderkardiologie, Azienda Ospedaliera di Padova, Padua, Italien
08/2016	Famulatur in einer kinderkardiologischen Praxis, Berlin
02/2017	Famulatur im Universitäts-Herzzentrum, Bad Krozingen

### **Praktisches Jahr:**

---

10/2017 - 01/2018	Chirurgie am Kilimanjaro Christian Medical Centre, Moshi Tansania
01/2018 - 03/2018	Chirurgie am Ospedale Regionale di Locarno, Schweiz
03/2018 - 07/2018	Innere Medizin am Waldkrankenhaus Spandau, Universitätsmedizin Charité Berlin
07/2018 – 10/2018	Anästhesie an der Universitätsklinik Freiburg

### **Sprachkenntnisse:**

---

Englisch, fließend in Sprache und Schrift  
Französisch, fließend in Sprache und Schrift  
Italienisch, fließend in Sprache und Schrift  
Spanisch, erweiterte Grundkenntnisse

## 9.3 Eidesstattliche Versicherung

### Anlage 2

Zum Antrag auf Zulassung zur Promotion

Zum Dr. med.  
(med. / med.dent.)

Lueg, Julia Christina  
(Name) (Vorname)

#### Eidesstattliche Versicherung

gemäß § 8 Absatz 1 Nr. 3 der Promotionsordnung der Universität Freiburg für die Medizinische Fakultät

1. Bei der eingereichten Dissertation zu dem Thema  
„Der Einfluss fehlender SIRT5-Expression auf die Herzfunktion im Rahmen  
einer chronischen kardialen Drucküberbelastung.“  
handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.
2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.
3. Die Ordnung der Albert-Ludwigs-Universität zur Sicherung der Redlichkeit in der Wissenschaft habe ich zur Kenntnis genommen und akzeptiert
4. Die Dissertation oder Teile davon habe ich  
(Zutreffendes bitte ankreuzen)

bislang nicht an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.

wie folgt an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt:

Titel der andernorts vorgelegten Arbeit:

\_\_\_\_\_

Name der betreffenden Hochschule:

\_\_\_\_\_

Jahr der Vorlage der Arbeit:

\_\_\_\_\_

Art der Prüfungs- oder Qualifikationsleistung:

\_\_\_\_\_

5. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen bestätige ich.
6. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

**Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.**

Freiburg, 11.07.2018

Ort und Datum

Unterschrift



## 9.4 Danksagung

Ein großer Dank gilt PD Dr. med. Heiko Bugger für die Möglichkeit, über dieses interessante Thema in seiner Arbeitsgruppe promovieren zu können. Dank seiner engagierten Betreuungsarbeit und seinem Blick für die wesentlichen Fragestellungen konnte ich an dieser Arbeit enorm wachsen und einen detaillierten Einblick in die medizinische Forschung erhalten.

Weiterhin möchte ich mich bei PD Dr. rer. nat. Michael Hoffmann bedanken, der nicht nur die Zweitbegutachtung dieser Arbeit gewissenhaft übernahm, sondern mich während der gesamten Zeit mit stets motivierenden Worten und klugen Ratschlägen unterstützte.

Mein Dank gilt allen Mitgliedern der AG Bugger für die freundliche Aufnahme, die hervorragende Zusammenarbeit und die Freundschaften, die in der gemeinsamen Zeit entstanden sind. Ich danke Dr. rer. nat. Christoph Koentges, der mit Präzision und Gewissenhaftigkeit die TAC-Operationen für diese Arbeit durchführte und mich immer wieder mit seiner Begeisterung für die Wissenschaft motivieren konnte. Ein großer Dank gilt weiterhin Katharina Pfeil für die Auswertung der ATP-Synthese, ihre gründliche Sorgfältigkeit und Hilfsbereitschaft, dank der die Arbeit im Labor extrem erleichtert wurde. Danke an Carolyn Müsse, Elisabeth Dörfer und Johannes Gollmer, die mit mir die Arbeit in der AG Bugger begonnen haben, für viel Spaß bei der gemeinsamen Arbeit und einen extrem kollegialen, motivierenden Umgang miteinander.

Ich danke meinen Freunden, die mich während der Zeit der Promotion unterstützt haben und mir mit Rat und Tat zur Seite standen. Vor allem danke ich Lea Petrenz für ihren germanistischen Blick auf diese Arbeit. Weiterhin danke ich Dr. Gabi und Dr. Christian Neuhaus, für eine sehr anschauliche erste Einsicht in die Echokardiographie.

Zuletzt und vor allem möchte ich meiner Familie danken, die mir das Studium der Humanmedizin und diese Promotion ermöglicht haben. Danke für viel Rückhalt und Geduld, für ein offenes Ohr bei jeder Art von Problemen und ein Zuhause, dessen Türen immer offen stehen.