

Aus dem Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin
der Deutschen Sporthochschule Köln
Abteilung molekulare und zelluläre Sportmedizin

Geschäftsführender Leiter: Universitätsprofessor Dr. med. W. Bloch

**Morphologische, funktionelle und histochemische Untersuchungen
zur trainingsinduzierten kardialen Adaptation
heterozygoter MnSOD-Knockout-Mäuse**

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

vorgelegt von
Lisa Katharina Richters aus Kassel

Promoviert am 11. Januar 2012

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden von mir unter Anleitung von Prof. Dr. med Wilhelm Bloch und Prof. Dr. rer. nat. Klara Brixius durchgeführt.

Die echokardiografischen Messungen wurden in Kooperation mit Dr. med. Alexander Ghanem aus der Medizinischen Klinik II der Universitätsklinik Bonn vorgenommen, die Auswertung der Ergebnisse erfolgte dann gemeinsam mit Frau Prof. Dr. rer. nat. K. Brixius.

Die Sektion der Mäuse nahm Herr Prof. Dr. med. W. Bloch persönlich vor, die darauf folgende Gewebeaufbereitung erfolgte von mir gemeinsam mit Frau U. Laudenbach-Leschowsky (MTA).

Das Schneiden der Kryostatschnitte sowie deren Färbungen, inklusive der immunhistochemischen Färbungen, wurden von mir unter Anleitung der medizinisch-technischen Assistentinnen M. Ghilav, A. Voß und E. Koroglu durchgeführt.

Die immunhistochemischen Peroxiredoxinfärbungen und deren Auswertung erfolgten gemeinsam mit R. Renner (sportwissenschaftlicher Doktorand).

Die Einbettung und das Schneiden der Semidünnschnitte wurden von mir gemeinsam mit Frau M. Ghilav (MTA) am Institut I für Anatomie (Prof. Dr. K. Addicks) durchgeführt.

Die Ermittlung der VEGF-Konzentration mittels ELISA führte ich gemeinsam mit Frau L. Willkomm (Wissenschaftliche Hilfskraft) durch.

Danksagung

Mein besonderer Dank gebührt Herrn Professor Dr. med. Wilhelm Bloch für die Option, die vorliegende Arbeit unter Betreuung von Frau Prof Dr. rer. nat. Klara Brixius in seiner Abteilung für molekulare und zelluläre Sportmedizin des Instituts für Kreislaufforschung und Sportmedizin der Deutschen Sporthochschule Köln erstellen zu können.

Für die Unterstützung und sachkundige Betreuung bei der Durchführung der Experimente, in der wissenschaftlichen Diskussion und bei der Fertigstellung der Dissertationsschrift danke ich ganz herzlich Herrn Professor Dr. med. Wilhelm Bloch und Frau Prof Dr. rer. nat. Klara Brixius, deren stete geistige Anregungen von großer Bedeutung für die Erstellung dieses Manuskriptes waren. Letzterer möchte ich vor allem für ihre große Hilfe im Rahmen unserer Veröffentlichung danken.

Mein herzlichster Dank gilt den medizinisch-technischen Assistentinnen Anika Voß, Mojghan Ghilav, Ute Laudenschach-Leschowsky und Esra Koroglu sowie der wissenschaftlichen Hilfskraft Lena Willkomm, die mir bei der praktischen Durchführung meiner Experimente eine großartige Unterstützung waren.

Ein ganz besonderer Dank gebührt meiner Mitdotorandin Nadine Lange für die gute freundschaftliche Zusammenarbeit.

Außerdem möchte ich auf diesem Wege meinen Eltern für die Geduld und die Durchsicht meines Manuskriptes sowie meinem Freund Wanja Szypura für die moralische Unterstützung danken.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
1. Einleitung	6
1.1 Oxidativer Stress: die Ambivalenz des Sauerstoffs	7
1.1.1 Die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)	7
1.1.2 Auswirkungen von ROS auf die Zelle und den Organismus	9
1.2 Antioxidative Mechanismen	11
1.2.1 Die Mangansuperoxiddismutase (MnSOD)	12
1.2.2 Die Familie der Peroxiredoxine	13
1.3 Der Effekt von Ausdauertraining auf Körper und Herz	15
1.4 Ein Mausmodell mit erhöhter Sensibilität gegenüber ROS	17
1.5 Fragestellung	20
2. Methodik	21
2.1 Das Material	22
2.2 Das Training	23
2.3 Die funktionelle Diagnostik	24
2.4 Präparation und Gewebsaufbereitung	25
2.4.1 Gebrauchslösungen	25
2.4.2 Durchführung	25
2.5 Die Kryostatschnitte	26
2.5.1 Schneiden der Kryostatschnitte	26
2.5.2 Färbungen	26
2.6 Immunhistochemische Färbungen	27
2.6.1 Verwendete Lösungen	27
2.6.2 Verwendete Antikörper	28
2.6.3 Durchführung der immunhistochemischen Färbung	29
2.6.4 Die Auswertung	30
2.7 Semidünnschnitte	31
2.7.1 Einbettung in Araldit	31
2.7.2 Schneiden der Semidünnschnitte	32
2.7.3 Auswertung der Semidünnschnitte	32
2.8 Die Bestimmung der VEGF-Konzentration	34
2.8.1 Zerkleinerung und Homogenisierung der Präparate	34
2.8.2 Proteinbestimmung nach Lowry	35
2.8.3 Durchführung des ELISA	35
2.9 Die statistische Auswertung und Datenaufbereitung	37

3. Ergebnisse	38
3.1 Morphometrie der Mäuse	39
3.1.1 Das Herzgewichts-/Körpergewichts-Verhältnis	39
3.1.2 Kardiomyozytendurchmesser	40
3.2 Funktionelle Daten	42
3.2.1 Die Ejektionsfraktion	42
3.2.2 Das linksventrikuläre enddiastolische Volumen (LVED)	42
3.3 Histomorphologie	44
3.3.1 HE-Färbung	44
3.3.2 Bindegewebsfärbung nach van Gieson	45
3.4 Kapillarisation	46
3.4.1 Gefäßdichte des Herzmuskels	46
3.4.2 VEGF-ELISA	47
3.5 Immunhistochemie	48
3.5.1 Oxidativer Stress	48
3.5.2 Apoptoseeinleitung mittels aktivierter Caspase-3	52
3.5.3 Der MAP-Kinase-Signalweg	53
3.5.4 Phospho-AKT	55
3.5.5 Peroxiredoxine	56
4. Diskussion	60
4.1 Morphometrische und funktionelle Adaptation der Herzen von MnSOD ^{+/-} -Mäusen nach Ausdauertraining	61
4.2 Oxidativer Stress und Zelltod	64
4.3 Redoxregulative Signalwege und antioxidative Kapazität	66
4.4 Perspektive	71
5. Zusammenfassung	72
6. Literaturverzeichnis	75
7. Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen	88
8. Anhang	89
8.1 Abbildungsverzeichnis	89

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-di-Phosphat
ALS	Amylotrophe Lateralsklerose
ATII	Angiotensin II
ATP	Adenosin-tri-Phosphat
BAD	Bcl-2-Antagonist of Cell Death
BSA	Bovines Serum Albumin
CAT	Katalase
Cu/ZnSOD	Kupfer/Zink-SOD
Da, kDa	Dalton, Kilodalton
DAB	Diaminobenzoidin
D-K	Knockout- („Defizienz“-) Kontrollgruppe
DNA	Desoxiribonukleinacid
D-T	Knockout-(„Defizienz“-) Trainingsgruppe
EC SOD	Extrazelluläre SOD
ED	enddiastolische Volumen
EF	Ejektionsfraktion
EGF	epithelial growth factor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	extracellular signal-regulated kinase
Fe ²⁺	Eisen
g, mg	Gramm, milli Gramm
GPX	Gluthationperoxidase
GSH	Gluthation

h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HDL	High-Density-Lipoprotein
HE	Hämatoxylin- Eosin
Hz, MHz	Hertz, Megahertz
l, ml, μ l	Liter, Milli-, Mikroliter
LDL	Low-Density-Lipoprotein
m, mm, μ m, nm	Meter, Milli-, Mikro-, Nanometer
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinasen
Min	Minute
Mn ³⁺	Mangan
MnSOD	Mangan-Superoxiddismutase
MnSOD ^{+/-}	heterozygote MnSOD-Knockouts
MnSOD ^{+/+}	homozygote/ wildtyp-Mäuse
mol, mmol, μ mol	Mol, Milli-, Mikromol
mRNA	messenger RNA
mtDNA	mitochondriale DNA
MW	Mittelwert
n	Anzahl
N ₂	Stickstoff
NaOH	Natriumhydroxid
NF κ B	nuclear factor kappa-light-chain- enhancer of activated B cells
NKEF-A	natural killer enhancing factor A
NKEF-B	natural killer enhancing factor B
NO \cdot	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
O ₂ \cdot^-	Superoxidanion
¹ O ₂ \cdot^-	Singultet Sauerstoff
OH \cdot	Hydroxylradikal

ONNOO-	Peroxinitrit
P	p-Wert
PBS	Phosphatpuffer
PDGF	platelet derived growth factor
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia hydrogenii
Prx1-6	Peroxiredoxin 1-6
Px	Pixel
RNA	Ribonukleinacid
RNS	reactive nitrogene species
ROS	reactive oxygene species
rpm	revolutions per minutes
s	Standardabweichung
s.	siehe
SOD1-3	Superoxiddismutase 1-3
STABW	Standardabweichung
TBS	Trispuffer
TNF α	Tumornekrosefaktor α
UV	Ultraviolett
v.a.	vor allem
vs	versus
VEGF	Vascular endothelial growth factor
W-K	Wildtyp-Kontrollgruppe
W-T	Wildtyp-Trainingsgruppe
\bar{x}	arithmetisches Mittel
z.B.	zum Beispiel
%	Prozent
°	Grad
°C	Grad Celsius

1. Einleitung

1.1 Oxidativer Stress: die Ambivalenz des Sauerstoffs

Sauerstoff ist ein für das Leben aller aeroben Organismen essentielles Element. In Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette dient er als finaler Elektronenakzeptor in einer durch Cytochrom-C katalysierten Vierelektronen-Reduktion von O_2 zu H_2O und macht damit aerobe Energiegewinnung durch oxidative Phosphorylierung von ADP zu ATP erst möglich [Halliwell, 2006].

Doch der sehr reaktive Sauerstoff hat einen ambivalenten Charakter. Durch diverse exogene und endogene Ursachen kann es zur Entstehung von Sauerstoffradikalen und anderen reaktiven Sauerstoffspezies kommen, die man zu den sogenannten ROS (reactive oxygen species) zusammenfasst. Dazu werden unter anderem das Superoxidanion O_2^- , das Hydroxylradikal OH^\cdot , singulett Sauerstoff 1O_2 , Wasserstoffperoxid H_2O_2 und Peroxylradikale gezählt. In hoher Konzentration können sie jede Art von Biomolekülen schädigen und somit eine Gefahr für die Zelle und den gesamten Organismus darstellen. In geringer Konzentration wirken sie demgegenüber in vielfältigen Signalmechanismen mit [Thannickal & Fanburg, 2000].

Um das oxidative Gleichgewicht der Zelle zu wahren und die Konzentration der ROS in physiologischer Konzentration zu halten, hat die Zelle viele antioxidative Mechanismen entwickelt. Liegt ein Missverhältnis von Antioxidantien und ROS vor, spricht man von oxidativem Stress [Giordano, 2005], die schädigenden Eigenschaften der Radikale und reaktiven Spezies treten in den Vordergrund [Valko et al, 2006].

1.1.1 Die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Die Bildung der ROS hat viele Ursachen. Zum einen entstehen sie ganz alltäglich in der Atmungskette, 1-5 % des an den Mitochondrien umgesetzten O_2 unterliegt der Radikalenbildung [Lee & Wei, 2007]. Jeden Tag entstehen bis zu 10^4 - 10^5 Fehler pro Zelle, die auf DNA-Basenmodifikationen durch ROS zurückzuführen sind [Stadtmann, 1993]. Zum anderen begünstigen bestimmte Faktoren das Entstehen dieser reaktiven Spezies. Dazu gehören UV-Licht und andere ionisierende Strahlen, Umwelttoxene, einige Medikamente und Drogen sowie psychischer Stress. Desweiteren spielt die Ernährung und die Stoffwechsellage eine Rolle.

Inflammatorische Geschehen können ebenfalls oxidativen Stress auslösen [Riley, 1993; Halliwell & Cross, 1994; Baynes, 1991; Babior, 2000]. Körperliche Aktivität erhöht den O_2 -Verbrauch an den Mitochondrien und steigert dementsprechend auch die Bildung der Sauerstoffradikale [Davies et al, 1982].

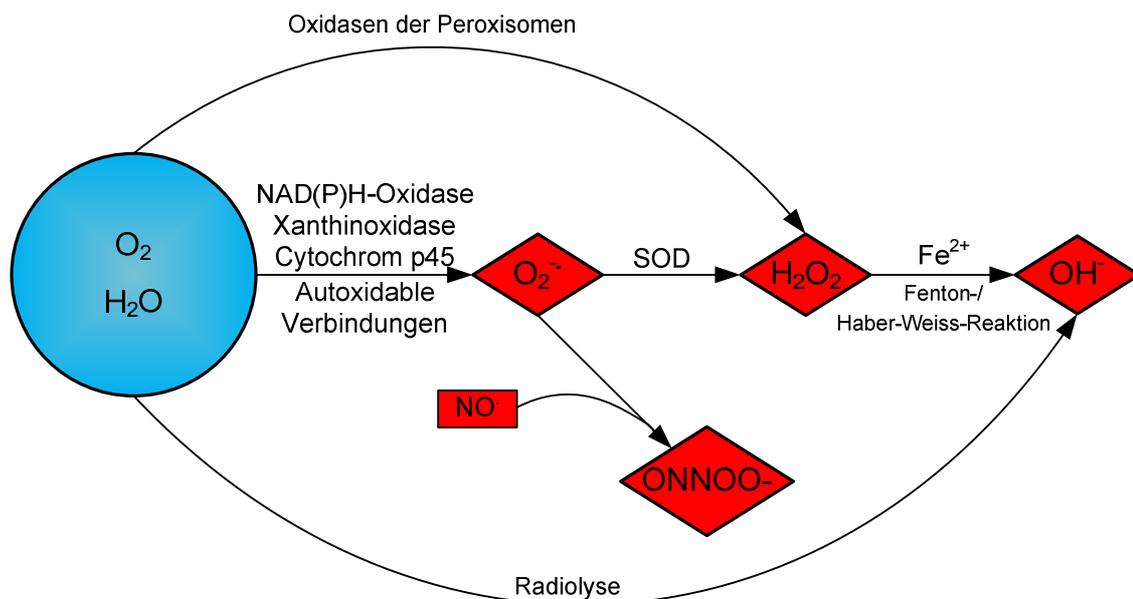


Abbildung 1: Schema zur Entstehung radikaler Sauerstoffspezies.

Bei der Entstehung der ROS steht meist eine Ein-Elektronenreduktion von triplet Sauerstoff zu $O_2^{\cdot-}$ an erster Stelle [Dröge, 2002]. Dies geschieht häufig enzymvermittelt durch die NAD(P)H-Oxidase, Xanthinoxidase oder durch Cytochrom p 450 [Harrison, 2002; Butler et al, 1993] und nicht-enzymatisch an redoxreaktiven, autoxidablen Verbindungen wie Semichinonen und Katecholaminen [Freeman & Crapo, 1982]. Unter physiologischen Bedingungen stellen die NADH-Dehydrogenase und das Ubisemichinon aus Komplex I und III der mitochondrialen Atmungskette die Hauptquelle der ROS dar [Bai et al, 2001].

Das nun entstandene Superoxidanion kann von einer Superoxiddismutase zu dem Zellgift Wasserstoffperoxid (H_2O_2) reduziert werden. H_2O_2 kann aber auch direkt durch eine Zwei-Elektronenreduktion von O_2 entstehen. Diese Reaktion wird v. a. von diversen Oxidasen der Peroxisomen katalysiert, damit dort die β -Oxidation

von Fettsäuren und Entgiftungen mithilfe des Wasserstoffperoxids stattfinden können [Fahl et al, 1984].

H₂O₂ kann in Anwesenheit von Übergangsmetallionen, v.a. Fe²⁺, in der sogenannten Fentonreaktion und der Haber-Weiss-Reaktion zu dem sehr reaktiven Hydroxylradikal OH· weiterreagieren [Halliwell & Gutteridge, 1984], welches auch unter ionisierender Strahlung direkt durch Radiolyse von Wasser entstehen kann [LaVerne, 2000].

In Anwesenheit von NO· kann sich das Superoxidanion damit zu dem toxischen Peroxinitrit (ONNOO-) verbinden (RNS, radical nitric species). NO· ist als einziges in der Lage, SOD bei der Umsetzung von Superoxidanionen auszustechen [Beckman & Koppenol, 1996; Huie & Padmaja, 1993].

1.1.2 Auswirkungen von ROS auf die Zelle und den Organismus

In zu hoher Konzentration vorliegende reaktive Sauerstoffspezies (ROS) können Biomoleküle aller Art schädigen.

In der DNA kann es durch eine radikaleninduzierte Veränderung in der Desoxyribose zu Strangbrüchen, Fehlpaarungen und Mutationen kommen. Häufig resultiert die Bildung von Thymin-Dimeren und 8-Hydroxydeoxyguanosin daraus [Halliwell et al, 1991]. Für die Zellen kann eine solche Schädigung ihrer genetischen Information zu einer malignen Entartung [Valko et al, 2004] oder zur Einleitung der Apoptose führen. Neben der nukleären DNA ist natürlich auch die mitochondriale betroffen [Richter et al, 1988].

Durch ROS verursachte Veränderungen in Proteinen, bevorzugt an Histidin-, Methionin- und Cysteinnresten, können zur Beeinträchtigung der biologischen Aktivität von Enzymen führen [Stadtman, 2006].

Reagieren ROS, vor allem OH·, mit Membranlipiden, erfolgt die sogenannte Lipidperoxidation [Porter, 1986]. Trifft ein Radikal auf eine bevorzugt mehrfach ungesättigte Fettsäure, erfolgt die Bildung eines Alkylradikals, das sich seinerseits mit O₂ zu einem Peroxylradikal verbindet, welches wiederum mit anderen Fettsäuren interagiert und diese radikalisiert. So löst ein Radikal eine Kaskade aus, die viele Lipidmoleküle modifizieren und damit einer ganzen Membran und ihrer

Funktion enormen Schaden zufügen kann [Cossau & Rensing, 2002]. In diesem Prozess entsteht auch 8-epi-PGF 2α („8-Isoprostan“) [Morrow et al, 1990]. Eine Lipidperoxidation von LDL kann die Entstehung von Atherosklerose unterstützen [Chakraborti et al, 1998].

Selbst die Struktur von Kohlenhydraten kann unter dem Einfluss von oxidativem Stress verändert werden [Gilbert et al, 1984].

ROS können also in hoher Konzentration sehr große Schäden hervorrufen und sind daher auch an der Entstehung vieler Krankheiten ursächlich beteiligt. Vor allem wird ihre Rolle bei der Karzinogenese [Dreher et al, 1996, Valko et al, 2004] und dem Alterungsprozess („free radical theory of aging“, [Harman, 1956, 1981; Beckman, 1998]), aber auch bei der Pathogenese neurodegenerativer (z.B. Morbus Alzheimer, Parkinson, ALS [Lin & Beal, 2006]) und atherosklerotischer Erkrankungen sowie bei Kardiomyopathien diskutiert. So beschreiben viele aktuelle Studien eine vermehrte ROS-Formation im Zusammenhang mit dem kardialen Remodelling [Belch et al, 1991, Mallat et al, 1998, review: Tsutsui et al, 2009]. Dies definiert den Umbau der Herzstruktur auf molekularer, zellulärer und interstitieller Ebene bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz mit daraus resultierenden kardialen Veränderungen der Größe, Form und Funktion [Cohn et al, 2000].

Die Zellen scheinen sich nicht nur mithilfe ihrer Antioxidantien auf eine Koexistenz mit den ROS eingestellt zu haben, es sind auch Mechanismen entwickelt worden, um sie zum eigenen Vorteil zu nutzen [Halliwell, 1999]. So spielen ROS eine wichtige Rolle in verschiedenen Signalwegen [Mittal & Murad, 1977; Thannickal & Fanburg, 2000]. Die Regulation der antioxidativen Enzyme durch die jeweiligen Substrate gehört dazu, darüber hinaus greifen ROS auch in komplexe Prozesse wie die Regulation des Gefäßtonus, der Apoptose, der Proliferation, der Zelldifferenzierung und der Tumorsuppression via TNF α , MAPKs, NF κ B, ATII u.a. ein [Dumont et al, 1999, Thannickal & Fanburg, 2000]. Vor allem das Wasserstoffperoxid scheint als Signalmolekül eine wichtige Rolle zu spielen, da es in der Lage ist, durch Membranen zu diffundieren [Rhee, 1999].

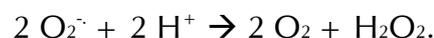
Im Rahmen einer Entzündungsreaktion produzieren Makrophagen und neutrophile Granulozyten mit ihrer phagozytären Isoform, der NAD(P)H-Oxidase, gezielt

Superoxidanionen. Dieser als „oxidative burst“ bezeichnete Prozess stellt zum einen die erste Verteidigungslinie bei der Abwehr gegen Pathogene dar, zum anderen unterstützen die ROS die Aktivierungskaskade der T-Lymphozyten und beschleunigen damit eine suffiziente Immunreaktion [Fantone & Ward, 1982].

1.2 Antioxidative Mechanismen

Zellen haben vielfältige Mechanismen entwickelt, um ihr oxidatives Gleichgewicht aufrecht zu erhalten [Sies, 1993]. Zunächst gibt es präventive Mechanismen, um die Entstehung der Radikalen so gering wie möglich zu halten. Proteine wie Transferrin, Ferritin und Metallothionin binden an Metallionen, v.a. Eisen und Kupfer und verhindern damit die Entstehung von $\text{OH}\cdot$ in der Haber-Weiss- oder Fentonreaktion [Halliwell, 2006]. Durch die Glutathion-S-Transferase wird die Entstehung von Radikalen vermindert, indem sie redoxreaktive Verbindungen abfängt, bevor diese ein Elektron auf Sauerstoff übertragen können. Dazu gehört beispielsweise die Bildung von Thioethern aus Semichinonen [Mannervik, 1996]. Bei der enzymatischen Abwehr der Zelle gegenüber ROS stehen vor allem die Superoxiddismutasen (SOD), die Katalase (CAT) und die Glutathionperoxidase (GPX) zu Verfügung.

Die SOD ist ein Enzym mit drei Isoformen, welches die Dismutation von $\text{O}_2\cdot^-$ in Verbindung mit Wasserstoff zu molekularem Sauerstoff und H_2O_2 katalysiert [McCord & Fridovich, 1969]:



Die drei Isoformen unterscheiden sich sowohl in ihrem Aufbau, in ihrer Aktivität als auch in ihrer Lokalisation [Fridovich, 1997]. Die SOD1 oder Cu/ZnSOD liegt in dimerer Form im Zytoplasma vor und hat mit 70-80% die Hauptaktivität in der Zelle [Halliwell, Gutteridge, 1995, Van Remmen et al, 2003]. Hingegen extrazellulär befindet sich die SOD3 oder EC SOD. Man kann ihre Aktivität nur in bestimmten Geweben vermehrt nachweisen, wie in Herz, Lunge, Niere, Plazenta, Fettgewebe und Skelettmuskel [Nozik-Grayck et al, 2005].

1.2.1 Die Mangansuperoxiddismutase (MnSOD)

Die MnSOD oder SOD2 stellt als mitochondriales Enzym die erste Verteidigungsinstanz gegen mitochondrial, also auch in der Atmungskette entstandene Radikale dar. Sie ist ein Homotetramer und an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. Ihre Aktivität liegt bei ca. 10-20% und ist somit deutlich niedriger als die der vorherrschenden Cu/ZnSOD [Halliwell & Gutteridge, 1995]. Jedoch nimmt sie einen besonderen Stellenwert ein. Mehrere tierexperimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass homozygote MnSOD-defiziente Tiere nicht lebensfähig sind [Li et al, 1995; Lebovitz et al, 1996]. Sie sterben, je nach Genotyp, innerhalb von 1-18 Tagen nach der Geburt an Neurodegeneration oder Kardiomyopathie oder werden schon in utero resorbiert. Komplette Knockout-Tiere der beiden anderen SOD-Isoformen sowie der CAT und GPX können sich empfindlich gegenüber bestimmten Stressoren zeigen, sind im Überleben aber nicht eingeschränkt [Matzuk et al, 1998, De Haan, 1998]. Dies macht allein die MnSOD essentiell für das Leben von Säugern. Ein heterozygoter Knockout des Enzyms führt im Tiermodell zu Herzinsuffizienz [Nojiri et al, 2006] und wird als ideales Modell der altersbedingten Herzinsuffizienz beschrieben [Strassburger, Bloch et al, 2005], eine Überexpression der mitochondrialen Isoform schützt hingegen das Myokard vor Schädigung durch Ischämie und Reperfusion [Chen et al, 1998]. Die MnSOD scheint also eine große Rolle im kardialen Remodelling zu spielen.

Die humane MnSOD ist auf dem langen Arm des Chromosoms 6 kodiert [Church et al, 1992] und setzt sich aus 5 Exons und 4 Introns zusammen [Wan et al, 1994]. Die Produktion des Proteins läuft im Zytosol ab, die MnSOD muss also im Anschluss daran in das Mitochondrium transportiert werden. Das essentielle Enzym, das aus vier identischen 22 kDa schweren Untereinheiten mit jeweils einem aktiven Zentrum inklusive dem Molekül Mangan (Mn^{3+}) besteht [Borgstahl et al, 1992], kommt ubiquitär in jeder menschlichen Zelle vor. Für die MnSOD konnten 4 Genpolymorphismen identifiziert werden. So befindet sich in Exon 2 der Ala-9-Val-Polymorphismus. Es wird vermutet, dass der Transport der MnSOD von Zytoplasma ins Mitochondrium hier beeinträchtigt ist [Rosenblum et al, 1996]. In seiner Valin-Variante scheint er ein prädisponierender Faktor für das Auftreten von

Lungenkrebs [Wang et al, 2001] und der idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie [Hiroi et al, 1999] zu sein.

Die MnSOD-Synthese wird durch viele Zytokine und Hormone induziert. Dazu gehören Interferon- γ , Interleukin-1 und TNF α . Aber auch ionisierende Strahlung, Paraquat, Peroxynitrit sowie ihr Substrat, das Superoxidanion, leiten eine Transkription ein [Harris et al, 1991; Liu et al, 2000; Jackson et al, 1998; Akashi et al, 1995].

Neben ihren antioxidativen Eigenschaften ist die MnSOD auch in eine Vielzahl anderer Prozesse involviert. Sie scheint unter anderem Einfluss auf die Tumorsuppression, das Altern und die Apoptose zu haben [St Clair et al, 1994; Van Remmen et al, 2001].

Das im Zuge der Dismutation des Superoxidanions entstandene H₂O₂ ist zwar kein Radikal, aber ebenfalls eine reaktive Spezies, die unter Einfluss von Übergangsmetallionen zu dem sehr reaktiven Hydroxylradikal reduziert werden kann [Halliwell & Gutteridge, 1984]. Daher ist der Abbau des Wasserstoffperoxids wichtig, um einerseits die direkten Schäden des Zellgiftes zu verhindern, andererseits muss der Entstehung weiterer gefährlicher Radikale vorgebeugt werden. Dies kann mithilfe verschiedener Enzyme erfolgen. Zusammen mit Glutathion (GSH) reduziert die GPX H₂O₂ zu oxidiertem GSH und Wasser [Reed, 1990], die zytosolische Katalase konvertiert es direkt zu H₂O und O₂ [Michiels et al, 1994].

1.2.2 Die Familie der Peroxiredoxine

Seit einigen Jahren stehen die Peroxiredoxine (Prx) als Antioxidantien im Mittelpunkt vieler Diskussionen [Kim et al, 1988, Chae et al, 1994]. Bislang sind sechs Isoformen (Prx 1-6) in Säugetieren bekannt [Knoops et al, 1999, Seo et al, 2000]. Gemeinsam mit vorwiegend Thioredoxin, GSH und anderen Thiolen als Elektronendonator wirken sie als Peroxidasen und helfen beim Abbau von H₂O₂, Peroxiden und Peroxynitrit [Kang et al, 1998, Bryk et al, 2000].

Aufgrund ihrer im Vergleich zu GPX und CAT geringen katalytischen Effizienz [Hofmann et al, 2002] scheint ihre Funktion vor allem in der Modulation des intrazellulären H₂O₂-Gehaltes und der Redoxregulation verschiedener Signalwege und Zelldifferenzierung zu liegen [Fujii et al, 2002, Immenschuh et al, 2005].

Außerdem wird ihnen eine besondere antioxidative Rolle während zellulären Stresses zugesprochen [Rhee et al, 2005].

Die vorwiegend zytosolischen Prx1 & 2 fungieren als „natural killer cell enhancing factors“ NKEF-A & B und wirken antiapoptotisch [Fujii et al, 2002]. Prx2 erreicht dies durch eine NF- κ B-Inaktivierung und eine Reduktion der Cytochrom-c-Freigabe [Zhang et al, 1997]. Prx3 ist ein rein mitochondriales Enzym [Rhee et al, 1999], dessen Genexpression durch oxidativen Stress induziert wird. Das Prx4 befindet sich intrazellulär im Zytoplasma, in den Lysosomen und an den Membranen und wird aktiv als Zytokin (TRANK) sezerniert [Immenschuh et al, 2005]. Extrazellulär wirkt es dann bei der Induktion von NF- κ B und c-Jun N-terminal-Kinase und spielt so eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen [Haridas et al, 1998]. Das atypische 2-Cys-Prx, Prx5, findet man hauptsächlich im Zytoplasma, in den Peroxisomen und Mitochondrien. Es hemmt p-53-induzierte ROS-Entstehung und Apoptose [Übersicht: Fujii et al, 2002]. Dem rein zytoplasmatischen Prx6 wird neben seiner Peroxidaseaktivität in Gegenwart von GSH auch eine Phospholipase-A₂-Aktivität zugesprochen [Chen et al, 2000].

Neben den enzymatischen gibt es eine Reihe nicht-enzymatischer antioxidativer Mechanismen. Dazu gehören die Vitamine C und E, freie Aminosäuren und Proteine, die Harnsäure und GSH [Halliwell, 2006; Sies, 1999]. Das Radikal NO \cdot , mit seiner hohen Affinität zu OH \cdot und Peroxylradikalen, inhibiert wirkungsvoll die Lipidperoxidation und wird somit von einigen Autoren auch als Antioxidantie bezeichnet [Halliwell, 1999, Rubbo et al, 1994].

Ist trotz allem ein Schaden entstanden, so sind die Reparaturmechanismen der DNA und das Turnover von Membranen eine wichtige Verteidigungsinstanz gegen radikaleninduzierte Schäden [Demple et al, 1994, Sies, 1993]. In Mitochondrien, dem primären Ziel dort gebildeter ROS, ist der DNA-Reparaturmechanismus nicht suffizient, sodass dort entstandene Schäden nicht vollständig behoben werden können und sich defekte mtDNA in den Mitochondrien ansammelt. Es wird vermutet, dass so das Risiko der ROS-Entstehung mit dem Alter steigt [Wei & Lee, 2002].

1.3 Der Effekt von Ausdauertraining auf Körper und Herz

Die Versorgung der Organe und der Skelettmuskulatur mit Blut ist die Hauptaufgabe unseres kardiovaskulären Systems. Unter körperlicher Aktivität kommt es daher neben der erhöhten Muskelarbeit auch zu einer Mehrbelastung des gesamten Herzkreislaufsystems. Der arbeitende Muskel muss zur Energiegewinnung mit O₂ und benötigten Substraten versorgt werden, entstehende Metabolite und Wärme müssen abtransportiert werden [Coyle, 2000]. Eine chronische Mehrbelastung führt zu Adaptationen, die die Leistungsfähigkeit eines Organismus erhöht, die O₂-Aufnahme und -Verwertung optimiert und langfristig Herzkreislauferkrankungen vorbeugt [Cornelissen & Fagard, 2005].

Im Skelettmuskel kommt es bei regelmäßiger, v.a. dynamischer (aerober), Belastung zu einer Verbesserung der Durchblutung, einer Erhöhung der Mitochondriendichte und einer Zunahme der Aktivität oxidativer Enzyme [Blomqvist, 1983], was eine Optimierung der aeroben Kapazität zu Folge hat [Holloszy & Booth, 1977]. Ferner geht Ausdauertraining mit einer Ökonomisierung der Atmung, einer Verbesserung der Blutfette (Senkung LDL, Erhöhung HDL [Kiran et al, 2006; Ensign et al, 2002]) sowie mit multiplen Veränderungen des Herzkreislaufsystems einher.

Veränderungen am Herzen infolge von Ausdauertraining wurden bereits Ende des 19. Jahrhunderts [Henschen, 1899] beschrieben und seither, vor allem begünstigt durch die Entwicklung der Echokardiografie, in sehr vielen Studien weiter erforscht. Regulativ führt chronische Mehrbelastung zu einer Abnahme des Pulses (bei Ruhe, submaximaler Belastung), was zu einem leichten Blutdruckabfall und einer optimierten diastolischen Füllung führt [Fagard, 2003]. Dies ermöglicht erhöhte Herzzeitvolumina mit verbesserter O₂-Aufnahme bei ökonomisierter Herzarbeit in maximaler Belastung [Urhausen et al, 1999]. Strukturelle Veränderungen zeigen sich meist erst ab einer Trainingsintensität ab 3-4h/Woche [Dickhuth et al, 2004]. Das sogenannte Sporthertz ist ein physiologisch hypertrophiertes Herz, das bei vorwiegend dynamischen Sportarten (v.a. Laufen) durch eine exzentrische, volumenbetonte Vergrößerung geprägt ist [Scheuer & Tipton, 1977]. Es kommt zu einer Zunahme der Herzvolumina mit paralleler Wandverdickung [Fagard et al, 1984], eine Erhöhung der Herzmasse ist möglich, aber selten außerhalb der Norm [Fagard,

1996]. Im Myokard kommt es zu einer Hypertrophie der Kardiomyozyten mit einer Längen- und Durchmesserzunahme sowie einer Erhöhung der Mitochondriendichte und einer Aktivitätssteigerung der glykolytischen und oxidativen Enzyme [Stuwe et al, 2000]. Auch eine erhöhte Kapillardichte kann hier Folge regelmäßig aeroben Trainings sein [Hudlickà et al, 1995].

Die Ausprägung der jeweiligen Adaptation hängt natürlich von der Art und Dauer des Ausdauertrainings ab, aber auch Alter, Geschlecht und der genetische Hintergrund des Individuums haben große Auswirkungen darauf.

Die beschriebenen trainingsinduzierten Veränderungen dienen einer Optimierung der Sauerstoffversorgung der arbeitenden Gewebe unter Ökonomisierung des Herzkreislaufsystems. Aber ein erhöhter O₂-Verbrauch führt dementsprechend auch zu einer vermehrten Entstehung von ROS im Skelettmuskel [Davies et al, 1982] und Myokard [Ohkuwa et al, 1997]. Geht man davon aus, dass der Anteil an entstehenden ROS beim O₂-Umsatz an den Mitochondrien gleich bleibt (1-5% [Lee & Wei, 2007]), so vermutet man auf diesem Wege einen deutlichen Anstieg der Radikalendichte bei einem trainingsinduzierten Sauerstoffmehrverbrauch (im Skelettmuskel bis 100fach) [Ji, 1999]. Aber auch andere Entstehungsmechanismen, wie das Xanthinoxidasesystem, die Autooxidation von Katecholaminen und lokale Entzündungsreaktionen stehen zur Diskussion [Bloch et al, 2004; Ji, 1999].

Der Anstieg der ROS bei intensivem Training kann das sensible Gleichgewicht zwischen Oxidantien/Antioxidantien stören und somit zu einer Schädigung des Gewebes, z.B. durch Lipidperoxidation [Navarro-Arévalo et al, 1999], führen.

Jedoch konnten frühere Studien einen Benefit der ROS-Mehrproduktion in den Mitochondrien zeigen, beispielsweise eine Optimierung der Kontraktilität [Reid et al, 1992]. Auch die antioxidative Kapazität der Zellen verbessert sich reaktiv langfristig unter regelmäßiger körperlicher Betätigung. So kann es zu einer Aktivitätssteigerung antioxidativer Enzyme wie der SOD (Cu/ZnSOD und MnSOD [Quintanilha et al, 1983; Navarro-Arévalo et al, 1999] und GPX im Skelettmuskel und Myokard kommen (Übersicht s. Abb.2). Auch beobachtet man eine erhöhte Genexpression der SOD1, der GPX und der Katalase [Wilson et al, 2000]. Ferner

kommt es zu einem Anstieg des Glutathiongehaltes und zu einer Verminderung der basalen H₂O₂-Produktion [Venditti et al, 1999] in der Zelle.

	Trainingsbedingungen	total SOD	MnSOD	Cu/ZnSOD	CAT	GPX
Demirel et al, 1998	10-wöchiges Laufbandtraining ♀ Ratten, 4 Mo	↔	-	-	-	↔
Demirel et al, 2001	3-tägiges Laufbandtraining ♀ Ratten, 4 Mo	-	↑	↔	↔	↔
Gündüz et al, 2004	1Jähriges Schwimmtraining ♂ Ratten, 9 Mo	↑	-	-	↔	↑
Hong et al, 1994	10-wöchiges Laufbandtraining ♂ Ratten, 4 Mo	↔	-	-	↓	↓
Husain et al, 1997	6,5-wöchiges Laufbandtraining ♂ Ratten	↑	-	-	↔	↑
Ji, 1993	8-wöchiges Laufbandtraining ♂ Ratten, 6 Mo	-	↔	↔	↔	↔
Kakarla et al, 2005	12-wöchiges Laufbandtraining ♀ Ratten, 3/12 Mo	↑	-	-	-	-
Powers et al, 1993	10-wöchiges Laufbandtraining ♀ Ratten, 4 Mo	↑	-	-	↔	↔
Powers et al, 1998	10-wöchiges Laufbandtraining ♀ Ratten, 4 Mo	-	↑	↑	↔	↔
Pushpalatah et al, 2006	8-wöchiges Laufbandtraining ♂ Ratten, jung/alt	↑	-	-	↑	-
Qiao et al, 2006	6-tägiges Schwimmtraining ♂ Mäuse, 5 Wo	↑	-	-	-	-
Venditti et al, 1997	10-wöchiges Schwimmtraining ♂ Ratten	-	-	-	-	↔
Wilson et al, 2000	10-wöchiges Laufbandtraining ♂ Ratten, 4 Mo	-	↔	↔	-	-

Abbildung 2: Übersicht über die trainingsinduzierten Veränderung der jeweiligen antioxidativen Enzymaktivitäten im Myokard in der Literatur; dargestellt als ↔: gleich bleibend, ↑: signifikant erhöht, ↓: signifikant vermindert, -: nicht bestimmt.

Körperliche Betätigung stellt eine Belastung für das Herzkreislaufsystem dar, auch durch ein erhöhtes Radikalenvorkommen. Ausdauersport führt jedoch längerfristig zu einer Optimierung der Leistungsfähigkeit und einer Verbesserung der antioxidativen Kapazität.

1.4 Ein Mausmodell mit erhöhter Sensibilität gegenüber ROS

Die in dieser Arbeit beschriebene Maus wurde in der Klinik für Dermatologie und Allergologie der Universität zu Ulm erschaffen. Bei dem Versuch, eine Maus mit einem epidermisspezifischen Knockout für MnSOD zu schaffen, kreierte die Arbeitsgruppe um Dr. Scharffetter-Kochanek einen Knockout, der jedes Gewebe betraf [Strassburger, Bloch et al, 2005]. Mit einem gewebsspezifischen flox-and-delete-Verfahren wurde eine Deletion des Exons 3 des MnSOD-Gens herbeigeführt, woraus eine vollständige Inaktivierung des nun entstehenden Enzyms

resultierte. Eine männliche homozygote SOD_2^{flox} Maus dieser Zucht wurde mit einer weiblichen Keratin14 Cre-transgenen Maus gekreuzt. Alle Abkömmlinge waren gewebsunspezifisch heterozygote MnSOD-defiziente Tiere. Um diese genetische Veränderung von der Keratin 14 Cre Mutante zu isolieren, kreuzte man die Tiere untereinander. Es entstand eine Mäuselinie mit einem Knockout im MnSOD-Allel und einem gemischten C57BL/6X129/OLA Hintergrund.

Die homozygoten Knockout-Mäuse starben nach 8 bis 10 Tagen post partum. Ihre heterozygoten Geschwister hingegen, deren MnSOD-Aktivität auf ungefähr die Hälfte reduziert war, schienen keine anatomischen Unterschiede zu Wildtyp-Mäusen aufzuweisen und ihr Überleben in einem Beobachtungszeitraum von 12 Monaten war auch vergleichbar. Bei der Betrachtung der Ultrastruktur und einiger biochemischer Parameter des Herzgewebes fielen jedoch deutlich Unterschiede auf. Es wurden vermehrt Schäden durch ROS festgestellt, es lagen geschwollene und zerrissene Mitochondrien sowie Lipidansammlungen im Plasma vor. Auch wurde eine vermehrte Lipidperoxidation, Peroxinitritbildung und Einleitung von Apoptose-Signalwegen nachgewiesen.

Besonders eindrucksvoll war, dass in diesem Modell erstmals neben der Reduktion der MnSOD-Aktivität auch eine Reduktion der Cu/ZnSOD im Herzen auf die Hälfte gezeigt wurde. Mittels WesternBlot-Analyse und RNase protection-assays konnte keine Erniedrigung der mRNA und Proteinexpression nachgewiesen werden. Der erniedrigten Cu/ZnSOD-Aktivität liegt also keine Veränderung auf Transkriptionsebene zu Grunde, sondern eine Inaktivierung auf Proteinebene. Die Autoren erklären sich dies mit einer Inaktivierung des Enzyms durch zu hohe ROS-Belastung, die von den Mitochondrien aus auf das Zytoplasma übergegriffen hat.

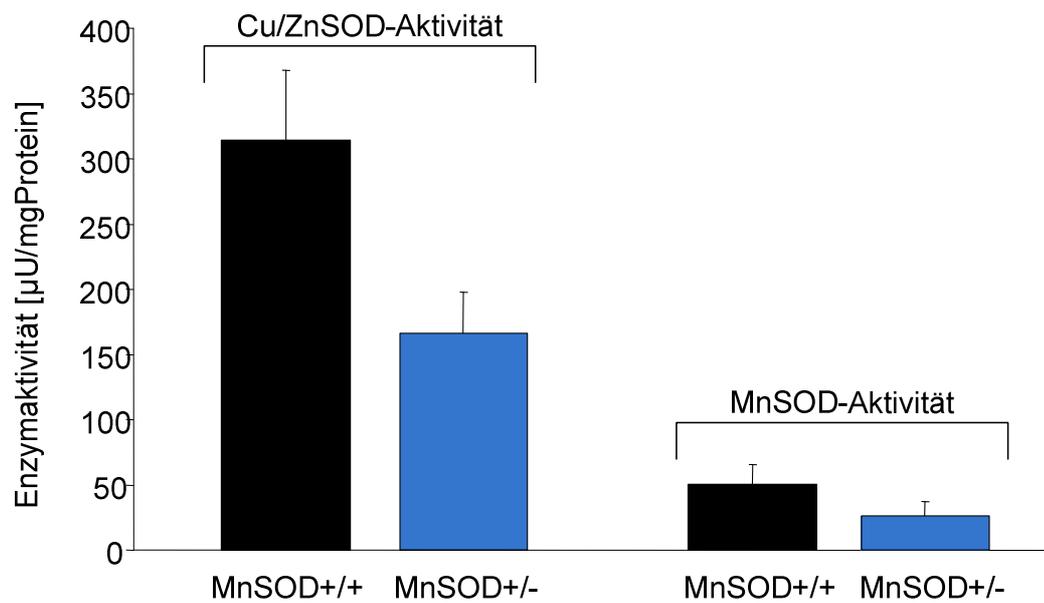


Abbildung 3: Enzymaktivität [$\mu\text{U}/\text{mg Protein}$] der SOD1 und 2 im Vergleich bei $\text{MnSOD}^{+/+}$ - und $\text{MnSOD}^{+/-}$ -Mäusen. Dargestellt sind Mittelwert + Standardabweichung. (Daten entnommen der Veröffentlichung Strassburger et al, 2005.)

In anderen Geweben wurde ein solcher Aktivitätsgradient nicht beobachtet, auch andere antioxidative Systeme, wie die Glutathionperoxidase und Katalase schienen nicht in ihrer Aktivität beeinträchtigt zu sein.

Durch diesen unerwarteten Phänotyp scheinen die heterozygoten MnSOD -Knockout-Mäuse ein gutes Langzeit-Modell für altersbedingte Herzinsuffizienz zu sein.

1.5 Fragestellung

Es gilt als erwiesen, dass Ausdauertraining kardiovaskuläre Leistungsfähigkeit erhöht und Herz-Kreislaufkrankungen vorbeugt. Hingegen ist der Effekt einer trainingsinduzierten mitochondrialen ROS-Mehrproduktion auf die Herzfunktion eines Individuums mit verminderter SOD2-Aktivität bisher ungeklärt.

Die vorliegende Studie betrachtet nun den Effekt von Ausdauertraining auf Herzmuskelgewebe im oben vorgestellten Tiermodell. Der Einfluss von Sport als oxidativer Trigger in Situationen von bereits erhöhter Radikalenbelastung soll untersucht werden. Dafür wurden männliche heterozygote MnSOD-Knockout-Mäuse und Wildtyp-Mäuse einem 8-wöchigen Laufbandtraining unterzogen, während Kontrollgruppen beider Genotypen untrainiert blieben.

1. Erfolgt bei den MnSOD^{+/-}-Tiere eine kardiale Adaptation an das Training, die mit der der Wildtypen vergleichbar ist?

Dafür wurden funktionelle Messungen der Herzvolumina nach Abschluss der Trainingsphase durchgeführt. Die Herzgewichte und Durchmesser der Kardiomyozyten aller Gruppen wurden verglichen, auch die Kapillarisation wurde betrachtet.

2. Reagieren die heterozygoten Knockout-Tiere unter dem Trainingseinfluss empfindlicher gegenüber oxidativem Stress?

Zur Beurteilung des oxidativen Stresses im Herzen der vier Gruppen wurden Gewebsschnitte immunhistochemisch mit anti-Nitrotyrosin und anti-8-Isoprostan gefärbt. Auch die Induktion der Apoptose durch Aktivierung von Caspase-3 wurde immunhistochemisch überprüft.

3. Welche redoxregulativen und antioxidativen Signalwege wurden kardial bei beiden Genotypen unter Training und in der Kontrollsituation aktiviert?

Dafür wurden die Aktivierung der AKT und der MAPKinasen ERK1/2 und p38 verglichen. Außerdem wurde der Gehalt der 6 Peroxiredoxin-Isoformen immunhistochemisch überprüft. Neben ihrer antioxidativen Funktion spielen sie auch in vielfältigen Signalwegen eine entscheidende Rolle.

2. Methodik

2.1 Das Material

In dieser Studie, die von der hiesigen Ethikkommission genehmigt wurde, wurden Herzen von Wildtyp-Mäusen denen von heterozygoten MnSOD-Knockout-Mäusen gegenübergestellt. Es wurden bis zu drei Tiere gemeinsam in einem Käfig gehalten, sie hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Ihre Haltung unterlag einem 12 zu 12 Stunden Tag-/Nachtrhythmus.

Bei den Tieren handelte es sich um männliche Mäuse mit einem gemischten C57BL/6X129/OLA Hintergrund aus dem Labor von Dr. K. Scharffetter-Kochanek vom Institut für Dermatologie und Allergologie der Universität zu Ulm [beschrieben in Strassburger, Bloch et al, 2005] (siehe auch 1.5).

Zur Untersuchung wurden 33 Mäuse männlichen Geschlechts im Alter zwischen drei und vier Monaten herangezogen. Bei den untersuchten Tieren handelte es sich um 13 Wildtyp- und 20 Knockout-Mäuse.

Sowohl eine Knockout- (D-T, n = 11), als auch eine Wildtyp-Gruppe (W-T, n = 6) nahm an einem Trainingsprogramm teil, während die restlichen Tiere beider Genotypen als Kontrollgruppen untrainiert blieben (D-K, n = 9; W-K, n = 7).



Abbildung 4: Foto von 6 Mäusen gemischter Genotypen während des Trainings.

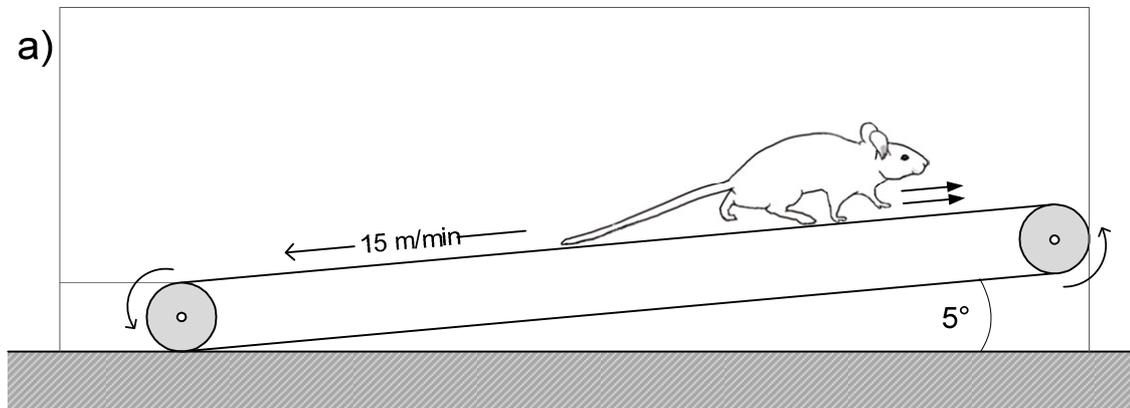


Abbildung 5: Schemazeichnung des verwendeten Laufbandes mit Angabe des Neigungswinkels und der Laufgeschwindigkeit.

2.2 Das Training

Das Training bestand aus einem einstündigen Laufen auf einem Laufband während eines Zeitraumes von acht Wochen, fünf Tage pro Woche. Dabei bewegte sich das Laufband mit einer Geschwindigkeit von 15 m/min bei einer Steigung von 5° . Vor diesem 8-wöchigen Programm gab es für die Trainingstiere eine Eingewöhnungsphase auf dem Laufband von fünf Tagen, in denen sie sich kontinuierlich von einer Viertelstunde auf eine Stunde am Tag steigerten. Das Laufband war durch blickdichte Plastikeinsätze in sechs Bereiche unterteilt, sodass gleichzeitig ebenso viele Tiere laufen konnten, ohne sich gegenseitig zu irritieren.

2.3 Die funktionelle Diagnostik

Nach Abschluss der Trainingsphase wurden stichprobenartig Tiere aus jeder der vier Gruppen einer funktionellen Diagnostik unterzogen. Zur Bestimmung der ventrikulären Volumina und der Ejektionsfraktionen wurde eine Echokardiografie durchgeführt.

Für die hochauflösende echokardiografische Untersuchung wurden die Tiere mit einem Inhalationanästhetikum (1.5-1.8% Sevofluran in 50% N₂/ 50% O₂) bei konstanter Körpertemperatur von 37°C betäubt. Die Anästhetika waren so niedrig wie möglich dosiert, um den kardiodepressiven Effekt so gering wie möglich zu halten. Es wurde ein handelsübliches Ultraschallsystem benutzt, ausgestattet mit einem Linearumwandler, der mit einer Emmissionsfrequenz von 15 MHz und einer Bildfrequenz von 280 Hz arbeitet (HDI-5000, Philips Medical Systems, Bothell, WA, USA), die axiale Auflösung im M-Modus entsprach ungefähr 100µm. Mithilfe der Flächen-Längen-Methode wurde das enddiastolische und das endsystolische linksventrikuläre Volumen und die Ejektionsfraktion bemessen.

Die Bildgebung wurde als adäquat angesehen, wenn sowohl die epikardialen als auch die endokardialen Grenzen des Herzens gut dargestellt werden konnten. Die Messung der enddiastolischen Werte wurde parallel zur R-Spitze gewonnen.

Diese Messungen wurden in Kooperation mit Dr. med. Alexander Ghanem aus der Medizinischen Klinik II der Universitätsklinik Bonn durchgeführt [siehe auch Ghanem et al, 2003, 2006].

2.4 Präparation und Gewebsaufbereitung

2.4.1 Gebrauchslösungen

- Phosphatpuffer (PBS), 0.2molare Stammlösung

Zur Herstellung von 0.2molarem PBS wurden 0.162mol Dinatrium-Hydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, Merck, Darmstadt), 0.038mol Natrium-Dihydrogenphosphat-Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, Merck, Darmstadt) und 0.3mol Natriumchlorid (NaCl , Merck, Darmstadt) in 1l Aqua dest gelöst. Der pH wurde daraufhin kontrolliert und auf 7.4 eingestellt.

Um aus der Stammlösung die 0.1molare PBS Gebrauchslösung zu gewinnen, verdünnt man sie zu gleichen Teilen mit Aqua dest und stellt den pH wieder auf 7.4 ein.

- 4%iges Paraformaldehyd (PFA) in 0.1molarem PBS

In 40 ml destilliertem Wasser wurden 0.133mol Paraformaldehyd $((\text{CH}_2\text{O})_n$, Merck, Darmstadt) bei etwa 60°C gelöst. Die entstandene Lösung wurde mit 1molarer NaOH (Merck, Darmstadt) geklärt. Wieder erkaltet, wurde sie gefiltert und mit 50ml 0.2molarem PBS gemischt. Der pH wurde auf 7.4 eingestellt und anschließend mit Aqua dest auf 100ml aufgefüllt. Eine erneute pH-Kontrolle wurde durchgeführt.

2.4.2 Durchführung

Nach Abschluss der Trainingsphase und der funktionellen Diagnostik wurden die Tiere mittels Genickbruch getötet und von Prof. Dr. W. Bloch, Sporthochschule Köln, präpariert. Zunächst wurden die Mäuse gewogen, danach wurde der Thorax mit einer linearen Inzision eröffnet und das Herz isoliert, entfernt und ebenfalls gewogen.

Die obere Hälfte des Herzens wurde direkt in flüssigem Stickstoff zur biochemischen Auswertung tiefgefroren und von da an bei -80°C gelagert.

Der untere Anteil wurde zur Erstellung von Kryostatschnitten und Semidünnschnitten weiterverarbeitet. Zunächst wurden diese Herzhälften sechs

Stunden lang bei 4°C in 4%igem PFA inkubiert. Danach wurde das Gewebe mit 0.1molarem PBS dreimal gewaschen und im Anschluss über Nacht in 18%iger Saccharoselösung (Merck, Darmstadt) gelagert.

Nach diesem Schritt wurden die Herzspitzen der Proben abgetrennt und nach dem unten angeführten Verfahren (s. 2.7) zur Herstellung von Semidünnschnitten in Araldit eingebettet.

Das übrige Herzgewebe wurde für die Kryostatschnitte dann in Tissue tec® (Sakura Finetek U.S.A., Inc, Torrance, CA, USA) eingebettet und ebenso bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.5 Die Kryostatschnitte

2.5.1 Schneiden der Kryostatschnitte

Zur Nutzung des in PFA fixierten Materials wurden vom Herzen jedes Tieres Schnitte am Kryostaten (Frigocut 2700, Reichenberg-Jung) hergestellt. Diese wurden in einer Schnittdicke von 7 µm bei -23°C angefertigt und auf Objektträgern (Polysine™, VWR international, Darmstadt) fixiert.

Bis zur weiteren Verwendung wurden die Schnitte bei -20°C aufbewahrt.

2.5.2 Färbungen

Die Kryostatschnitte wurden daraufhin für verschiedene Untersuchungen unterschiedlich gefärbt.

- Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur histologischen Übersicht wurden zunächst HE-Färbungen durchgeführt. Dazu wurde Hämalaunlösung nach Mayer verwendet (Mayer's Hämalaunlösung, Merck, Darmstadt), zusammengesetzt aus 1g Hämatoxylin in 10 ml Ethanol und 1l Aqua dest mit 0.86mmol Natriumjodid und 0.11mol Kalium-Aluminium-Sulfat. Die Eosinlösung wird aus 1.45mmol Eosin in 100ml Aqua dest hergestellt.

Die Kryostatschnitte verblieben jeweils für sieben Minuten erst in der Hämalaunlösung, dann in fließendem Leitungswasser und wurden anschließend fünf Minuten lang in der Eosinlösung belassen.

Nach einer Minute in Aqua dest folgte zur Entwässerung die Alkoholreihe. Die Objektträger wurden jeweils zwei Minuten lang in 70%igem, 96%igem und dann 100%igem Ethanol geschwenkt. Bevor die Schnitte mit Entellan (Merck, Darmstadt) eingedeckt wurden, verblieben sie für weitere zwei Minuten in Xylol (Alfred Quadflieg GMBH).

-Trichromfärbung nach van Gieson

Zur Beurteilung des Bindegewebes wurde eine Trichromfärbung nach van Gieson angefertigt. Dafür inkubierten die Gewebsschnitte zwei Minuten lang in Weigerts Eisenhämatoxylin (Eisen-Haematoxylin A, nach Weigert, Division Chroma®, Münster).

Nach gründlichem Waschen unter fließendem Wasser und Abtrocknen mit Filtrierpapier wurde für eine Minute Pikrofuchsin aufgetragen. Es folgte erneutes Abtrocknen und eine Alkoholreihe von 96%igem, 100%igem Ethanol und Xylol sowie das Eindecken mit Entellan (Merck, Darmstadt) und Deckgläsern (Microscope cover glass, VWR international, Darmstadt).

2.6 Immunhistochemische Färbungen

2.6.1 Verwendete Lösungen

-Trispuffer (TBS), 0.05 molare Gebrauchslösung

Um 0.05 molaren Trispuffer mit einem pH von 7.6 herzustellen, wurden zunächst 0.05mol Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan VWR International GmbH, Darmstadt) in 250ml Aqua dest aufgelöst. Dann wurden 0.15mol NaCl hinzugefügt, der pH-Wert wurde kontrolliert und bei Bedarf mit 1molarer HCl (Merck, Darmstadt) eingestellt. Danach wurde die Lösung mit Aqua dest auf 1l aufgefüllt und der pH-Wert erneut kontrolliert.

-Diaminobenzoidin(DAB)-Lösung

0.035mmol DAB (Merck, Darmstadt), 0.112mmol Ammoniumchlorid (NH₄Cl, Merck, Darmstadt), 3.42μmol Nickel-II-Sulfat (NiSO₄X6H₂O, Merck, Darmstadt), 300μl 10%ige β-D-Glucose (Sigma-Aldrich Chemie GMBH, München) und 50μl Glucose-Oxidase (Sigma-Aldrich Chemie GMBH, München) wurden in 15ml 0,1molarem Phosphatpuffer (PB) gegeben, der pH-Wert wurde auf 7.4 eingestellt und die Lösung anschließend filtriert.

2.6.2 Verwendete Antikörper

-Erste Antikörper:

- Anti-Nitrotyrosine, rabbit immunaffinty purified IgG (Upstate, Lake Placid, NY, USA), Verdünnung 1:400
- Anti-8-epi-PGF_{2α}, polyclonal goat (Natutec, Oxford Biomedical Research, Oxford, Mi, USA), Verdünnung 1:1500
- Anti-phospho-AKT1/PKBα(Thr308), rabbit immunaffinty purified IgG (Upstate, Lake Placid, NY, USA), Verdünnung 1:400
- Anti-Map Kinase, monoclonal (Diphosphorylated ERK1/2) Clone MAPK-YT, mouse IgG1 (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA), Verdünnung 1:400
- Anti-akt-Caspase-3, rabbit IgG (BD Bioscience Pharmingen, Franklin Lakes, USA), Verdünnung 1:500
- Anti-active p38 pAb, polyclonal rabbit (pTGpY) (Promega Corp., Madison, USA), Verdünnung 1:500
- Anti-Peroxiredoxin I, II, III, IV, V und VI, rabbit polyclonal IgG (LabFrontier Co. Ltd., Seoul, Korea / Acris Antibodies GmbH, Hiddenhouse, Deutschland), Verdünnung 1:1000

-Zweite Antikörper:

Die zweiten Antikörper waren in Abhängigkeit vom jeweilig ersten Antikörper

- biotinylated polyclonal goat anti-rabbit Immunglobuline
- biotinylated polyclonal goat anti-mouse Immunglobuline

- biotinylated polyclonal rabbit anti-goat Immunglobuline (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark).

2.6.3 Durchführung der immunhistochemischen Färbung

Für die Immunhistochemie wurden die Kryostatschnitte der PFA-fixierten Präparate eine halbe Stunde vor Beginn des Färbeprozesses aufgetaut und getrocknet. Die einzelnen Herzschnitte wurden, damit das Auftragen der folgenden Flüssigkeiten präzisiert werden konnte, mit einem Fettstift umfahren. Daraufhin, wie später auch zwischen jedem Arbeitsschritt, wurden die Gewebsschnitte dreimal 10 Minuten lang mit 0.05 molarer TBS gewaschen. Zum Blockieren der endogenen Peroxidase wurde als erstes für 20 Minuten eine Lösung aus 20ml Methanol (Merck, Darmstadt), 4.5ml Aqua dest und 0.5 ml H₂O₂ (Merck, Darmstadt) auf die Schnitte aufgetragen. Als nächster Schritt wurde eine Lösung aus 0.011mol Ammoniumchlorid (Sigma-Aldrich Chemie GMBH, München), 20µl Triton X (Serva Electrophoresis, Heidelberg) und 20 ml TBS für höchstens 10 Minuten aufpipettiert. Danach wurde ein Gemisch aus 0.75g BSA (Bovines Serum Albumin, PAA Laboratories GMBH, Cölbe) und 15 ml TBS aufgebracht. Diese Lösung verblieb eine Stunde auf dem Gewebe. Abschließend wurde direkt der jeweilige 1. Antikörper in seiner individuellen Verdünnung in einer 0.8%igen BSA Lösung (0.12g BSA in 15ml TBS) aufgetragen, der dann über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am zweiten Tag wurde nach vierfachem Waschen der Schnitte der 2. Antikörper in einer Verdünnung von 1: 400 in TBS aufgetragen.

Nach einer Stunde Inkubation und erneutem Waschen wurde der Horseradish-Peroxidase-Komplex (Streptavidin), 1:150 in TBS verdünnt, wiederum für eine Stunde auf die Präparate gebracht. Auf den 4-fach gewaschenen Schnitten wurde nun die Peroxidase-Aktivität mittels DAB-Entwicklung nachgewiesen. Die DAB-Lösung wurde auf die Präparate aufgebracht und per Mikroskopie überwacht. Sobald eine Schwarzfärbung eintrat, wurde der Entwicklungsprozess mittels TBS gestoppt.

Nach dem Abstoppen und mindestens zweimaligen Waschen wurden die Objektträger jeweils für zwei Minuten in 70%iges, 96%iges und 100%iges Ethanol, danach in Xylol gegeben. Anschließend erfolgte die Eindeckung mit Entellan und Deckgläsern.

Für eine optimale Auswertbarkeit wurden immer alle zu vergleichenden Proben mit dem jeweiligen Antikörper in demselben Durchgang gefärbt. Außerdem wurde eine Negativkontrolle durchgeführt, die den ganzen Färbeprozess genau wie alle anderen Objektträger durchlief, aber bei der kein 1. Antikörper aufgetragen wurde.

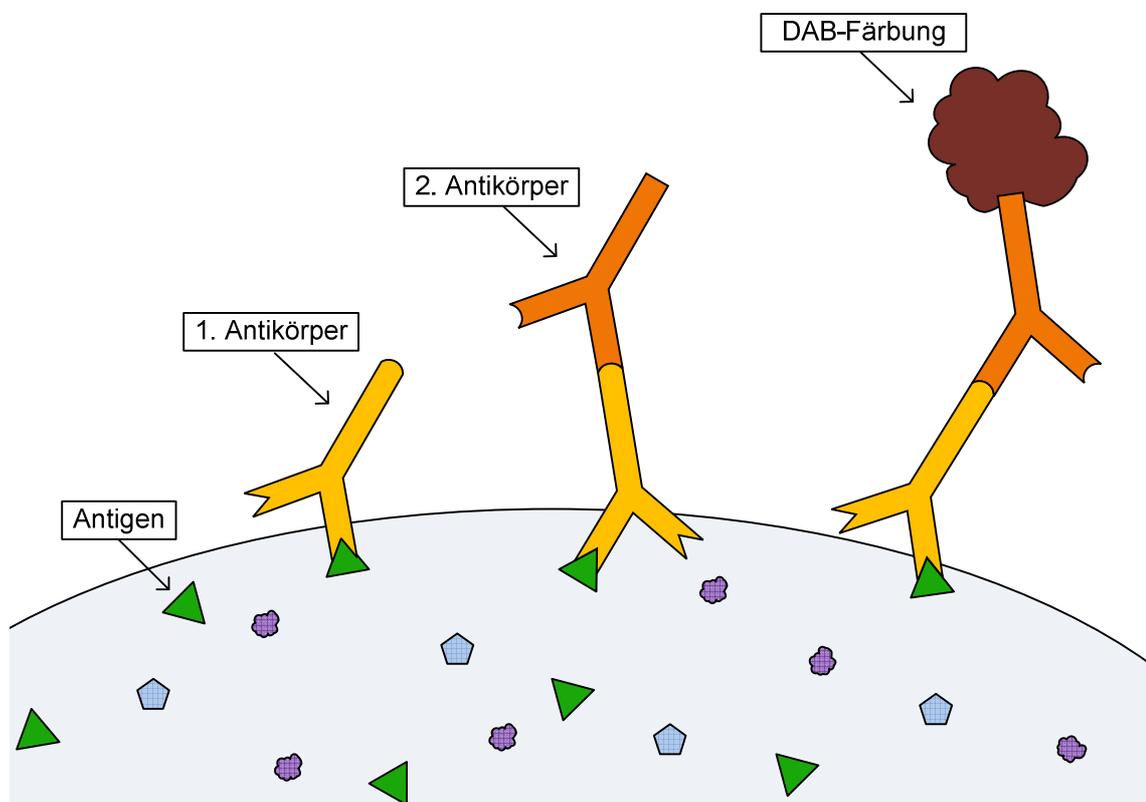


Abbildung 6: Schematische Darstellung immunhistochemischer Färbung

2.6.4 Die Auswertung

Densitometrisch wurden die immunhistochemischen Schnitte mit dem Programm Image J (NIH, Bethesda USA) ausgewertet. Das vom Lichtmikroskop (Leica, Wetzlar) erzeugte Bild wurde mit einer Kamera (Trinicon, Sony, Japan) auf einen

PC übertragen und dort mithilfe dieses Programms festgehalten und bearbeitet. Hier wurde nun die optische Dichte der Zellen mit der des Hintergrundes verglichen. Mindestens 40 Zellen pro Objektträger wurden einbezogen, wobei höchstens fünf Zellen im zufällig ausgewähltem Gesichtsfeld und mindestens zwei Gewebsschnitte betrachtet wurden. Auch wurden nur Kardiomyozyten verwendet, die quer und mittig getroffen worden waren. Mit dem Programm wurde die jeweilige Zelle umfahren und photometrisch ausgemessen. Dieser Wert wurde mit dem des Hintergrundes verglichen, welcher aus dem arithmetischen Mittel dreier Messungen zellfreier Areale ermittelt worden war. Dabei achtete man darauf, dass jeder einzelne Messwert der Helligkeit des Hintergrundes immer bei 215 ± 5 Arbitrary Units lag, um für jedes Bild vergleichbare Bedingungen zu gewährleisten. Die Auswertung erfolgte verblindet.

Die Messwerte wurden mithilfe von Microsoft Excel verwaltet und ausgewertet.

2.7 Semidünnschnitte

2.7.1 Einbettung in Araldit

Zunächst wurden die bei der Gewebsaufbereitung abgetrennten Herzspitzen noch einige Male unterteilt, sodass man pro Versuchstier mehrere Blöcke einbetten konnte. Dieses Gewebe wurde zunächst dreifach mit 0,1molarem Caco-Puffer gewaschen. Daraufhin verblieben die Herzspitzen zur Osmierung für 2-4 Stunden in Osmium (Osmiumtetroxid 1:1 gemischt mit 0,2molarem Caco-Puffer). Nach erneutem Waschen folgten 15-30 Minuten in 50%igem Alkohol und die Proben wurden dann in gefiltertem 1,5%igem Uranylacetat in 70er Alkohol über Nacht bei 4°C abgedunkelt gelagert.

Der zweite Tag der Einbettung begann mit einer Alkoholreihe bestehend aus zweimal 70%igem Ethanol, einmal 90%igem Ethanol und dreimaligem 100%igem Ethanol für jeweils 10-20 Minuten.

Die Proben verblieben anschließend für 15-30 Minuten in einem 1:1 Propylenoxid-Ethanolgemisch, dann die gleiche Zeit in reinem Propylenoxid. Als nächster Schritt wurden die Proben für 2-12 Stunden in ein 1:1 Araldit-

Propylenoxidgemisch überführt, danach über Nacht in einem 3:1 Araldit-Propylenoxidgemisch gelagert. Nach und zwischen den beschriebenen Schritten wurden die Proben immer bei 4°C und abgedunkelt aufbewahrt.

Am dritten Tag wurden die Proben zwei Stunden lang bei 40°C in frisch angesetztem Araldit gelagert. Dann wurden sie in flexible Förmchen eingebettet, mit Araldit aufgefüllt und mit ihrer Präparatenummer versehen. Zur Polymerisierung verblieben sie zunächst für 12 Stunden bei 45°C, dann 48 Stunden lang bei 60°C im Brutschrank.

2.7.2 Schneiden der Semidünnschnitte

Die in Araldit eingebetteten Gewebeproben wurden zur Auswertung an einem Mikrotom geschnitten. Dafür wurden die jeweiligen Blöcke zunächst mit einem Blocktrimmer (Reichert-Jung TM 60, C. Reichert Optische Werke AG, Wien) getrimmt, damit das Gewebe an der Schneidefläche vom Araldit befreit war. Die Semidünnschnitte wurden daraufhin in einer Dicke von 500nm mit einem Glasmesser an einem Mikrotom (Reichert Ultracut R, Leica Microsystems, Wetzlar) geschnitten und auf Objektträger (Menzel, Braunschweig) aufgebracht.

Im Anschluss erfolgte die Färbung mit Methylblau auf einer Wärmeplatte bei ca. 37°C und einer ungefähren Dauer von zwei Minuten. Die Schnitte wurden dann mit Entellan (Merck, Darmstadt) eingedeckt.

Es wurden immer Schnitte von mindestens zwei verschiedenen Blöcken desselben Tieres hergestellt, um über eine ausreichend große Zahl an auswertbaren Zellen zu verfügen.

2.7.3 Auswertung der Semidünnschnitte

- Größenmessung

Die Durchmesser der Kardiomyozyten wurden an den Semidünnschnitten bestimmt. Benutzt wurde das Mikroskop Axiophot (Zeiss, Jena) mit einem 40er Objektiv (Zeiss, Jena) in Kombination mit einer digitalen Kamera (3CCD Color Video, Sony, Japan). Aus dem live-stream konnten in dem Programm KS300.03

(Zeiss, Jena) Einzelbilder im Tiff-Format abgespeichert werden, die mit dem Programm SCION Image (Scion Corporation, MA, USA) ausgewertet wurden.

Zur Annäherung an den Durchmesser der Zellen wurde der Wert minor axis betrachtet. Die jeweilige möglichst transversal geschnittene Zelle wurde manuell mit dem Cursor umrandet. Das Programm errechnete aus diesen Gegebenheiten die dazu passende annähernd ideale Ellipse. Orthogonal zum Mittelpunkt der längsten Achse der Ellipse (major axis) wurde nun die zweite Achse berechnet und als minor axis bezeichnet. Dieser Wert entspricht annäherungsweise dem Durchmesser dieses Myozyten.

Für diese Auswertung wurden mindestens 40 Zellen pro Präparat herangezogen, die quer und mittig getroffen waren, also nur Zellen mit Anschnitt ihres Kernes.

Die hierbei gewonnenen Daten wurden mithilfe von Microsoft Excel verwaltet und ausgewertet.

- Gefäßdichte

Auch für die Bestimmung der Kapillarisation wurde mit dem Mikroskop Axiophot (Zeiss, Jena), aber mit dem 63er Zeiss Immersionsobjektiv (Zeiss, Jena, mit Immersionsöl, Immersol) gearbeitet. Die Bilder wurden auch hier mithilfe der Kamera (3CCD Color Video, Sony, Japan) in das Programm KS 300.03 (Zeiss, Jena) übertragen. Einerseits wurden quer getroffene Kardiomyozyten gesucht, um alle angrenzenden Kapillare zu zählen. Dabei wurden nur Zellen mit Zellkern in die Auswertung eingeschlossen. Andererseits wurden alle Gefäße in einem Gesichtsfeld ausgezählt. Das Gesichtsfeld bezieht sich auf das Bild von 768x576px, entsprechend $7271\mu\text{m}^2$, welches die Kamera eingefangen und in das Programm übertragen hat. Auch hierbei wurde darauf geachtet, dass \pm Areale mit Kardiomyozyten im Querschnitt ausgewählt wurden.

Alle Daten wurden mit Microsoft Excel verwaltet und bearbeitet.

2.8 Die Bestimmung der VEGF-Konzentration

2.8.1 Zerkleinerung und Homogenisierung der Präparate

Hierfür wurden die direkt in Stickstoff gefrorenen Herzproben verwendet.

Verwendete Lösungen:

-Präparationspuffer

bestehend aus 0.24mol reiner Saccharose (Merck, Darmstadt), 1mmol PMSF, 20mmol PIPES (Sigma-Aldrich Chemie GMBH, München), 10mmol EDTA (Sigma-Aldrich Chemie GMBH, München) und 50mmol NaH_2PO_4 und wurde mit einem pH von 7,4 verwendet

-Gefrierpuffer

bestehend aus 40mmol reiner Saccharose, 5mmol PIPES, 5mmol Tris, 10mmol EDTA und 50mmol NaH_2PO_4 bei einem pH von 7.2

Für diesen Vorgang wurden alle verwendeten Instrumente gut gekühlt, damit die Kühlkette aufrechterhalten werden konnte. Die Präparate wurden vorsichtig in einem mit N_2 gekühlten Mörser mithilfe eines Hammers zerkleinert. Gemeinsam mit etwas N_2 und einer Metallkugel kamen die Proben in ein Teflongefäß, das anschließend in den Dismembrator (Mikrodismembrator, BBraun Melsungen AG) gespannt wurde. Dort wurde die Probe für 45-120 Sekunden zerkleinert und anschließend das entstandene Pulver in ein Eppendorf-tube (2ml) gegeben. Zur Homogenisierung wurde nun bis zu 1ml Präparationspuffer inklusive $20\mu\text{l}$ Phosphataseinhibitor und $10\mu\text{l}$ PMSF hinzugefügt. Das Gemisch wurde gevortext und dann im Eis mit dem Homogenisator (Bachofer, Laboratoriumsgeräte, Reutlingen) bearbeitet. Anschließend wurde der homogenen Masse dieselbe Menge an Gefrierpuffer hinzugefügt und erneut gevortext. Die Proben wurden als nächstes bei 4°C und 800rpm 20 Minuten lang zentrifugiert (Centrifuge 5147R, Eppendorf, Hamburg), der Überstand wurde in ein neues Eppendorf tube pipettiert und der Pellet aus Zellschrott verworfen. Die gewonnenen Proben wurden daraufhin bei -80°C gelagert.

2.8.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Um den Gesamtproteingehalt der vorliegenden Proben zu ermitteln, damit auch später der Gehalt an VEGF berechnet werden konnte, wurde eine Proteinbestimmung nach Lowry durchgeführt. Dazu wurden die Proben und eine Proteinleiter von Proteinlösungen bekannter Proteinkonzentrationen zwischen 0.156mg/ml und 10 mg/ml aufgetaut. In eine 96er Mikrotiterplatte wurden dann zunächst 5 μ l jeder der Stufen der Proteinleiter pipettiert, dann dasselbe Volumen der zu untersuchenden Proben. Um Verunreinigungen vorzubeugen, wurde für jede Probe eine neue Pipettenspitze benutzt, außerdem wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, um Fehler so gering wie möglich zu halten. Zu allen Proteinproben wurden dann 25 μ l Lösung A und 50 μ l Lösung B (Bio-Rad Dc Protein-assay) hinzugefügt. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Farbumschlag densitometrisch im ELISA-Reader (Molecular devices, kinetic microplat reader, MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland/High Point, NC, USA) bei 650 nm ausgemessen. Aus den Proteinlösungen der Verdünnungsreihe wurde mithilfe der Software SoftMax Pro (Molecular Devices, USA) eine Standardkurve berechnet, an der die Proteinkonzentrationen der übrigen Proben bestimmt werden konnten.

2.8.3 Durchführung des ELISA

Es wurde das Mouse VEGF-Immunoassay-Kit von Biosource, USA, verwendet. Alle im Folgenden aufgeführten Materialien und Lösungen sind daraus entnommen. In die 96er Mikrotiterplatte wurde zunächst eine Verdünnungsreihe pipettiert. Es handelte sich um 100 μ l von 500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6; 7,8 und 0 pg MS VEGF standard/ml Standard Diluent Puffer. In die anderen Wells wurden 20 μ l der jeweiligen Proben mit 80 μ l Standard Diluent Puffer hinzugefügt. Zusätzlich wurden eine High- und eine Low-Kontrolle angefertigt.

Alle hier aufgeführten Lösungen wurden zur Kontrolle doppelt in die Messung mit einbezogen.

Als erster Schritt wurden die Wells bei Raumtemperatur für zwei Stunden mit 50 μ l biotinylated anti-VEGF-Lösung inkubiert. Nach vierfachem Waschen mit dem

dazugehörigen Wash Buffer wurden 100 μ l Streptavidin-HRP Arbeitslösung (120 μ l Streptavidin-HRP 100X concentrate/12 ml Streptavidin-HRP Diluent) auf jedes Well aufgetragen und für 30 Minuten unter einem Plate-Cover inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden 100 μ l Stabilized Chromogen hinzugefügt (Farbumschlag \rightarrow blau), welches im Dunkeln für eine weitere halbe Stunde inkubiert. Nun wurden 100 μ l Stop Solution (Farbumschlag \rightarrow gelb) in jedes Well pipettiert, um die Färbereaktion abzustoppen. Die Platte wurde im Anschluss bei 450nm im ELISA-Reader (Molecular devices, kinetic microplate reader, MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland/High Point, NC, USA) ausgelesen.

Die Daten wurden dabei von dem Programm SoftMax Pro (Molecular Devices, USA) erfasst und eine Standardkurve berechnet. Die weitere Auswertung, die die Verdünnung und die Proteinkonzentrationen der Proben mit einbezog, wurde via Microsoft Excel durchgeführt.

2.9 Die statistische Auswertung und Datenaufbereitung

Zur statistischen Auswertung und Verwaltung der Messdaten wurde das Programm MS Excel (Microsoft Corporation, Seattle, USA) verwendet. Für alle Ergebnisse wurde das arithmetische Mittel \pm der Standardabweichung berechnet.

Arithmetisches Mittel \bar{x} :

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i .$$

Standardabweichung s:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n} \cdot \sum (x_i - \bar{x})^2}$$

Zur Bewertung der Daten wurde der Student-t-Test für ungepaarte Stichproben angewandt. Als signifikant wurden Werte von $p < 0,05$ betrachtet.

MS Excel wurde auch für das Erstellen der Balkendiagramme und Tabellen herangezogen. Zeichnungen und Schemata wurden mithilfe von MS Visio (Microsoft Corporation, Seattle, USA) erstellt, die Aufbereitung der Fotografien erfolgte mit Adobe Photoshop (Adobe Systems inc, San Jose, USA).

3. Ergebnisse

3.1 Morphometrie der Mäuse

3.1.1 Das Herzgewichts-/Körpergewichts-Verhältnis

Als Parameter für die Herzvergrößerung wurde ein Quotient aus Herzgewicht und Körpergewicht gebildet (s. Abb.5).

Die Auswertung dieses Quotienten zeigt signifikante Unterschiede zwischen den Wildtypieren (W-K: $5.2\text{mg/g} \pm 0.53\text{mg/g}$, $n=7$; W-T: $5.29\text{mg/g} \pm 0.26\text{mg/g}$, $n=6$) und den MnSOD-defizienten Tieren (D-K: $6.34\text{mg/g} \pm 0.91\text{mg/g}$, $n=9$; D-T: $6.31\text{mg/g} \pm 0.51\text{mg/g}$, $n=11$; $p_{\text{WK/DK}}=0.015$), unabhängig vom Training. Beide Knockout-Gruppen hatten im Vergleich zu den Wildtyp-Gruppen ein vergrößertes Herzgewicht in Relation zu ihrem Körpergewicht.

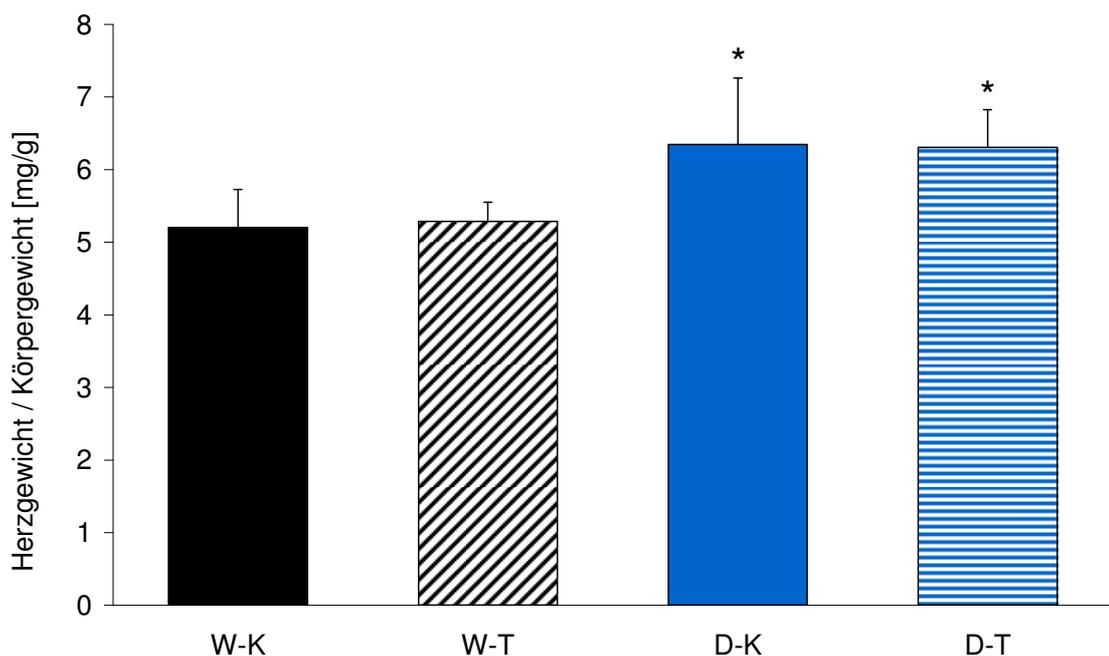


Abbildung 7: Herzgewichts-/Körpergewichtsratio [mg/g], aufgetragen sind MW + STABW
* : p vs W-K und W-T < 0,05

3.1.2 Kardiomyozytendurchmesser

An den Semidünnschnitten wurden die Diameter der Kardiomyozyten bestimmt. Bei der Auswertung der kleinsten Durchmesser (Abb.6) zeigte sich eine signifikante Vergrößerung der Kardiomyozyten bei den Kontrolltieren der transgenen Tiere im Vergleich zu der Wildtyp-Kontrollgruppe (D-K: $20.3\mu\text{m} \pm 1.8\mu\text{m}$, $n=9$; W-K: $17.8\mu\text{m} \pm 1.5\mu\text{m}$, $n=7$; $p_{WK/DK}=0.014$). Durch Training zeigten die Wildtyp-Tiere eine leichte, aber nicht signifikante, Vergrößerung der kardialen Muskulatur (W-T: $19.1\mu\text{m} \pm 1.9\mu\text{m}$, $n=6$), die Knockout-Tiere zeigten hingegen eine signifikante Verkleinerung der Kardiomyozytendurchmesser unter Training (D-T: $18.4\mu\text{m} \pm 1.4\mu\text{m}$, $n=11$; $p_{DK/DT}=0.023$).

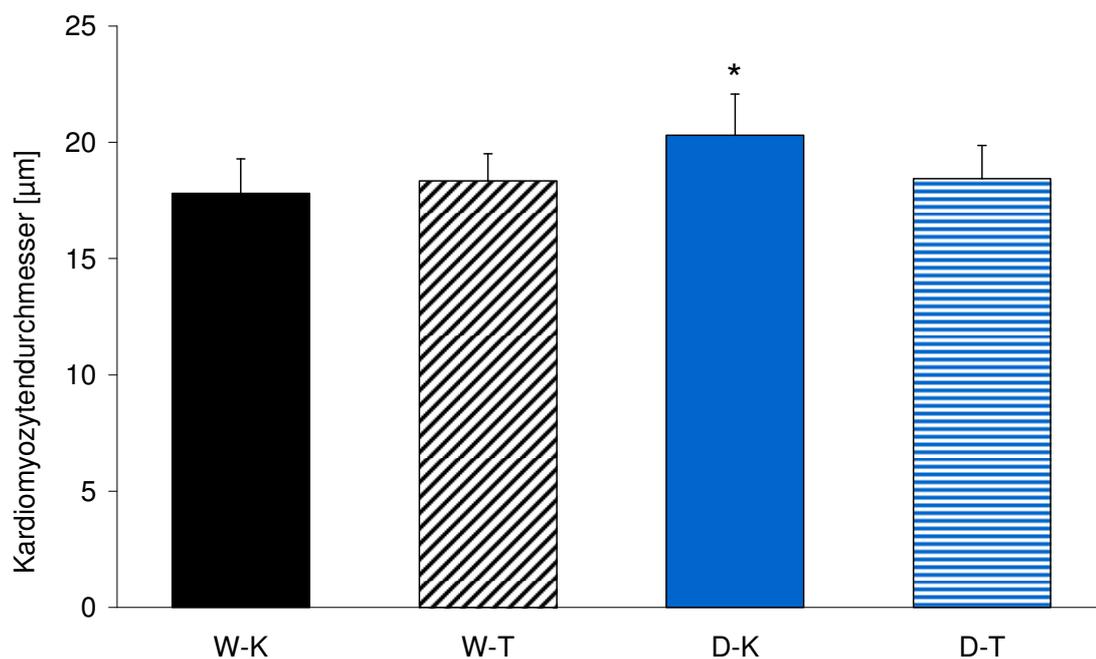


Abbildung 8: Kardiomyozytendurchmesser [µm], aufgetragen sind MW+STABW. Die Auswertung erfolgte an Semidünnschnitten mit Berechnung des minor axis.
* : p vs W-K, W-T und D-T < 0,05

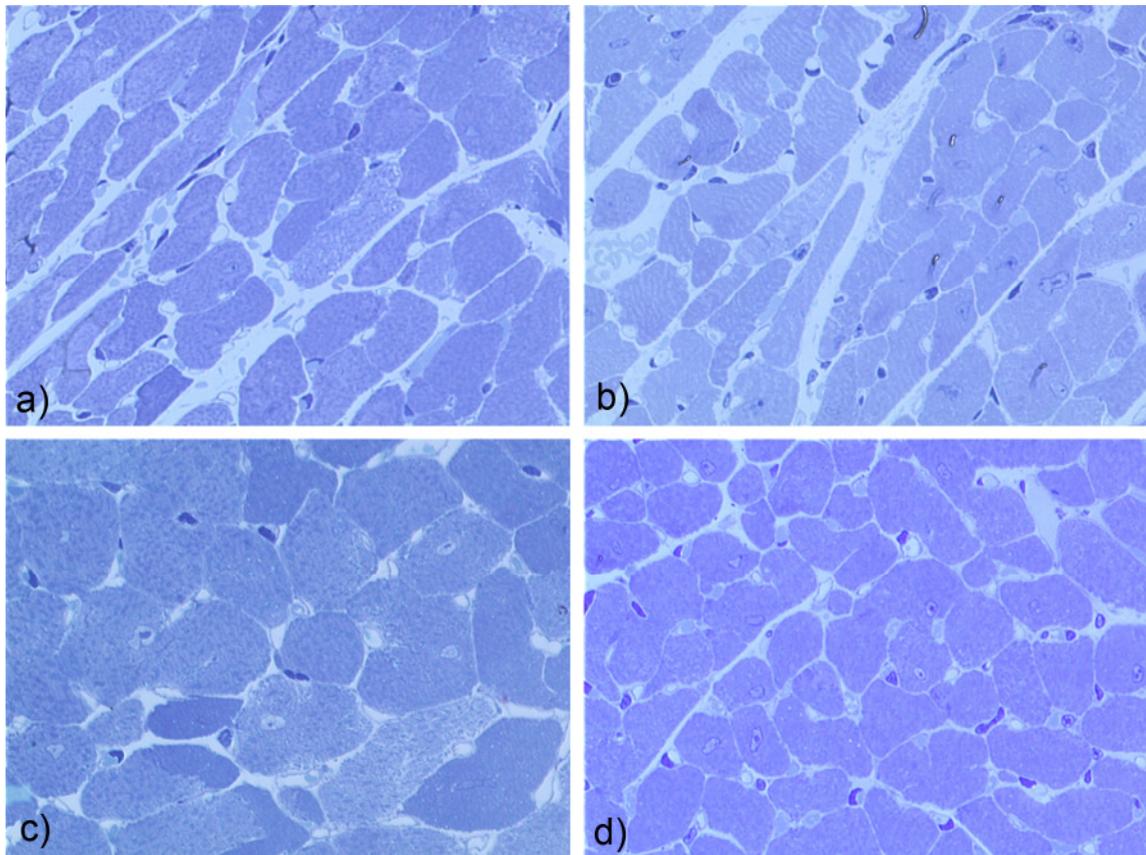


Abbildung 9: Repräsentative Fotografien der kardialen Semidünnschnitte zur Darstellung der Kardiomyozytendiameter im Vergleich. a) : W-K , b) : W-T, c) : D-K, d) : D-T Semidünnschnitte, gefärbt mit Methyleneblau, lichtmikroskopisch in 400facher Vergrößerung abfotografiert

3.2 Funktionelle Daten

Mittels Echokardiografie wurden nach Abschluss der Trainingsphase die basalen Herzfunktionsparameter betrachtet.

3.2.1 Die Ejektionsfraktion

In Abb.8 sind die Ejektionsfraktionen der Tiere dargestellt. Man sieht, dass zwischen den Wildtyp- und den Defekt-Tieren kein relevanter Unterschied besteht. Beide Genotypen wiesen unter Kontrollbedingungen einen ähnlichen relativen Auswurf des linken Ventrikels auf (W-K: $EF = 66.2\% \pm 6.5\%$, $n=3$; D-K: $EF = 68\% \pm 5.9\%$, $n=5$) und auch unter Trainingsbedingungen haben sich die basalen Werte ähnlich entwickelt. Bei beiden Trainingsgruppen kann man eine leichte Erhöhung erkennen, die aber nicht signifikant gegenüber den jeweiligen Kontrolltieren ist (W-T: $EF = 75.2\% \pm 7.2\%$, $n=4$; D-T: $EF = 72.5\% \pm 6.8\%$, $n=4$).

3.2.2 Das linksventrikuläre enddiastolische Volumen (LVED)

Zudem wurden auch die linksventrikulären Volumina betrachtet. In Abb.9 ist das linksventrikuläre enddiastolische Volumen der vier Gruppen dargestellt. Hier kann man einen deutlichen Unterschied zwischen den beiden Genotypen erkennen. Während sich das Volumen bei den Wildtyp-Mäusen nach Abschluss der Trainingsphase leicht, aber nicht signifikant ($p=0,18$), verkleinert im Vergleich zu der Ausgangssituation darstellt (W-K: $ED = 59.8\mu l \pm 15.3\mu l$, $n=3$; W-T: $ED = 42.9\mu l \pm 8.4\mu l$, $n=4$), erkennt man bei den transgenen Tieren einen deutlichen Volumenzuwachs bei den trainierten Tieren verglichen mit der Kontrollgruppe (D-K: $ED = 44.2\mu l \pm 17.8\mu l$, $n=5$; D-T: $ED = 70.1\mu l \pm 15.4\mu l$, $n=4$; $p_{DK/DT} = 0.08$).

Diese Daten zeigen, dass sich durch Training eine vermehrte Dilatation des linken Ventrikels der transgenen Tiere vollzogen hat. Unter Ruhebedingungen wirkt sich dies nicht auf die effektive Pumpfunktion ihrer Herzen aus, die Ejektionsfraktion ist sogar leicht erhöht im Vergleich zu der Kontrollgruppe und vergleichbar mit den Werten der Wildtyp-Trainingsgruppe.

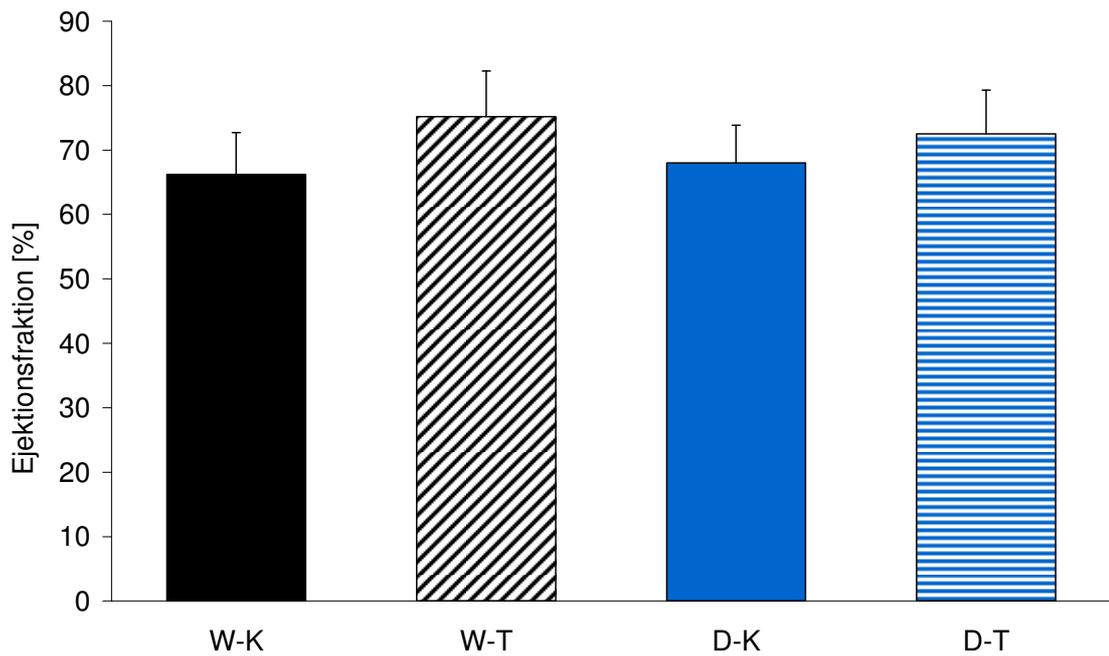


Abbildung 10: Ejektionsfraktion, aufgetragen in MW+STABW. Die Ermittlung der Werte erfolgte mittels Echokardiografie.

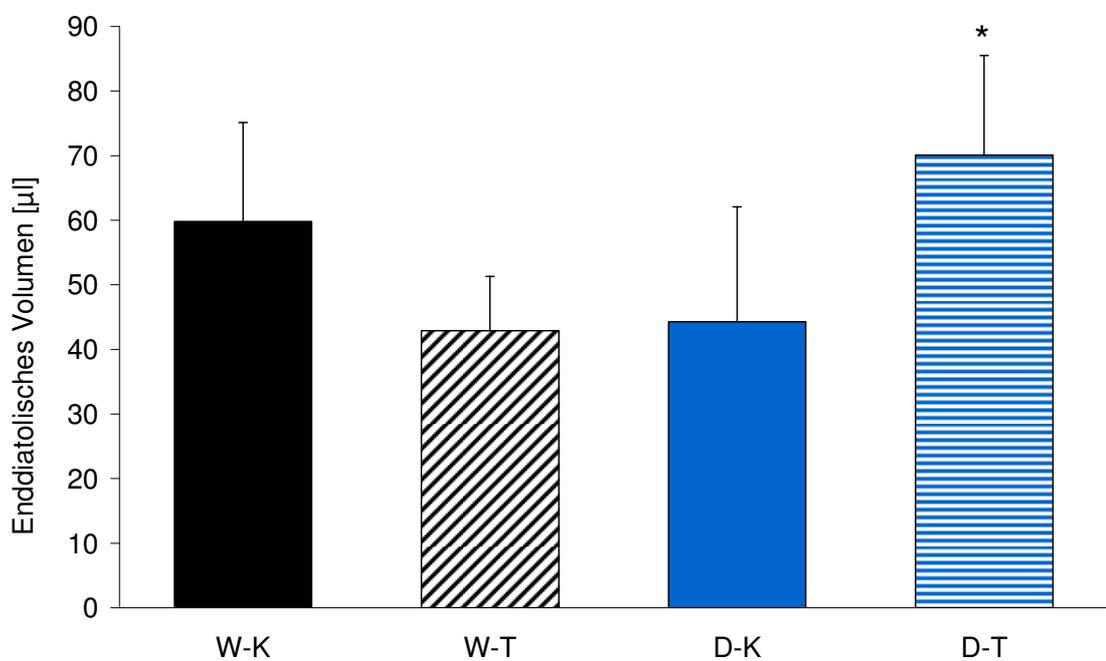


Abbildung 11: LVED, aufgetragen in MW+STABW. Die Ermittlung der Werte erfolgte mittels Echokardiografie.

* :p vs D-K < 0,05

3.3 Histomorphologie

Zur Beurteilung der Histologie wurden HE- und van-Gieson-Färbungen durchgeführt.

3.3.1 HE-Färbung

Die HE-Färbung ist die wohl weitverbreiteste Routine-Färbung für morphologische Untersuchungen. Während das basische Hämalaun alle basophilen, sauren Strukturen (v.a. DNA im Nukleus, ER) blauviolett anfärbt, färbt das saure Eosin alle basischen Strukturen rot, v.a. die Proteine des Zytoplasmas. Daher ist diese Färbung auch sehr gut als Übersichtsfärbung vor immunhistochemischer Weiterverarbeitung der Schnitte geeignet.

Die HE-gefärbten Präparate zeigten lichtmikroskopisch keine zytomorphologischen Unterschiede zwischen den Herzgeweben der verschiedenen Gruppen.

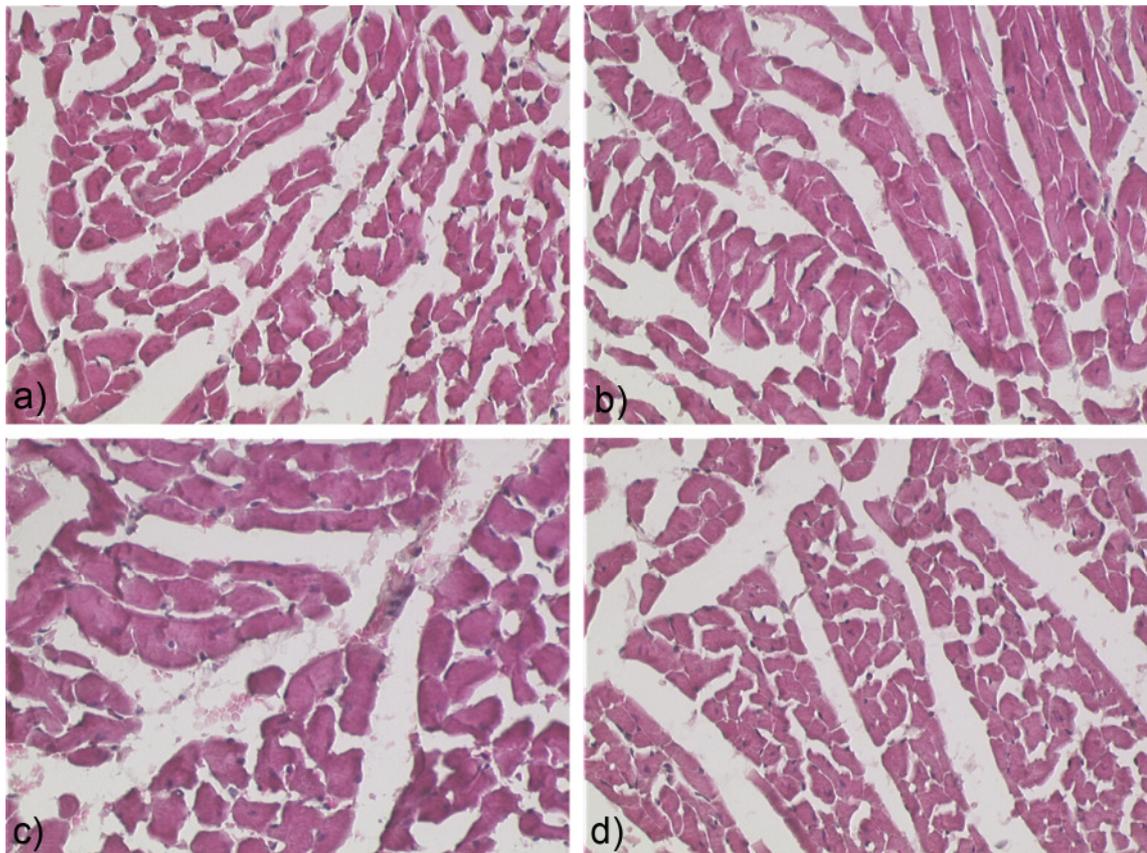


Abbildung 12: Repräsentative Fotografien der HE-gefärbten Myokardschnitte im Vergleich, a) : W-K, b) : W-T, c) : D-K, d) : D-T
Lichtmikroskopisch aufgenommen in 250facher Vergrößerung.

3.3.2 Bindegewebsfärbung nach van Gieson

Bei der Färbung nach van Gieson stellen sich die Muskelzellen bräunlich dar, während sich die elastischen Fasern des Bindegewebes rotviolett anfärben.

Man erhält einen Einblick in die Bindegewebsverteilung des betroffenen Gewebes.

In den vorliegenden Schnitten des Myokards der vier untersuchten Gruppen zeigten sich auch hier lichtmikroskopisch keine Unterschiede zwischen trainierten und untrainierten, bzw. zwischen Knockout- und Wildtyp-Tieren. Die Bindegewebsverteilung ist in allen Gruppen vergleichbar.

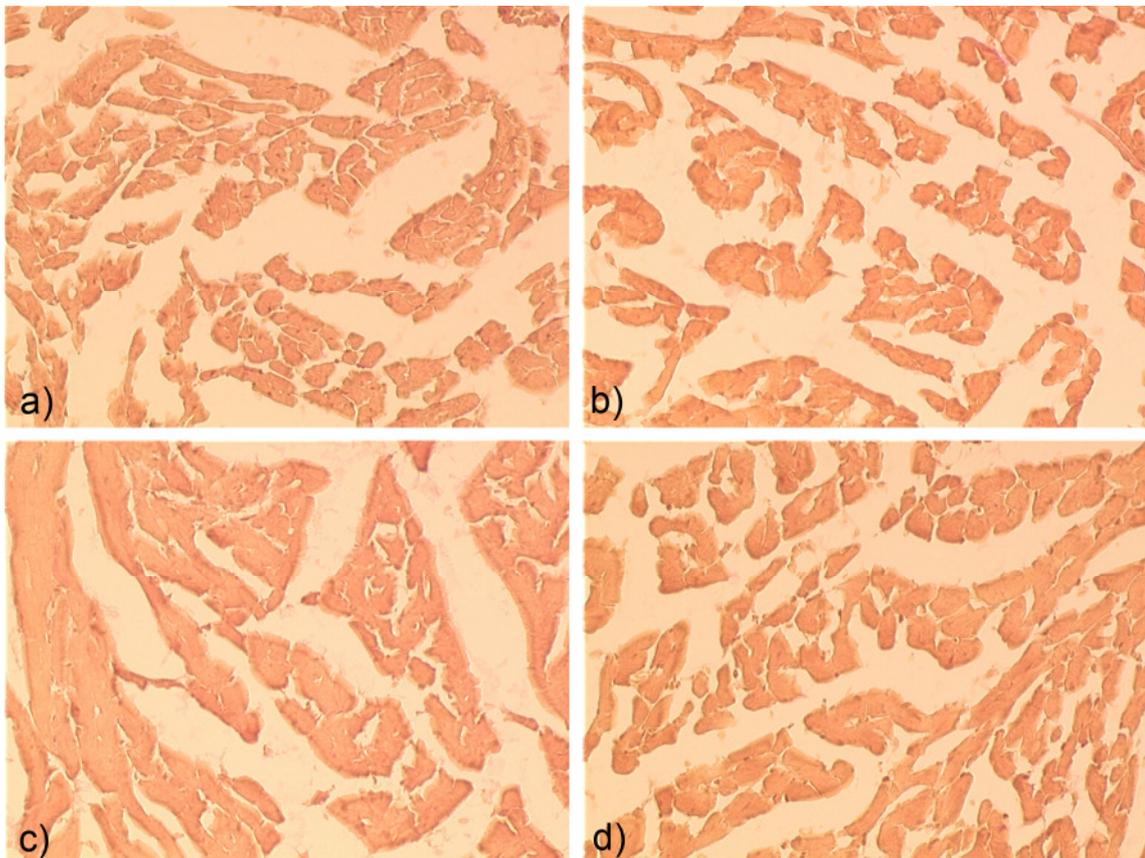


Abbildung 13: Repräsentative Fotografien der nach Van Gieson gefärbten Myokardschnitte im Vergleich, a) : W-K, b) : W-T, c) : D-K, d) : D-T
Lichtmikroskopisch aufgenommen in 250facher Vergrößerung.

3.4 Kapillarisation

3.4.1 Gefäßdichte des Herzmuskels

Um die Kapillarisation des Herzmuskels zu bestimmen, wurde an den Semidünnschnitten die Anzahl aller an einen quergeschnittenen Kardiomyozyten auf Höhe des Zellkerns angrenzenden Kapillare gezählt. Bei der Auswertung dieser Untersuchung zeigte sich, dass beide Kontrollgruppen eine ungefähr gleiche Gefäßversorgung (Gefäße pro Kardiomyozyt) ihrer Myozyten aufwiesen (W-K: 3.91 ± 0.11 , $n=7$; D-K: 3.87 ± 0.27 , $n=9$; $p_{W/K/DK}=0.7$). Bei den Wildtyp-Tieren stellte sich durch das Training eine signifikante Erhöhung der Kapillarisation um ca.15% ein (W-T: 4.5 ± 0.15 , $n=6$; $p_{W/K/WT}=1.2E-05$). Diese Adaptation ließ sich bei den trainierten transgenen Tieren nicht feststellen, die Gefäßdichte war genauso groß wie die der Kontrollgruppe (D-T: 3.9 ± 2.87 , $n=11$).

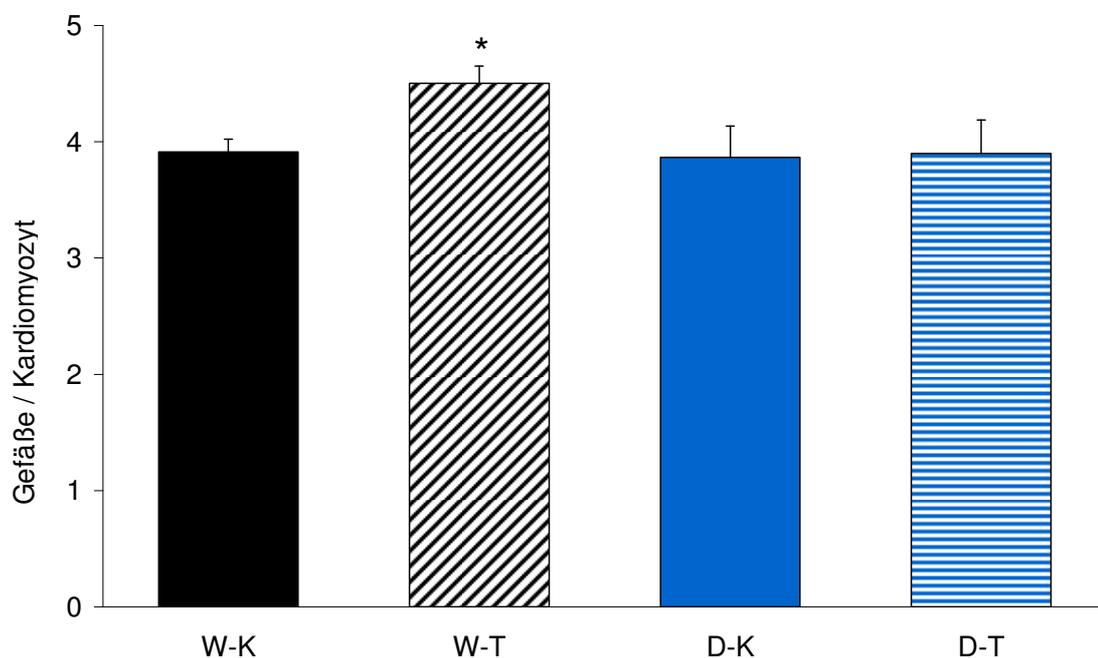


Abbildung 14: Gefäße pro Kardiomyozyt, dargestellt als MW+STABW. Die Auswertung wurde an Semidünnschnitten vorgenommen.

* : p vs W-K < 0,05

3.4.2 VEGF-ELISA

Um diese Ergebnisse auf Proteinebene zu verifizieren, wurde ein VEGF-ELISA durchgeführt. VEGF (vascular endothelial growth factor) ist ein Signalmolekül, welches die Angiogenese positiv beeinflusst [Leung et 1989].

Die VEGF-Konzentration der Wildtyp-Tiere hat unter Trainingsbedingungen signifikant abgenommen (W-K: 32.58 ± 16.77 , $n=7$; W-T: 10.54 ± 4.9 , $n=6$; $p_{W/KWT}=0.0155$).

Bei den MnSOD-Knockout-Gruppen ließ sich eine solche Veränderung nicht feststellen. Nach Abschluss der Trainingsphase zeigte sich die VEGF-Konzentration der trainierten Tiere etwas, aber nicht signifikant, erhöht, verglichen mit der der Kontrolltiere (D-K: 27.66 ± 22.12 , $n=9$; D-T: 39.76 ± 26.96 , $n=9$).

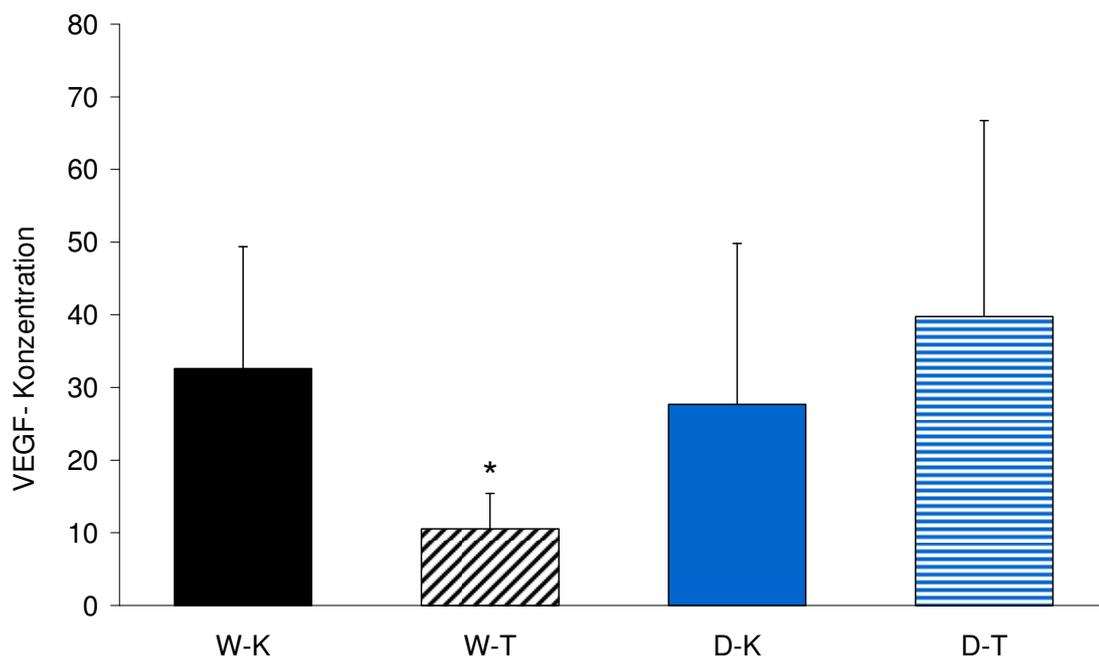


Abbildung 15: VEGF-ELISA, dargestellt als MW+STABW

*: p vs W-K < 0,05

3.5 Immunhistochemie

3.5.1 Oxidativer Stress

In diesem Versuch ist der oxidative Stress von größter Bedeutung. Als Marker dafür wurden die Schnitte immunhistochemisch mit Anti-Nitrotyrosin und Anti-8-Isoprostan gefärbt.

- 8-Isoprostan

8-Isoprostan, bzw. 8-epi-PGF 2α , ist ein Prostaglandin-F 2 -like compound und gehört zu der F 2 -Isoprostan-Klasse, die durch eine Radikalen-katalysierte Peroxidation von Arachidonsäure im Rahmen der Lipidperoxidation entsteht [Morrow et al, 1990]. Daher ist der Nachweis von 8-Isoprostan ein indirekter Nachweis der Schäden durch oxidativen Stress [Milne et al, 2005]. Eine erhöhte Anfärbbarkeit der Zellen spiegelt einen erhöhten Stress durch ROS wider.

Bei den mit Anti-8-Isoprostan gefärbten Schnitten konnte man einen signifikanten Anstieg der Intensität der Färbungen zwischen den Präparaten der Wildtyp-Kontrolltiere (W-K: 15 ± 1.48 ; n=6) und der Wildtyp-Trainingstiere (W-T: 19 ± 2.7 , n=6, $p_{WK/WT} = 0.016$) feststellen. Es besteht auch ein Unterschied zwischen der WK-Gruppe im Vergleich zu der DK-Gruppe, deren Färbungsdichte signifikant erhöht ist (D-K: 18.1 ± 2.2 , n=9, $p_{WK/DK} = 0.012$). Die Intensität der Färbung der trainierten Defekt-Gruppe weicht hingegen nicht von der dazugehörigen Kontrollgruppe ab, nimmt sogar leicht ab (D-T: 17.2 ± 2.4 , n=11).

Man sieht also indirekt einen Anstieg der Radikalendichte in den Wildtyp-Tieren unter Training. Die heterozygoten Knockout-Tiere haben schon unter Kontrollbedingungen ein erhöhtes Radikalenvorkommen, welches unter Trainingsbedingungen ungefähr gleich bleibt.

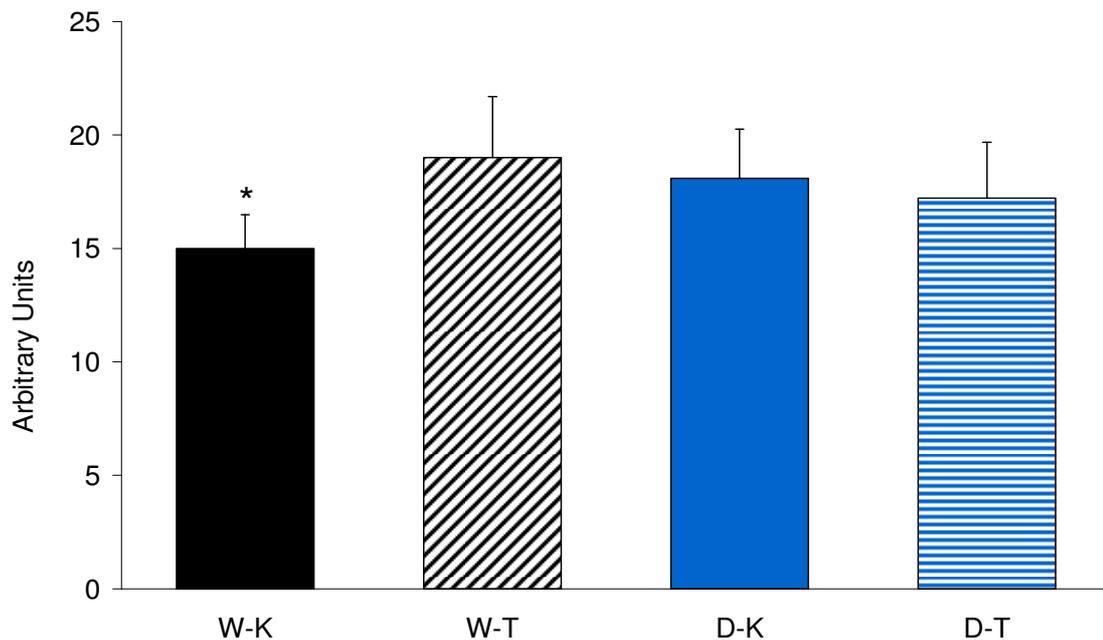


Abbildung 16: Immunhistochemische Auswertung der anti-8-Isoprostan-Färbung. Dargestellt ist die Differenz zwischen dem mean gray value der Zellen und dem des Hintergrundes, aufgetragen als MW+STABW. * : p vs W-T, D-K < 0,05

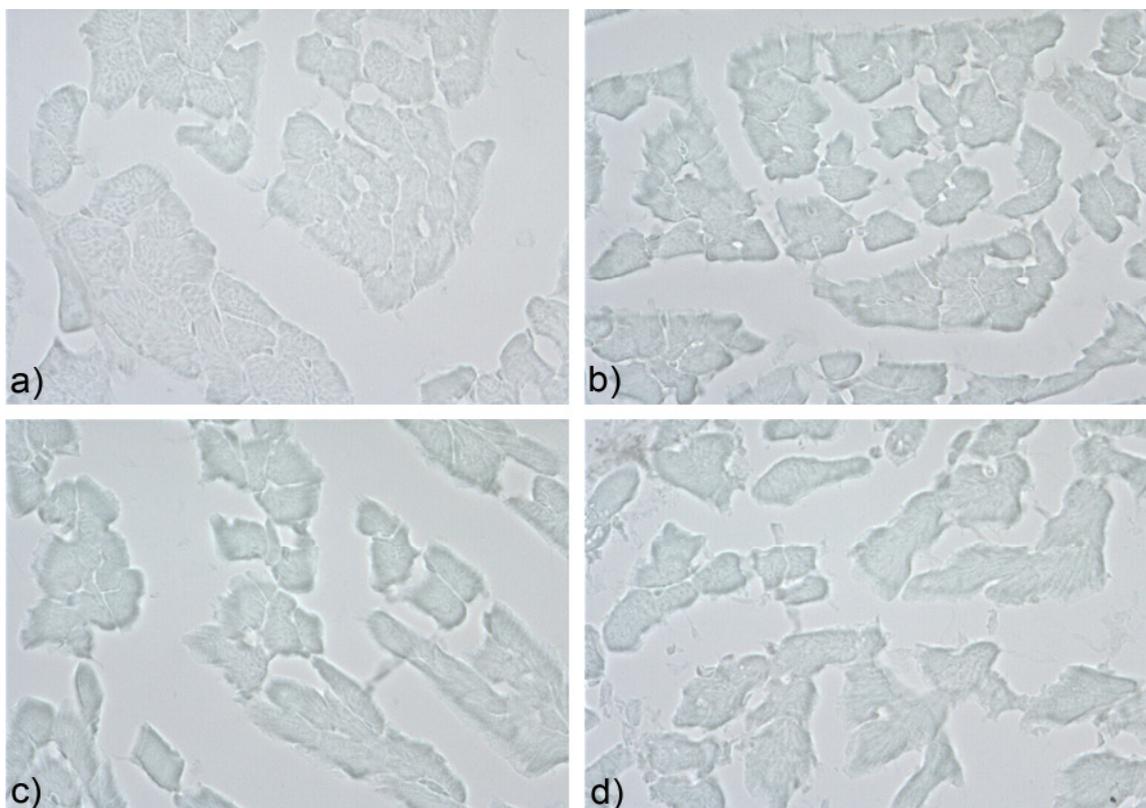


Abbildung 17: Repräsentative Fotografien der anti-8-Isoprostan-gefärbten Kardiomyozyten im Vergleich, a) : W-K, b) : W-T, c) : D-K, d) : D-T Lichtmikroskopisch aufgenommen in 400facher Vergrößerung.

- Nitrotyrosin

Durch den Nachweis von nitrotyrosynilierten Proteinen mittels einer Markierung durch anti-Nitrotyrosin kann indirekt das Vorhandensein von Peroxinitrit in vivo dargestellt werden. Peroxinitrit entsteht bei der Reaktion von Superoxidanionen mit NO [Beckman & Koppenol, 1996].

Bei der Auswertung der mittels anti-3-Nitrotyrosin gefärbten Präparate konnten zwischen allen vier Gruppen keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden (W-K: 15.9 ± 2.2 ; n=7; W-T: 16.3 ± 2.1 ; n=6; D-K: 16.5 ± 2.7 ; n=9; D-T: 15.7 ± 2.0 ; n=11). Dadurch konnte keine Differenz in der Belastung durch Peroxinitrit weder zwischen den Trainings- und Kontrollgruppen noch zwischen den beiden Mäusegenotypen nachgewiesen werden.

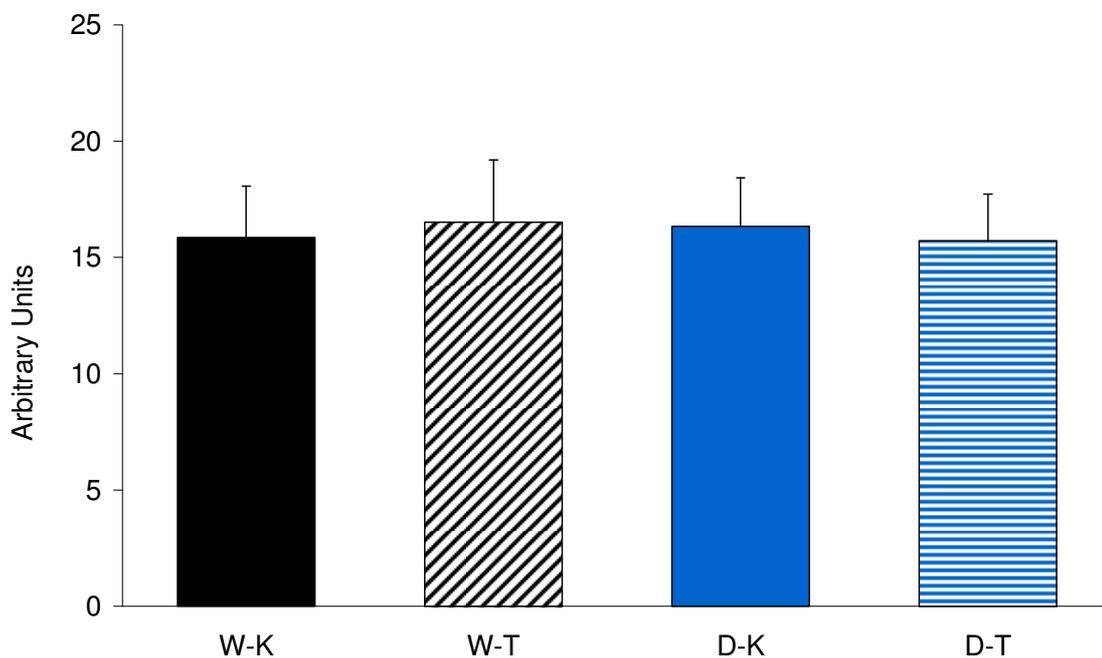


Abbildung 18: Immunhistochemische Auswertung der anti-Nitrotyrosin-Färbung. Dargestellt ist die Differenz zwischen dem mean gray value der Zellen und dem des Hintergrundes, aufgetragen als MW+STABW.

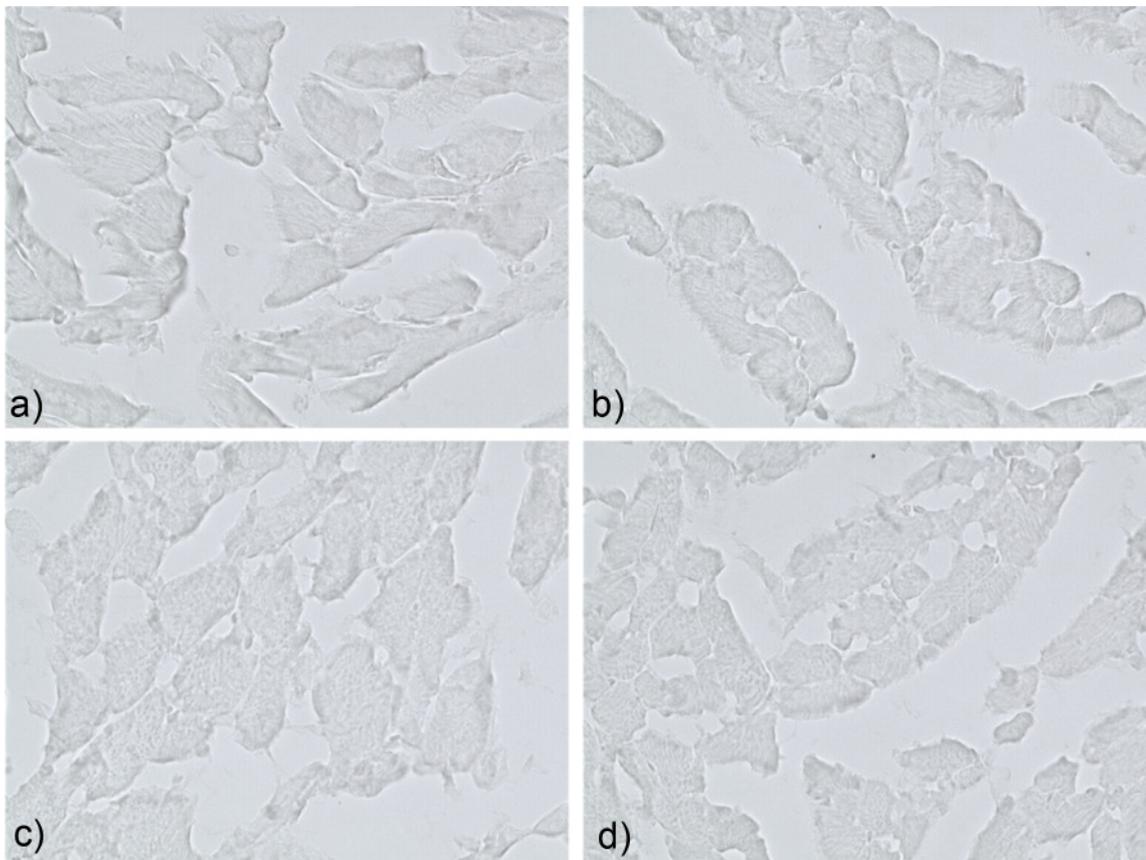


Abbildung 19: Repräsentative Fotografien der anti-Nitrotyrosin-gefärbten Kardiomyozyten im Vergleich, a) : W-K, b) : W-T, c) : D-K, d) : D-T Lichtmikroskopisch aufgenommen in 400facher Vergrößerung.

3.5.2 Apoptoseeinleitung mittels aktivierter Caspase-3

Die Caspase-3 ist als wichtigste Effektorcaspase ein Schlüsselmolekül bei der Einleitung des programmierten Zelltodes [Cohen, 1997].

Bei der immunhistochemischen Auswertung der mit Anti-akt-Caspase-3 gefärbten Schnitte ergab sich nach Abschluss der Trainingsphase kein signifikanter Unterschied zwischen den vier Gruppen (W-K: 8.44 ± 2.13 ; n=5; W-T: 6.88 ± 1.2 ; n=5; D-K: 6.81 ± 1.05 ; n=6; D-T: 7.73 ± 1.37 ; n=7).

Die Apoptoseeinleitung mittels aktivierter Caspase-3 scheint bei den Wildtyp-Tieren durch das Training abzunehmen, bei den Knockout-Tieren hingegen leicht zu steigen, jedoch sind die Unterschiede nicht signifikant.

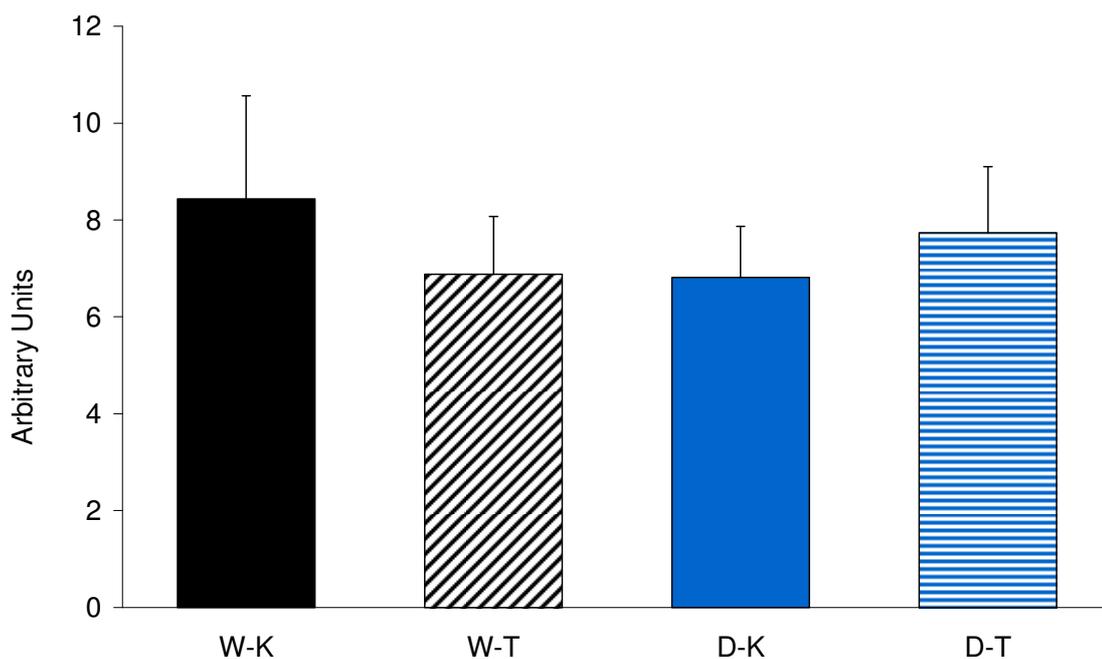


Abbildung 20: Immunhistochemische Auswertung der anti-Caspase3-Färbung. Dargestellt ist die Differenz zwischen dem mean gray values der Zellen und dem des Hintergrundes, aufgetragen als MW+STABW.

3.5.3 Der MAP-Kinase-Signalweg

Mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK) sind Serin-Threonin-spezifische Enzyme, die regulierend auf diverse zellbiologische Prozesse, wie Apoptose, Proliferation und Zelldifferenzierung wirken [Errede *et al*, 1995, Seger *et al*, 1995].

- ERK1/2 (extracellular signal-related kinases 1/2)

ERK1/2 sind zwei verwandte Isoformen einer MAP-Kinase, deren Aktivierung zu Proliferation, Mitose und Zelldifferenzierung führt. Auch wird ihnen ein antiapoptotischer Effekt [Widmann *et al*, 1999] sowie eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der hypertrophen Kardiomyopathie [Wang, 2007] nachgesagt.

Die Auswertung der mit anti-phospho-ERK1/2-gefärbten Schnitte ergab keine signifikanten Unterschiede in der Anfärbbarkeit zwischen den beiden Kontrollgruppen (W-K: 5.75 ± 1.089 ; $n=7$; D-K: 6.15 ± 0.91 ; $n=9$). Bei den Knockout-Mäusen zeigten die Trainingstiere einen signifikant verringerten pERK1/2-Gehalt im Vergleich zur Kontrolle (D-T: 5.25 ± 0.79 ; $n=11$; $p_{DK/DT}=0.043$). Auch bei den Wildtyp-Tieren war eine solche Verminderung zu beobachten, diese war hier jedoch nicht signifikant (W-T: 4.87 ± 0.95 ; $n=6$; $p_{WK/WT}=0.182$).

- P38

Die aktivierte MAPK p38 ist durch die Umsetzung zytoplasmatischer und nukleärer Transkriptionsfaktoren an apoptosefördernden und inflammatorischen Prozessen beteiligt [Graves *et al*, 1996].

Bei den mit anti-akt-p38 gefärbten Schnitten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen. (W-K: 6.9 ± 1.43 ; $n=6$; W-T: 6.0 ± 1.78 ; $n=5$; D-K: 6.67 ± 2.24 ; $n=6$; D-T: 6.8 ± 1.74 ; $n=7$).

Die Aktivierung beider o.g. MAPK-Signalwege scheint bei den Wildtyp-Tieren nach Abschluss der Trainingsphase leicht, aber nicht signifikant, vermindert zu sein. Die heterozygoten Knockout-Mäuse weichen unter Kontrollbedingungen nicht von den Wildtypen ab. Nach dem Training zeigte sich bei ihnen eine signifikante Verminderung der ERK1/2- bei gleich bleibender p38-Aktivierung.

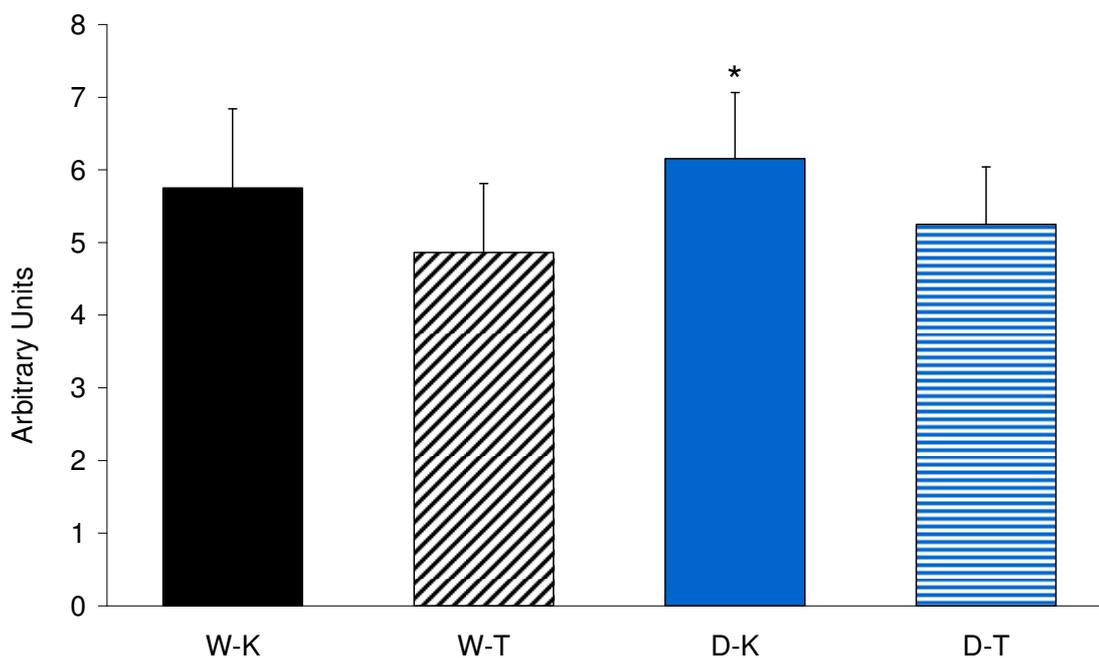


Abbildung 21: Immunhistochemische Auswertung der anti-phospho-ERK1/2-Färbung. Dargestellt ist die Differenz zwischen dem mean gray value der Zellen und dem des Hintergrundes, aufgetragen als MW+STABW.
* : p vs DT < 0,05

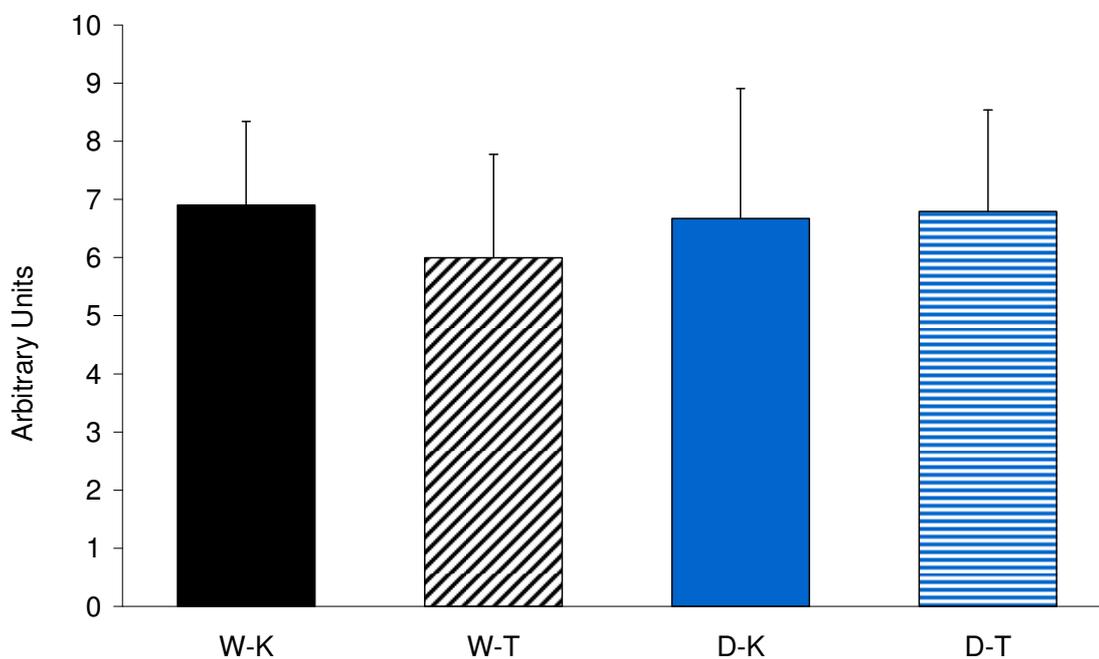


Abbildung 22: Immunhistochemische Auswertung der anti-akt-p38-Färbung. Dargestellt ist die Differenz zwischen dem mean gray value der Zellen und dem des Hintergrundes, aufgetragen als MW+STABW.

3.5.4 Phospho-AKT

Die Serin-Threonin-Kinase AKT mit ihren drei Isoformen AKT₁₋₃, auch Proteinkinase B genannt, schützt in ihrer phosphorylierten Form das Überleben der Zelle, indem sie proapoptotische Faktoren wie BAD und Caspase 9 hemmt [Franke et al, 2003].

Der Gehalt an phosphorylierter, also aktivierter, AKT₁ stellte sich in den Kardiomyozyten der vier untersuchten Gruppen ohne signifikante Unterschiede dar (W-K: 6.61 ± 1.63 ; n=7; W-T: 7.97 ± 1.53 ; n=5; D-K: 8.51 ± 2.83 ; n=7; D-T: 6.9 ± 2.09 ; n=8).

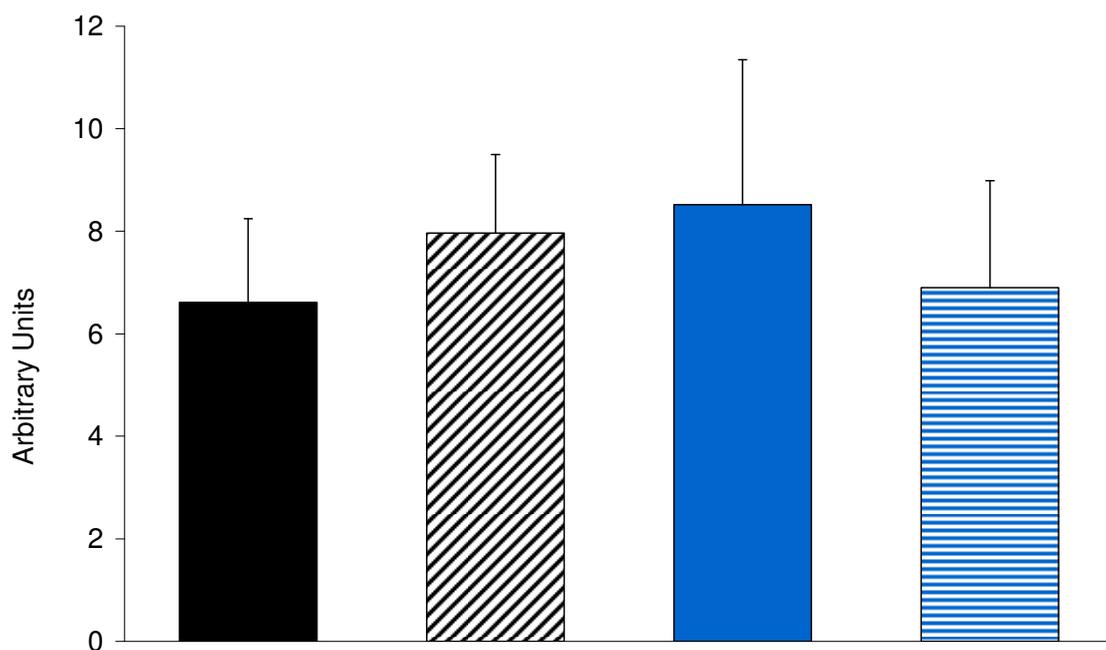


Abbildung 23: Immunhistochemische Auswertung der anti-pAKT₁-Färbung. Dargestellt ist die Differenz zwischen dem mean gray value der Zellen und dem des Hintergrundes, aufgetragen als MW+STABW.

* : p vs WK < 0,05

3.5.5 Peroxiredoxine

Diese erst in den letzten zwei Jahrzehnten entdeckte Enzymfamilie mit ihren bisher sechs Säugetier-Isoformen hat neben ihrer Peroxidaseaktivität vielfältige andere biologische Funktionen in der Zelle.

- Prx1

Durch das Training ergab sich ein signifikanter Anstieg des Prx1 in der Knockout-Gruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren (D-K: 21.26 ± 1.65 ; $n=6$; D-T: 24.96 ± 3.27 ; $n=6$; $p=0.047$), während ein zu beobachtender leichter Anstieg bei den Wildtyp-Gruppen unsignifikant war (W-K: 20.98 ± 2.27 ; $n=6$; W-T: 23.91 ± 3.77 ; $n=6$).

- Prx2

Die durchgeführte immunhistochemische Färbung zeigte, dass der Gehalt an Prx2 im Kardiomyozyt beider Wildtyp-Gruppen vergleichbar ist (W-K: 15.11 ± 2.04 ; $n=6$; W-T: 15.9 ± 4.81 ; $n=6$), während die Defekt-Tiere der Kontrollgruppe einen dazu signifikant erhöhten Gehalt haben (D-K: 18.27 ± 1.87 ; $n=6$; $p_{WK/DK} = 0.028$), der bei der Trainingsgruppe (D-T: 15.2 ± 2.6 ; $n=6$) dazu tendenziell ($p_{DK/DT} = 0.054$) abfällt.

- Prx3

Hier zeigt sich bei beiden Genotypen parallel eine signifikante Erhöhung der Enzymkonzentration bei den Trainingstieren im Vergleich zu den Kontrolltieren.

(W-K: 16.91 ± 1.11 ; $n=6$; W-T: 21.52 ± 3.55 ; $n=6$; $p_{WK/WT} = 0.02$;

D-K: 16.27 ± 1.72 ; $n=6$; D-T: 21.02 ± 3.8 ; $n=6$; $p_{DK/DT} = 0.029$)

- Prx4

Bei der Auswertung der anti-Prx4-gefärbten Präparate ergaben sich deutliche Unterschiede zwischen beiden Genotypen. Die Werte der Kontrollgruppen wichen signifikant voneinander ab (W-K: 17.86 ± 2.95 ; $n=6$; D-K: 11.83 ± 3.92 ; $n=6$; $p_{WK/DK} = 0.02$). Während sich der Prx4-Gehalt unter Trainingsbedingungen bei den Wildtyp-Tieren signifikant erniedrigt (W-T: 9.56 ± 3.78 ; $n=6$;

$p_{WK/WT}=0.0031$), zeigte er sich bei den Heterozygoten erhöht im Vergleich zur Referenzgruppe (D-T: 15.2 ± 4.99 ; $n=6$; $p_{DK/DT}=0.0073$).

- Prx5

Der Einfluss des Trainings scheint bei den Wildtyp-Tieren eine signifikante Verminderung des Prx5 Gehaltes hervorgerufen zu haben (W-K: 18.34 ± 2.23 ; $n=6$; W-T: 15.43 ± 1.29 ; $n=6$; $p_{WK/WT}=0.03$). Die Mäuse mit dem Gendefekt hatten schon in der Kontrolle einen signifikant erniedrigten Wert (D-K: 15.79 ± 1.25 ; $n=6$; $p_{WK/DK}=0.0499$), der bei den Trainingstieren vergleichbar blieb (D-T: 16.15 ± 2.33 ; $n=6$).

- Prx6

Auch der Wert dieser Prx-Isoform war bei der Kontrolle der Wildtypen signifikant höher, als der der $MnSOD^{+/-}$ -Tiere (W-K: 25.45 ± 5.14 ; $n=6$; D-K: 19.39 ± 2.92 ; $n=6$; $p_{WK/DK}=0.045$). Bei den Trainingstieren zeigte sich eine signifikante Verminderung bei den $MnSOD^{+/+}$ -Tieren im Vergleich zur Kontrolle (W-T: 17.66 ± 2.93 ; $n=6$; $p_{WK/WT}=0.015$), während eine Verminderung bei den Knockout-Tieren nicht signifikant war (D-T: 16.46 ± 6.84 ; $n=6$).

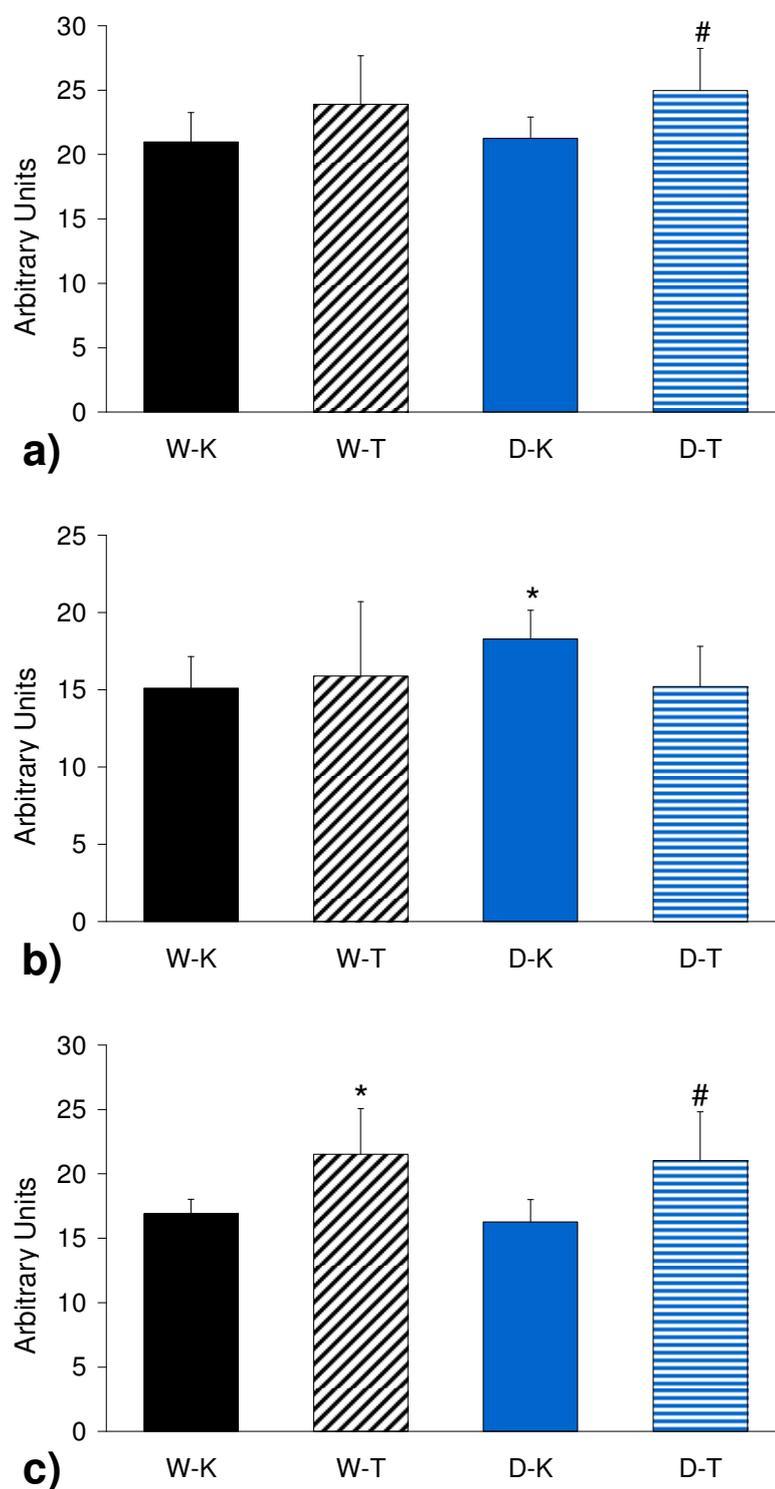


Abbildung 24: Immunhistochemische Auswertung der anti-Prx-Färbungen:
 a) : Prx1, b) : Prx2, c) : Prx3. Dargestellt ist die Differenz zwischen dem mean gray value der Zellen und dem des Hintergrundes, aufgetragen als MW+STABW.

* : p vs W-K < 0,05;

: p vs D-K < 0,05

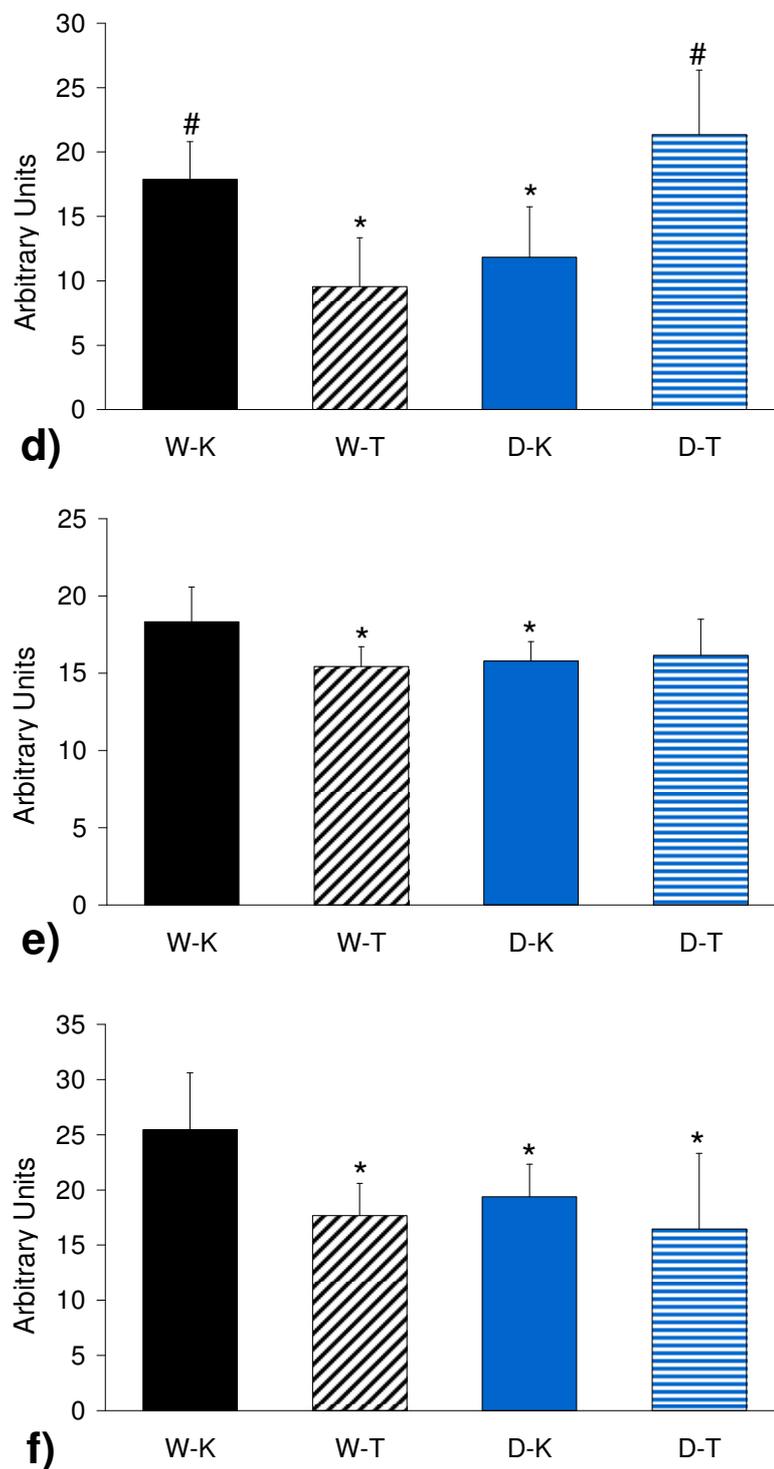


Abbildung 25: Immunhistochemische Auswertung der anti-Prx-Färbungen:
 d) : Prx4, e) : Prx5, f) : Prx6. Dargestellt ist die Differenz zwischen dem mean gray value der Zellen und dem des Hintergrundes, aufgetragen als MW+STABW.

* : p vs W-K < 0,05;

: p vs D-K < 0,05

4. Diskussion

Die Bedeutung der MnSOD für das Leben von Säugetieren wurde bisher durch viele Tiermodelle untermauert. Homozygote Knockout-Mäuse sind nicht überlebensfähig, während heterozygote Tiere zwar verschiedene Krankheitsbilder, aber dennoch eine annähernd normale Lebensdauer aufweisen [Lebovitz et al, 1996, Li et al, 1995; Van Remmen et al, 2001].

Die von Strassburger und Mitarbeitern beschriebenen heterozygoten MnSOD-Knockout Mäuse waren trotz nachgewiesener radikaleninduzierter Schädigung im Herzmuskelgewebe klinisch unauffällig und nicht im Überleben eingeschränkt [Strassburger, Bloch et al, 2005]. Im Gegensatz zu früheren Beobachtungen [Kinugawa et al, 2005] zeigten sich die Mäuse sehr belastungsfähig, wir konnten keine vermehrte Ermüdbarkeit, verglichen mit den Wildtyp-Tieren, während des Trainings beobachten. Diese Einschätzung erfolgt jedoch nur aufgrund einer Beobachtung, es wurden keine quantifizierenden Untersuchungen diesbezüglich durchgeführt.

Dies verstärkt die Frage nach den Adaptationsmechanismen der beobachteten Mäuse unter einer solchen Situation erhöhten oxidativen Stresses. In der vorliegenden Studie wurde daher der Einfluss von Ausdauertraining auf die Herzen der beschriebenen transgenen Mäuse untersucht.

4.1 Morphometrische und funktionelle Adaptation der Herzen von MnSOD^{+/-}-Mäusen nach Ausdauertraining

Oxidativer Stress kann zu myokardialer Hypertrophie, Apoptose und interstitieller Fibrose führen. Dies alles sind Vorgänge, die eine entscheidende Rolle im kardialen Remodelling und der Entwicklung einer Herzinsuffizienz spielen [Belch et al, 1991, Tsutsui et al, 2009]. Im Einklang dazu wurde das beschriebene Mausmodell als geeignetes Herzinsuffizienzmodell beschrieben [Strassburger, Bloch et al, 2005]. Diese Hypothese kann durch unsere Untersuchung bestätigt werden, denn die von uns beobachteten transgenen Mäuse entwickelten eine Herzhypertrophie, die sich unter Trainingseinfluss zu einem dilatativen Phänotyp transformierte.

Bei der Betrachtung des Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnisses zeigte sich eine signifikante Vergrößerung der Herzen der SOD2-defizienten Tiere verglichen mit den Wildtyp-Tieren, unabhängig vom Trainingszustand der Mäuse. Dies steht im Einklang mit früheren Beobachtungen, die zeigten, dass ein MnSOD-Defizit zu einer Kardiomyopathie führen kann [Li et al, 1995, Huang et al, 2001].

Im Vergleich zu den Kontrollgruppen ergab sich bei den trainierten Mäusen beider Genotypen keine Erhöhung des Herzgewicht-/Körpergewichtsquotienten, wie man nach Trainingseinfluss vermuten könnte. Aber schon frühere Untersuchungen zeigten, dass dieser Effekt bei Mäusen im Laufversuch nicht so stark ausgeprägt ist wie beispielsweise im Schwimmversuch [Niebauer et al, 1999; Evangelista et al, 2003].

Die Auswertung der Kardiomyozytendurchmesser ergab bei den Kontrollgruppen eine signifikante Vergrößerung der Zellen der Knockout-Tiere im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren, die das Vorliegen einer kardialen Hypertrophie bei den Knockouts untermauert.

Die trainierten heterozygoten MnSOD-Mäuse wiesen demgegenüber, verglichen mit ihrer Kontrollgruppe, signifikant verkleinerte Zelldurchmesser im Herzmuskelgewebe auf. Bei gleichbleibender Herzmasse und konstantem Zellvolumen kann dies ein Hinweis auf eine Verlängerung der Kardiomyozyten bei gleichzeitiger Umfangsminderung im Rahmen einer Dilatation des Herzmuskelgewebes sein, die in Folge der kardialen Mehrbelastung durch Ausdauertrainings aufgetreten ist. Diese Vermutung wird durch die unten aufgeführte Echokardiografie bestätigt.

Die nach Abschluss der Trainingsphase echokardiografisch bestimmten funktionellen Daten zeigten bei beiden Genotypen vergleichbar eine leichte, nicht signifikante, Erhöhung der Ejektionsfraktionen der trainierten gegenüber den untrainierten Tieren, die auf eine Verbesserung der Herzleistung durch das Training zurückzuführen sein kann [Fagard, 2003, Urhausen et al, 1999].

Die enddiastolischen linksventrikulären Volumina zeigten bei den trainierten MnSOD^{+/-}- Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Vergrößerung der Ventrikelfüllung.

Diese Ergebnisse sprechen gemeinsam mit dem Verhalten der Kardiomyozyten-durchmesser für eine Dilatation der Herzen der MnSOD-Knockout-Mäuse unter Ausdauertraining. Die körperliche Betätigung und die damit einhergehende vermehrte Radikalenexposition in der akuten Trainingssituation scheint die schon in Kontrollsituation bestehende kardiale Hypertrophie ungünstig zu beeinflussen und die Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie beim heterozygoten MnSOD-Genotyp zu unterstützen.

Die Auswertung der Ejektionsfraktionen zeigt aber, dass die Herzfunktion der transgenen Tiere in Ruhe stabil und gut kompensiert ist. Da diese Erkenntnisse aus Untersuchungen unter Ruhebedingungen gewonnen wurden, können leider keine Aussagen über eine Kompensation während des Trainings gemacht werden.

Bei der Betrachtung der Kapillarisation zeigte sich bei den Wildtyp-Tieren das zu erwartende Ergebnis: Der Trainingsstimulus führte zu einer Neovaskularisierung mit einer signifikant erhöhten Kapillardichte gegenüber der Kontrollgruppe [Hudlickà et al, 1995].

Das Signalmolekül VEGF (vascular endothelial growth factor), welches die Angiogenese fördert, wird durch Hypoxie in minderversorgtem Gewebe, Dehnung und diverse Zytokine und Onkogene induziert [Neufeld et al, 1999, Zheng et al, 2001]. Auch ROS scheinen eine entscheidende Rolle im VEGF-Signalweg zu spielen [Maulik, 2002; Ushio-Fukai & Alexander, 2004].

Die Auswertung der kardialen VEGF-Konzentration zeigte einen signifikanten Abfall zwischen den Kontroll- und Trainingsgruppen der MnSOD^{+/+}-Mäuse. Hierbei ist zu beachten, dass das Training schon 2 Monate zuvor begonnen hatte. Eine Studie von Lloyd und Mitarbeitern hat gezeigt, dass der VEGF-Spiegel bereits wenige Tage nach Beginn des Ausdauertrainings ansteigt, um bald darauf wieder steil abzufallen [Lloyd et al, 2003]. So kann man dieses Ergebnis auf einen schon zu

Beginn der Trainingsphase zurückliegenden Anpassungsvorgang mit anschließender Down-Regulation der VEGF-Expression zurückführen.

Bei den Knockouts hingegen scheint hier die Adaptation an das Ausdauertraining und ein damit verbundenes verbessertes Sauerstoffangebot auszubleiben. Die Kapillarisation pro Myozyt unter Trainingseinfluss und Kontrollbedingung war gleich bleibend. Dementsprechend präsentierte sich der VEGF-Spiegel bei den Knockout-Trainings-Tieren nur leicht, nicht signifikant, erhöht gegenüber ihrer Kontrollgruppe.

Während wir bei den Wildtyp-Mäusen einige der lang bekannten und oft beschriebenen Adaptationsmechanismen am Herzen durch Ausdauertraining nachweisen konnten, zeigten die MnSOD-Knockout-Mäuse signifikante Abweichungen. Die erhöhte Radikalenbelastung führt bei diesen zur Ausbildung einer kardialen Dilatation bei vorbestehender Herzhypertrophie und zu einem Ausbleiben einer dem Training angemessenen Neovaskularisierung.

4.2 Oxidativer Stress und Zelltod

Da heterozygote MnSOD-Knockout-Mäuse als solche schon einen erhöhten oxidativen Stress aufweisen [Strassburger, Bloch et al, 2005], stellt sich in diesem Modell natürlich die Frage, wie sich die Radikalenbelastung in der Situation durch Training gesteigerten oxidativen Stresses verhält.

Bei den Kontrolltieren konnten wir mithilfe der anti-8-Isoprostano-Färbung immunhistochemisch einen deutlichen Unterschied zwischen Wildtyp- und Knockout-Tieren darstellen. Die transgenen Mäuse wiesen hier einen signifikant höheren oxidativen Schaden als die untrainierten MnSOD^{+/+}-Mäuse auf, womit wir die Beobachtungen der Gruppe um Strassburger und Bloch [Strassburger, Bloch et al, 2005] erweitern konnten. Die schon von ihnen am 10. Lebensstag beobachtete vermehrte Lipidperoxidation im Herzgewebe heterozygoter MnSOD-Mäuse ist auch noch nach einem Lebensalter von 5-6 Monaten nachzuweisen. Eine vollständige Kompensation hat demnach nicht stattgefunden.

Dass der erhöhte Sauerstoffumsatz bei körperlicher Betätigung auch zu oxidativem Stress führen kann, ist allgemein anerkannt [Ohkuwa et al, 1997, Navarro-Arévalo et al, 1999]. Bei den Wildtyp-Mäusen konnten wir dementsprechend auch eine erhöhte Anfärbarkeit in der Trainingsgruppe aufzeigen. Die Trainingsgruppe der MnSOD^{+/-}-Tiere zeigte hier jedoch keinen weiteren Anstieg zu der schon im Kontrollzustand erhöhten Radikalenbelastung, die Tiere waren in der Lage, den zusätzlichen oxidativen Stress, zumindest längerfristig, zu kompensieren.

Bei der Untersuchung des nitrosativen Stresses mittels einer immunhistochemischen anti-Nitrotyrosin-Färbung zeigte sich kein Unterschied zwischen allen 4 Gruppen. Die Belastung des Herzgewebes durch Peroxynitrit zum Zeitpunkt der Fixierung war bei sowohl beiden Genotypen, als auch bei Trainings- und Kontroll-Tieren vergleichbar.

Zu einer Caspase3-Aktivierung und damit zur Einleitung der geordneten Zellzerstörung, kann es durch viele extrinsische (TNF, Fas, Zytokine, Entzug von Wachstumsfaktoren) und intrinsische Stimuli (p53, Cytochrom-c-Freigabe aus den Mitochondrien) [Green et al, 1998; Thornberry et al, 1998] kommen. Auch ROS [Dumont et al, 1999] können diesen Signalweg induzieren. Daher wäre eine erhöhte Apoptoserate bei den MnSOD^{+/-}-Mäusen zu erwarten gewesen, wie sie auch von Strassburger und Mitarbeitern beobachtet wurde [Strassburger, Bloch et al, 2005]. Die Untersuchung der Apoptoseeinleitung mithilfe einer anti-Caspase3-Färbung ergab jedoch zu dem von uns untersuchten Zeitpunkt keine signifikanten Unterschiede zwischen den vorhandenen Gruppen. Sowohl die trainings-induzierte als auch die genetisch bedingte Radikalenmehrbelastung führt bei den heterozygoten MnSOD-Knockouts also nicht zu einer vermehrten Caspase-vermittelten Apoptoseeinleitung in den Kardiomyozyten.

Insgesamt konnten wir bei den Knockout-Mäusen indirekt eine erhöhte Lipidperoxidation mithilfe der Anti-8-Isoprostan-Färbung gegenüber der Wildtyp-Kontroll-Gruppe aufweisen. Das Training verstärkt diesen Effekt jedoch nicht.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Gruppe um Strassburger und Bloch konnten wir zum Untersuchungszeitpunkt keinen erhöhten nitrosativen Stress und keine erhöhte Apoptoseeinleitung bei den MnSOD-Knockout-Tieren im Vergleich zum homozygoten Genotyp nachweisen [Strassburger, Bloch et al, 2005]. Die in deren Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurden jedoch an Mäusen im Alter von höchstens 10 Tagen vorgenommen, so dass man vermuten kann, dass die Mäuse in der Zeit bis zum Erreichen ihres 5., bzw. 6. Lebensmonates sich weitgehend an einen Zustand erhöhten oxidativen/ nitrosativen Stress unter Ruhebedingungen adaptieren konnten.

Eine chronische zelluläre/ mitochondriale Mehrbelastung durch oxidativen Stress konnte hier nicht als direkter Auslöser des kardialen Remodellings der heterozygoten Knockout-Mäuse nachgewiesen werden. Die akute Belastung des Herzens durch ROS während des Trainings konnte mit dem Versuchsaufbau jedoch nicht beurteilt werden.

4.3 Redoxregulative Signalwege und antioxidative Kapazität

Die MAP-Kinasen pERK1/2 und p38 sind Angehörige einer umfangreichen Enzymfamilie, die über komplexe Signaltransduktionswege in diverse zellbiologische Prozesse, wie Apoptose, Differenzierung und Proliferation eingreifen [Wang, 2007]. Unter anderem bewirkt mechanische Dehnung die Aktivierung von MAP-Kinase-Signalwegen [Komuro et al, 1996, Ruwhof et al, 2000].

ERK1/2 werden am Ende einer mitogenen Raf-MEK-ERK-Kaskade aktiviert [Pearson et al, 2001], die durch Wachstumsfaktoren, z.B. EGF (epidermal growth factor), PDGF (platelet derived growth factor), und diverse Zytokine induziert wird. Die MAPK p38 wird unter anderem durch Interleukin 1 β , TNF α und chemischen und physikalischen Stress (Hitze, UV-Strahlen, osmotischer Stress) aktiviert [Raingeaud et al, 1995].

Während dem ERK1/2-Signalweg eine wichtige Funktion in der Proliferation (auch im Sinne einer kardialen Hypertrophie) und dem Zellüberleben zugeschrieben

wird [Widmann et al, 1999, Wang, 2007], wird die Rolle der p38-Aktivierung für die Apoptose und inflammatorische Prozesse in der Literatur diskutiert [Graves et al, 1996].

Die Betrachtung dieser beiden Signalwege ergab für die Wildtyp-Tiere eine nicht signifikante Verringerung sowohl der p38- als auch der ERK- Aktivierung bei den trainierten Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Bei den MnSOD^{+/-}-Mäuse hingegen konnten wir im Vergleich zur Kontrolle einen gleich bleibenden Spiegel des p38-Gehaltes sowie einen signifikant verminderten pERK1/2-Gehalt in den Kardiomyozyten der Trainierten feststellen, sodass man von einer Verschiebung zum proapoptotischen Signalweg sprechen kann.

Eine Erniedrigung der ERK1/2-Aktivierung im Kardiomyozyten wird in der Literatur mit einer verstärkten Vulnerabilität gegenüber Stress-induzierter Apoptose und Herzversagen in Verbindung gebracht. [Wang, 2007]. Dieser Zusammenhang konnte bei diesen Tieren nicht nachgewiesen werden. Zwar war der Spiegel an aktivierten ERK bei den trainierten MnSOD^{+/-}-Mäusen erniedrigt, aber eine erhöhte Apoptoserate konnte nicht gezeigt werden.

Ein weiteres zelluläres antiapoptotisches Agens ist das phosphorylierte AKT [Kennedy et al, 1999, Franke et al, 2003], dessen Aktivierung eine wichtige Rolle in der trainingsinduzierten physiologischen Hypertrophie zugesprochen wurde [Kemi et al, 2008].

Ähnlich wie bei der p38-Auswertung konnten wir hier keine signifikanten Unterschiede feststellen. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass die Untersuchungsbedingungen nur einen Einblick in den Zellhaushalt unter basalen, also Ruhebedingungen, zulässt. Inwieweit die Werte direkt nach einem Trainingsstimulus verändert sind, kann hiermit nicht beantwortet werden und sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Im Gesamten scheint bei den betrachteten Signalwegen aufgrund der pERK-Erniedrigung der proapoptotische Anteil bei den transgenen Tieren zu überwiegen. Die Situation erhöhten oxidativen Stresses führt zu einem Verschieben des

Gleichgewichts der beschriebenen Signalwege in Richtung des proapoptischen. Dennoch können durch die Ergebnisse dieser Auswertungen die Entwicklung des speziellen kardialen Phänotyps im Hinblick auf das kardiale Remodelling nicht geklärt werden und muss in zukünftigen Experimenten untersucht werden.

Die Familie der Peroxiredoxine ist eine relativ neu beschriebene Enzymgruppe, die neben ihren antioxidativen Eigenschaften auch regulativ in vielfältige zelluläre Signalwege eingreift. Eine besondere Rolle wird ihnen unter Stressbedingungen nachgesagt [Rhee et al, 2005].

Den beiden zytosolischen Isoformen Prx1 und 2 wird eine antiapoptische Funktion zugesprochen [Zhang et al, 1997; Fujii et al, 2002]. Zudem wird in einer aktuellen Untersuchung eine Korrelation zwischen Prx2-Expression und Schweregrad einer Herzinsuffizienz aufgezeigt [Cieniewski-Bernard et al, 2008]. Die Prx3 spielte in unserem Versuchsaufbau eine besondere Rolle, da sie, wie die MnSOD, ein mitochondriales Enzym ist und durch ROS induziert wird [Rhee et al, 1999]. Das Prx4 liegt intrazellulär vor, wird aber auch aktiv sezerniert und wirkt fördernd auf inflammatorische Prozesse [Immenschuh et al, 2005; Haridas et al, 1998]. Die Isoform, die auf die meisten Zellkompartimente verteilt ist, ist das Prx5. Man findet es im Zytoplasma, in den Mitochondrien und den Peroxisomen, wo es antioxidativ und antiapoptisch wirkt [Fujii et al, 2002]. Peroxiredoxin 6 ist eine rein zytoplasmatische Isoform, die auch eine Phospholiapase-A₂-Aktivität aufweist [Chen et al, 2000].

Unsere Untersuchung war die erste, die sich mit dem Verhalten von Peroxiredoxinen unter Ausdauertraining beschäftigt. Daher konnten unsere Ergebnisse nicht im direkten Vergleich mit denen anderer Studiengruppen betrachtet werden.

Bei Peroxiredoxin 3 konnten wir bei beiden Genotypen parallel eine signifikante Erhöhung des Enzymgehaltes der Trainings- im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachten. Training als Trigger für oxidativen Stress scheint hier der Auslöser zu sein. Die Reaktion des mitochondrialen Enzyms auf das Training bestätigt die

Ergebnisse anderer Untersuchungen, die eine ROS-vermittelte Induktion dieser Isoform nahegelegt haben [Rhee et al, 1999]. Hier konnten wir verdeutlichen, dass dies auch auf eine Situation nach Ausdauertraining zutrifft. Prx3 scheint vor allem auch durch Kontrolle des mitochondrialen H_2O_2 's Apoptosesignalwege zu regulieren [Chang et al, 2004]. Eine besondere Rolle in der Redoxregulation des von uns untersuchten Genotyps konnte hier jedoch nicht gezeigt werden, da es keine Abweichung vom Wildtyp gab.

Das Training hatte bei den Wildtyp-Tieren im Herzmuskelgewebe außerdem keinen Einfluss auf den Gehalt an Prx1 und 2, bewirkte aber eine signifikante Verminderung der Isoformen 4-6.

Bei den MnSOD^{+/-}-Mäusen konnten wir demgegenüber eine signifikante Erhöhung der Prx1 unter Training erkennen, während die unter Kontrollbedingungen gegenüber dem Wildtyp erhöhte Prx2 tendenziell abfiel.

Die Isoformen 4-6 waren unter Kontrollbedingungen bei den heterozygoten MnSOD-Tieren signifikant gegenüber denen der Wildtypen reduziert. Dies entspricht Beobachtungen im humanen Myokard bei Herzinsuffizienz [Brixius et al, 2007]. Ursächlich könnte der Substratmangel aufgrund des SOD2-Mangels und der zytoplasmatischen SOD1-Erniedrigung [s. Strassburger, Bloch et al, 2005] mit der damit verbundenen verminderten Entstehung von H_2O_2 im Zuge des Abbaus von O_2^- sein. Auffällig ist jedoch, dass auch die Wildtyp-Trainingstiere eine Reduktion ebendieser Isoformen aufzeigen. Dies lässt den Schluss zu, dass beim Training und bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz auf Ebene dieser Isoformen ähnliche Adaptationsmechanismen induziert werden.

Während Prx 5 und 6 bei den Knockouts unter Training unverändert erniedrigt bleiben, ist bei Prx 4 hier ein signifikanter Anstieg zu beobachten. Diese Isoform wird als einzige aktiv sezerniert und wirkt mittels NF- κ B-Aktivierung immunmodulatorisch [Immenschuh et al, 2005, Haridas et al, 1998].

Wir konnten in unserer Untersuchung eindeutig zeigen, dass die verschiedenen Isoformen ganz unterschiedlich auf den Stress durch das Training und durch die erhöhte Radikalenbelastung aufgrund des genetischen Defektes reagieren. Dies kann als Hinweis auf eine Dysregulation der redoxregulativen Homöostase der Zelle gedeutet werden. Inwieweit diese aufgezeigten Veränderungen antioxidativer oder redoxregulativer Bedeutung sind, lässt sich mit den durchgeführten Untersuchungen nicht beantworten und sollte in zukünftigen Untersuchungen näher beleuchtet werden.

Insgesamt ist bei dieser Arbeit zu beachten, dass man bei einem Eingriff in die Genetik eines Lebewesens niemals alle Konsequenzen überblicken kann, die dieser Eingriff und darauffolgende Adaptationen mit sich gebracht haben.

In dieser Studie konnten wir zeigen, dass die radikalenbelasteten MnSOD-Knockout-Mäuse eine veränderte kardiale Adaptation auf einen Trainingsstimulus aufweisen. Die schon in der Kontrolle hypertrophierten Herzen zeigen in der trainierten Situation eine signifikante Dilatation, jedoch ohne funktionelle Dekompensation unter Ruhebedingungen. Die dem Training entsprechende Neovaskularisation fehlt, wodurch die Blutversorgung des Herzgewebes unter maximaler Belastung wahrscheinlich nicht ausreichend gewährleistet ist. Dennoch zeigen die Tiere keinen erhöhten oxidativen und nitrosativen Stress im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe. Auch konnten wir keine vermehrte Apoptoseinduktion feststellen.

Bei der Betrachtung der redoxregulativen Signalkaskaden fiel eine Erniedrigung der pERK1/2 auf, bei unsignifikanter Veränderung im p38- und pAKT-Weg. Die Peroxiredoxinisoformen reagieren sehr unterschiedlich auf die Studienbedingungen. Inwieweit diese Veränderungen redoxregulative oder antioxidative Auswirkungen haben, konnte mithilfe dieses Versuchsaufbaus nicht geklärt werden. Auch zeigten die untersuchten Signalwege keine eindeutige molekulare Ursache des stattgefundenen kardialen Remodellings.

4.4 Perspektive

Dass oxidativer Stress und damit einhergehende mitochondriale Schädigung eine entscheidende Rolle in der Entstehung diverser Krankheitsbilder spielt, v.a. auch beim kardialen Remodelling, ist in der Literatur gut dokumentiert. Um diese Erkenntnisse für mögliche Präventions- oder Therapieoptionen zu nutzen, ist jedoch eine weitere genauere Grundlagenforschung von Nöten.

In unserer Studie konnten wir die morphometrischen und funktionellen kardialen Veränderungen aufzeigen, die heterozygote MnSOD-Knockout-Mäuse unter Ausdauertraining, also unter einer doppelten Belastung durch oxidativen Stress, aufweisen. Die Adaptationsmechanismen, die dazu führen, konnten hier jedoch nicht im Detail nachvollzogen werden.

Um die Adaptationsvorgänge besser verstehen zu können, wäre es von großem Interesse, das Training zu variieren, es beispielsweise auf einen kürzeren Zeitraum zu begrenzen. So könnte man nach einer einzelnen Trainingseinheit einen besseren Einblick in den Zellhaushalt zu einem Zeitpunkt bekommen, an dem die morphometrische Anpassung noch nicht erfolgt ist.

Im Hinblick auf die Beurteilung, ob Individuen mit verminderter MnSOD-Aktivität von Ausdauertraining profitieren, wäre es von Interesse, ein längeres Ausdauertraining sowie eine längerfristige Kontrolle der kardialen Funktion durchzuführen. Damit könnte man untersuchen, ob körperliche Fitness das Gesamtüberleben verbessert, bzw. ob die Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie weiter voranschreitet.

Sinnvoll wäre zudem eine Untersuchung der wichtigen antioxidativen Enzyme in diesem Modell. Durch Strassburger et al liegt bereits eine Analyse der Aktivität der GPX und CAT in den ersten Lebenstagen der MnSOD^{+/-}-Mäuse vor. Diese sollte durch eine Messung nach Ausdauertraining ergänzt werden, damit könnte der Einblick in die gesamte Redox-Homöostase der Kardiomyozyten optimiert werden.

5. Zusammenfassung

Die MnSOD ist ein essentielles Enzym, Tiere mit einem homozygoten Knockout sind nicht lebensfähig. Strassburger und Mitarbeiter beschrieben 2005 ein Mausmodell von heterozygoten MnSOD-Knockout-Tieren mit C57BL/6X129/OLA-Hintergrund, die kardial deutliche radikaleninduzierte Schäden aufwiesen, klinisch und im Überleben jedoch unauffällig waren. Durch diesen Phänotyp scheinen die beschriebenen Mäuse ein gutes Langzeit-Modell für altersbedingte Herzerkrankungen zu sein [Strassburger, Bloch et al, 2005]. Körperliche Belastung stellt durch den erhöhten Sauerstoffumsatz eine gesteigerte Radikalenbelastung dar, verbessert jedoch längerfristig die antioxidative Kapazität der Zellen [Navarro-Arévalo et al, 1999; Wilson et al, 2000]. Das Ziel dieser Arbeit war nun, die Auswirkungen von Ausdauertraining auf die Herzen männlicher MnSOD-defizienter Mäuse zu untersuchen.

Dafür wurden sowohl MnSOD^{+/-}-Mäuse (D-T; n=11) als auch Wildtyp-Mäuse (W-T; n=6) einem 8-wöchigen Training unterzogen, während einige Tiere beider Genotypen als Kontrollgruppen (D-K; n=09, W-K; n=7) untrainiert blieben. Das Trainingsprogramm bestand aus einem einstündigen Laufen für 5 Tage/ Woche auf einem Laufband mit einer Steigung von 5° und einer Geschwindigkeit von 15m/min. Nach Abschluss der Trainingsphase wurden die Ejektionsfraktion und das enddiastolische Volumen echokardiografisch bestimmt. Die Herzen der Tiere wurden nach ihrem Ableben hinsichtlich ihres Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnisses, der Kardiomyozytendurchmesser und der Kapillarisation untersucht. Auch wurden immunhistochemische Färbungen an Herzgewebeschnitten zum Nachweis von Schäden durch oxidativen und nitrosativen Stress, der Apoptoseinduktion sowie den ERK1/2-, p38- und AKT-Signalwegen durchgeführt. Außerdem betrachteten wir immunhistochemisch das kardiale Vorkommen der sechs Peroxiredoxin-Isoformen.

Die schon in der Kontrollgruppe hypertrophierten Herzen der MnSOD^{+/-}-Mäuse zeigten in der trainierten Situation eine signifikante Dilatation, jedoch ohne funktionelle Dekompensation unter Ruhebedingungen. Die bei den Wildtyp-Mäusen beobachtete Neovaskularisation durch das Training fehlte bei den transgenen Tieren, wodurch die Blutversorgung des Herzgewebes unter maximaler

Belastung gegebenenfalls nicht ausreichend gewährleistet ist. Dennoch zeigten die Tiere keinen erhöhten oxidativen und nitrosativen Stress im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe. Auch konnten wir keine vermehrte Apoptoseinduktion feststellen. Bei der Betrachtung der redoxregulativen Signalkaskaden fiel eine Erniedrigung der pERK1/2 auf, bei unsignifikanter Veränderung im p38- und pAKT-Weg. Peroxiredoxin-Isoformen reagieren sehr unterschiedlich auf die Studienbedingungen, sodass man von unterschiedlichen Regulationswegen ausgehen muss.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die radikalenbelasteten MnSOD-Knockout-Mäuse eine veränderte kardiale Adaptation auf einen Trainingsstimulus aufweisen.

6. Literaturverzeichnis

- 1) Akashi M, Hachiya M, Paquette RL, Osawa Y, Shimizu S, Suzuki G (1995). Irradiation increases manganese superoxide dismutase mRNA levels in human fibroblasts. Possible mechanisms for its accumulation. *J Biol Chem.* 270(26):15864-9.
- 2) Babior BM (2000). Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med.* 109(1):33-44. Review.
- 3) Bai J, Cederbaum AI (2001). Mitochondrial Catalase and Oxidative Injury. *Biol Signals Recept.* 10:189–199.
- 4) Baynes JW (1991). Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes.* 40(4):405-12. Review.
- 5) Beckman JS, Koppenol WH (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 271(5 Pt 1):C1424-37. Review.
- 6) Beckman KB, Ames BN (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev.* 78(2):547-81. Review.
- 7) Belch JJ, Bridges AB, Scott N, Chopra M (1991). Oxygen free radicals and congestive heart failure. *Br Heart J.* 65:245–248.
- 8) Bellacosa A, Testa JR, Moore R, Larue L (2004). A portrait of AKT kinases: human cancer and animal models depict a family with strong individualities. *Cancer Biol Ther.* 3(3):268-75. Review.
- 9) Bloch W, Schmidt A (2004). Sport und Freie Radikale. *Blickpunkt der Mann.* 2 (3)13-18
- 10) Blomqvist CG (1983). Cardiovascular adaptations to physical training. *Ann. Rev. Physiol.* 45:169-89.
- 11) Borgstahl GE, Parge HE, Hickey MJ, Beyer WF Jr, Hallewell RA, Tainer JA (1992). The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles. *Cell.* 71(1): 107-18.
- 12) Brixius K, Schwinger RH, Hoyer F, Napp A, Renner R, Bölck B, Kümin A, Fischer U, Mehlhorn U, Werner S, Bloch W (2007). Isoform-specific down-regulation of peroxiredoxin in human failing myocardium. *Life Sci.* 81(10):823-31.

- 13)** Bryk R, Griffin P, Nathan C (2000). Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature*. 407(6801):211-5
- 14)** Butler J, Hoey BM (1993). The one-electron reduction potential of several substrates can be related to their reduction rates by cytochrome P-450 reductase. *Biochim Biophys Acta*. 1161(1):73-8.
- 15)** Chae HZ, Robinson K, Poole LB, Church G, Storz G, Rhee SG (1994). Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: Alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91. 7017–7021.
- 16)** Chakraborti T, Ghosh SK, Michael JR, Batabyal SK, Chakraborti S (1998). Targets of oxidative stress in cardiovascular system; *Mol Cell Biochem*. 187(1-2):1-10. Review.
- 17)** Chang TS, Cho CS, Park S, Yu S, Kang SW, Rhee SG (2004). Peroxiredoxin III, a mitochondrion-specific peroxidase, regulates apoptotic signaling by mitochondria. *J Biol Chem*. 279(40):41975-84.
- 18)** Chen JW, Dodia C, Feinstein SI, Jain MK, Fisher AB (2000). 1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. *J Biol Chem*. 275(37):28421-7.
- 19)** Chen Z, Siu B, Ho YS, Vincent R, Chua CC, Hamdy RC, Chua BH (1998). Overexpression of MnSOD protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol*. 30(11):2281-9.
- 20)** Church SL, Grant JW, Meese EU, Trent JM (1992). Sublocalization of the gene encoding manganese superoxide dismutase (MnSOD/SOD2) to 6q25 by fluorescence in situ hybridization and somatic cell hybrid mapping. *Genomics* 14 (3). 823-5.
- 21)** Cieniewski-Bernard C, Mulder P, Henry JP, Drobecq H, Dubois E, Pottiez G, Thuillez C, Amouyel P, Richard V, Pinet F (2008). Proteomic analysis of left ventricular remodeling in an experimental model of heart failure. *J Proteome Res*. (11):5004-16.
- 22)** Cohen GM (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*. 326 (Pt 1):1-16. Review.
- 23)** Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N (2000). Cardiac remodeling—concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 35(3):569-82.

- 24)** Cornelissen VA, Fagard RH (2005). Effects of Endurance Training on Blood Pressure, Blood Pressure-Regulating Mechanisms, and Cardiovascular Risk Factors. *Hypertension*. 46;667-675.
- 25)** Coyle EF (2000). Physical activity as a metabolic stressor; *Am J Clin Nutr*. 72 (suppl): 512S–20S
- 26)** Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L (1982). Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun*. 107(4):1198-205.
- 27)** De Haan JB, Bladier C, Griffiths P, Kelner M, O'Shea RD, Cheung NS, Bronson RT, Silvestro MJ, Wild S, Zheng SS, Beart PM, Hertzog PJ, Kola I (1998). Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *J Biol Chem*. 273(35):22528-36.
- 28)** Demirel HA, Powers SK, Caillaud C, Coombes JS, Naito H, Fletcher LA, Vrabas I, Jessup JV, Ji LL (1998). Exercise training reduces myocardial lipid peroxidation following short-term ischemia-reperfusion. *Med Sci Sports Exerc*. 30(8): 1211-6.
- 29)** Demirel HA, Powers SK, Zergeroglu MA, Shanely RA, Hamilton K, Coombes J, Naito H (2001). Short-term exercise improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *J Appl Physiol*. 91(5):2205-12.
- 30)** Demple B, Harrison L (1994). Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu Rev Biochem*. 63:915-48. Review.
- 31)** Dickhuth HH, Röcker K, Mayer F, König D, Korsten-Reck U (2004). Ausdauersport und kardiale Adaptation (Sportherz). *Herz*. 29(4):373-80.
- 32)** Dreher D, Junod AF (1996). Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J Cancer*. 32A(1):30-8. Review.
- 33)** Dröge W (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function; *Physiological Reviews*. Vol. 82, No. 1, pp. 47-95; 10.1152/physrev.00018.2001
- 34)** Dumont A, Hehner SP, Hofmann TG, Ueffing M, Dröge W, Schmitz ML (1999). Hydrogen peroxide-induced apoptosis is CD95-independent, requires the release of mitochondria-derived reactive oxygen species and the activation of NF-kappaB. *Oncogene*. 18(3):747-57.
- 35)** Ensign WY, McNamara DJ, Fernandez ML (2002). Exercise improves plasma lipid profiles and modifies lipoprotein composition in guinea pigs. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 747–753.

- 36)** Errede B, Cade RM, Yashar BM, Kamada Y, Levin DE, Irie K, Matsumoto K (1995). Dynamics and organization of MAP kinase signal pathways. *Mol Reprod Dev.* 42(4):477-85. Review.
- 37)** Evangelista FS, Brum PC, Krieger JE (2003). Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice. *Braz J Med Biol Res.* 36(12):1751-9.
- 38)** Fahl WE, Lalwani ND, Watanabe T, Goel SK, Reddy JK (1984). DNA damage related to increased hydrogen peroxide generation by hypolipidemic drug-induced liver peroxisomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81(24):7827-30.
- 39)** Fantone JC, Ward PA (1982). *Am J Pathol.* Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. 107(3):395-418.
- 40)** Fagard R (2003). Athlete's heart. *Heart.* 89(12):1455-61
- 41)** Fagard R (1996). Athlete's Heart: A Meta-Analysis of the Echocardiographic Experience. *Int. J. Sports Med.* Vol. 17. Suppl. 3, pp. S140- S144.
- 42)** Fagard R, Aubert A, Staessen J, Eynde EV, Vanhees L, Amery A (1984). Cardiac structure and function in cyclists and runners Comparative echocardiographic study. *Br Heart J.* 52: 124-9
- 43)** Franke TF, Hornik CP, Segev L, Shostak GA, Sugimoto C (2003). PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene.* 22(56):8983-98.
- 44)** Freeman BA, Crapo JD (1982). Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest.* 47(5):412-26. Review.
- 45)** Fridovich I (1997). Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem.* 272(30):18515-7. Review.
- 46)** Fujii J, Ikeda Y (2002). Advances in our understanding of peroxiredoxin, a multifunctional, mammalian redox protein. *Redox Rep.* 7(3):123-30. Review.
- 47)** Gilbert BC, King DM, Thomas CB (1984). The oxidation of some polysaccharides by the hydroxyl radical: an e.s.r. investigation. *Carbohydr Res.* 125(2):217-35.
- 48)** Giordano FJ (2005). Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest.* 115(3):500-8. Review.

- 49)** Gosslau A, Rensing L (2002). Oxidativer Stress, altersabhängige Zellschädigungen und antioxidative Mechanismen. *Z Gerontol Geriatr.* Apr;35(2):139-50. Review. German. Erratum in: *Z Gerontol Geriatr* 2002; 35(3):253
- 50)** Graves JD, Draves KE, Craxton A, Saklatvala J, Krebs EG, Clark EA (1996). Involvement of stress-activated protein kinase and p38 mitogen-activated protein kinase in mlgM-induced apoptosis of human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(24):13814-8.
- 51)** Green DR, Reed JC (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science.* 281(5381):1309-12. Review.
- 52)** Gündüz F, Sentürk UK, Kuru O, Aktekin B, Aktekin MR (2004). The effect of one year's swimming exercise on oxidant stress and antioxidant capacity in aged rats. *Physiol Res.* 53(2):171-6.
- 53)** Halliwell B (1999). Antioxidant defence mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning); *Free Radical Research.* 31:4, 261 – 272.
- 54)** Halliwell B (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 141(2):312-22.
- 55)** Halliwell B, Aruoma OI (1991). DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* 281(1-2):9-19. Review.
- 56)** Halliwell B, Cross CE (1994). Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect.* 102 Suppl 10:5-12. Review.
- 57)** Halliwell B, Gutteridge JM (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* 219(1):1-14. Review.
- 58)** Halliwell B, Gutteridge JM (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med.* 18(1):125-6.
- 59)** Haridas V, Ni J, Meager A, Su J, Yu GL, Zhai Y, Kyaw H, Akama KT, Hu J, Van Eldik LJ, Aggarwal BB (1998). TRANK, a novel cytokine that activates NF-kappa B and c-Jun N-terminal kinase. *J Immunol.* 161(1):1-6.
- 60)** Harman D (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 11(3):298-300.
- 61)** Harman D (1981). The aging process. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78(11): 7124-8.

- 62)** Harris CA, Derbin KS, Hunte-McDonough B, Krauss MR, Chen KT, Smith DM, Epstein LB (1991). Manganese superoxide dismutase is induced by IFN-gamma in multiple cell types. Synergistic induction by IFN-gamma and tumor necrosis factor or IL-1. *J Immunol.* 147(1):149-54.
- 63)** Harrison R (2002). Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med.* 33(6):774-97. Review.
- 64)** Henschen S (1899). Skilanglauf und Skiwettlauf. Eine medizinische Sportstudie. *Mitt Med Klin Upsala.* 2;74
- 65)** Hiroi S, Harada H, Nishi H, Satoh M, Nagai R, Kimura A (1999). Polymorphisms in the SOD2 and HLA-DRB1 genes are associated with nonfamilial idiopathic dilated cardiomyopathy in Japanese. *Biochem Biophys Res Commun.* 261(2):332-9.
- 66)** Hofmann B, Hecht HJ, Flohé L (2002). Peroxiredoxins. *Biol Chem.* 383(3-4):347-64.
- 67)** Holloszy JO, Booth FW (1976). Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. *Annu Rev Physiol* 38. pp. 273–291.
- 68)** Hong H, Johnson P (1995). Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in exercised and hypertensive rat tissues. *Int J Biochem Cell Biol.* 27(9):923-31.
- 69)** Hudlická O, Brown MD, Walter H, Weiss JB, Bate A (1995). Factors involved in capillary growth in the heart. *Mol Cell Biochem.* 147(1-2):57-68.
- 70)** Huie RE, Padmaja S (1993). The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun.* 18(4):195-9.
- 71)** Husain K, Somani SM (1997). Response of cardiac antioxidant system to alcohol and exercise training in the rat. *Alcohol.* 14(3):301-7.
- 72)** Jackson RM, Parish G, Helton ES (1998). Peroxynitrite modulates MnSOD gene expression in lung epithelial cells. *Free Radic Biol Med.* 25(4-5): 463-72.
- 73)** Ji LL (1993). Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Med Sci Sports Exerc.* 25(2):225-31.
- 74)** Ji LL (1999). Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc Soc Exp Biol Med.* 222(3):283-92. Review.
- 75)** Immenschuh S, Baumgart-Vogt E (2005). Peroxiredoxins, oxidative stress, and cell proliferation. *Antioxid Redox Signal.* 7(5-6):768-77.

- 76)** Kakarla P, Vadluri G, Reddy KS, Leeuwenburgh C (2005). Vulnerability of the mid aged rat myocardium to the age-induced oxidative stress: influence of exercise training on antioxidant defense system. *Free Radic Res.* 39(11):1211-7.
- 77)** Kang SW, Chae HZ, Seo MS, Kim K, Baines IC, Rhee SG (1998). Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor- α . *J Biol Chem.* 273(11):6297-302.
- 78)** Kemi OJ, Ceci M, Wisloff U, Grimaldi S, Gallo P, Smith GL, Condorelli G, Ellingsen O (2008). Activation or inactivation of cardiac Akt/mTOR signaling diverges physiological from pathological hypertrophy. *J Cell Physiol.* 214(2):316-21.
- 79)** Kennedy SG, Kandel ES, Cross TK, Hay N (1999). Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria. *Mol Cell Biol.* 19(8):5800-10.
- 80)** Kim K, Kim IH, Lee KY, Rhee SG, Stadtman ER (1988). The isolation and purification of a specific "protector" protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O₂ mixed-function oxidation system. *J. Biol. Chem.* 263: 4704-4711.
- 81)** Kinugawa S, Wang Z, Kaminski PM, Wolin MS, Edwards JG, Kaley G, Hintze TH (2005). Limited exercise capacity in heterozygous manganese superoxide dismutase gene-knockout mice: roles of superoxide anion and nitric oxide. *Circulation.* 111(12):1480-6.
- 82)** Kiran TR, Subramanyam MVV, Prathima S, Devi SA (2006). Blood lipid profile and myocardial superoxide dismutase in swim-trained young and middle-aged rats: comparison between left and right ventricular adaptations to oxidative stress; *J Comp Physiol B* 176:749–762.
- 83)** Knoop B, Clippe A, Bogard C, Arsalane K, Wattiez R, Hermans C, Duconseille E, Falmagne P, Bernard A (1999). Cloning and Characterization of AOEB166, a Novel Mammalian Antioxidant Enzyme of the Peroxiredoxin Family. *J. Biol. Chem.* 274: 30451-30458.
- 84)** Komuro I, Kudo S, Yamazaki T, Zou Y, Shiojima I, Yazaki Y (1996). Mechanical stretch activates the stress-activated protein kinases in cardiac myocytes. *FASEB J.* 10(5):631-6.
- 85)** LaVerne JA (2000). OH radicals and oxidizing products in the gamma radiolysis of water. *Radiat Res.* 153(2):196-200.

- 86)** Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J Jr, Dionne L, Lu N, Huang S, Matzuk MM (1996). Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(18):9782-7.
- 87)** Lee HC, Wei YH (2007). Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. *Exp Biol Med (Maywood).* 232(5):592-606. Review.
- 88)** Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science.* 246(4935):1306-9.
- 89)** Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, Wallace DC, Epstein CJ (1995). Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet.* 11(4):376-81.
- 90)** Lin MT, Beal MF (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature.* 443(7113):787-95. Review.
- 91)** Liu R, Buettner GR, Oberley LW (2000). Oxygen free radicals mediate the induction of manganese superoxide dismutase gene expression by TNF-alpha. *Free Radic Biol Med.* 28(8):1197-205.
- 92)** Lloyd PM, Prior BM, Yang HT, Terjung RL (2003). Angiogenic growth factor expression in rat skeletal muscle in response to exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol,* 284: H1668 - H1678.
- 93)** Mannervik B (1996). Evolution of glutathione transferases and related enzymes for the protection of cells against electrophiles. *Biochem Soc Trans.* 24(3):878-80. Review.
- 94)** Mallat Z, Philip I, Lebreton M, Chatel D, Maclouf J, Tedgui A (1998) Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F2alpha in pericardial fluid of patients with heart failure: a potential role for in vivo oxidant stress in ventricular dilatation and progression to heart failure. *Circulation* 97:1536–1539.
- 95)** Matzuk MM, Dionne L, Guo Q, Kumar TR, Lebovitz RM (1998). Ovarian function in superoxide dismutase 1 and 2 knockout mice. *Endocrinology.* 139(9):4008-11.
- 96)** Maulik N (2002). Redox signaling of angiogenesis. *Antioxid Redox Signal.* 4(5):805-15. Review.
- 97)** McCord JM, Fridovich I (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 244(22):6049-55.

- 98)** Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J (1994). Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 17(3):235-48. Review.
- 99)** Milne GL, Musiek ES, Morrow JD (2005). F2-isoprostanes as markers of oxidative stress in vivo: an overview. *Biomarkers.* 10 Suppl 1:S10-23. Review.
- 100)** Mittal CK, Murad F (1977). Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74(10):4360-4.
- 101)** Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ 2nd (1990). A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(23):9383-7.
- 102)** Navarro-Arévalo A, Cañavate C, Sánchez-del-Pino MJ (1999). Myocardial and skeletal muscle aging and changes in oxidative stress in relationship to rigorous exercise training. *Mech Ageing Dev.* 108(3):207-17.
- 103)** Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 13(1):9-22. Review.
- 104)** Niebauer J, Maxwell AJ, Lin PS, Tsao PS, Kosek J, Bernstein D, Cooke JP (1999). Impaired aerobic capacity in hypercholesterolemic mice: partial reversal by exercise training. *Am J Physiol.* 276(4 Pt 2):H1346-54.
- 105)** Nojiri H, Shimizu T, Funakoshi M, Yamaguchi O, Zhou H, Kawakami S, Ohta Y, Sami M, Tachibana T, Ishikawa H, Kurosawa H, Kahn RC, Otsu K, Shirasawa T (2006). Oxidative stress causes heart failure with impaired mitochondrial respiration. *J Biol Chem.* 281(44):33789-801.
- 106)** Nozik-Grayck E, Suliman HB, Piantadosi CA (2005). Extracellular superoxide dismutase. *Int J Biochem Cell Biol.* 37(12):2466-71. Review.
- 107)** Ohkuwa T, Sato Y, Naoi M (1997). Glutathione status and reactive oxygen generation in tissues of young and old exercised rats; *Acta Physiol Scand.* 159(3):237-44.
- 108)** Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 22(2):153-83. Review.
- 109)** Porter, NA (1986). Mechanisms for the Autoxidation of Polyunsaturated Lipids. *Ace. Chem. Res.* 19, 262-268

- 110** Powers SK, Criswell D, Lawler J, Martin D, Lieu FK, Ji LL, Herb RA (1993). Rigorous exercise training increases superoxide dismutase activity in ventricular myocardium. *Am J Physiol.* 265(6 Pt 2):H2094-8.
- 111** Powers SK, Demirel HA, Vincent HK, Coombes JS, Naito H, Hamilton KL, Shanely RA, Jessup J (1998). Exercise training improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *Am J Physiol.* 275(5 Pt 2):R1468-77.
- 112** Pushpalatha K, Nishanth K, Sathyavelu Reddy K (2007). Myocardial antioxidant status and oxidative stress after combined action of exercise training and ethanol in two different age groups of male albino rats. *Acta Biol Hung.* 58(2):173-85.
- 113** Qiao D, Hou L, Liu X (2006). Influence of intermittent anaerobic exercise on mouse physical endurance and antioxidant components. *Br J Sports Med.* 40(3):214-8.
- 114** Quintanilha AT, Packer L (1983). Vitamin E, physical exercise and tissue oxidative damage. *Ciba Found Symp.* 101:56-69.
- 115** Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ (1995). Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem.* 270(13):7420-6.
- 116** Reed DJ (1990). Glutathione: toxicological implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 30:603-31. Review.
- 117** Reid MB, Haack KE, Franchek KM, Valberg PA, Kobzik L, West MS (1992). Reactive oxygen in skeletal muscle. I. Intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro. *J Appl Physiol.* 73(5):1797-804.
- 118** Rhee SG (1999). Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp Mol Med.* 31(2):53-9. Review.
- 119** Rhee SG, Kang SW, Netto LE, Seo MS, Stadtman ER (1999). A family of novel peroxidases, peroxiredoxins. *Biofactors.* 10(2-3):207-9. Review.
- 120** Rhee SG, Chae HZ, Kim K (2005). Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med.* 38(12):1543-52. Review.
- 121** Richter C, Park JW, Ames BN (1988). Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(17):6465-7.

- 122)** Riley PA (1993). Free Radicals in Biology: Oxidative Stress and the Effects of Ionizing Radiation. *International Journal of Radiation Biology*. 65:1, 27 - 33
- 123)** Rosenblum, JS, Gilula, NB, Lerner, RA (1996). On signal sequence polymorphisms and diseases of distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93 (9): 4471-3.
- 124)** Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, Kirk M, Freeman BA (1994). Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem*. 269(42):26066-75.
- 125)** Ruwhof C, van der Laarse A (2000). Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: Mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovasc Res*. 47(1):23-37. Review.
- 126)** Scheuer J, Tipton CM (1977). Cardiovascular Adaptations to Physical Training. *Annual Review of Physiology*. Vol. 39: 221-251.
- 127)** Seger R, Krebs EG (1995). The MAPK signaling cascade. *FASEB J*. 9(9):726-35. Review.
- 128)** Seo MS, Kang SW, Kim K, Baines IC, Lee TH, Rhee SG (2000). Identification of a New Type of Mammalian Peroxiredoxin That Forms an Intramolecular Disulfide as a Reaction Intermediate. *J. Biol. Chem*. 275: 20346-20354.
- 129)** Sies H (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med*. 27(9-10):916-21. Review.
- 130)** Sies H (1993). Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem*. 15;215(2):213-9. Review.
- 131)** Stadtman ER (1993). Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem*. 1993; 62:797-821. Review
- 132)** Stadtman ER (2006). Protein oxidation and aging. *Free Radic Res*. 40(12):1250-8. Review.
- 133)** St Clair DK, Oberley TD, Muse KE, St Clair WH (1994). Expression of manganese superoxide dismutase promotes cellular differentiation. *Free Radic Biol Med*. 16(2):275-82.

- 134)** Strassburger M, Bloch W, Sulyok S, Schüller J, Keist A, Schmidt A, Wenk J, Peters T, Wlaschek M, Krieg T, Hafner M, Müller W, Scharffetter-Kochanek K (2005). Heterozygous Deficiency of Manganese Superoxide Dismutase Results in Severe Lipid Peroxidation and Spontaneous Apoptosis in Murine Myocard in vivo; *Free Radic Biol Med.* 38(11):1458-7.
- 135)** Stuewe SR, Gwartz PA, Agarwal N, Mallet RT (2000). Exercise training enhances glycolytic and oxidative enzymes in canine ventricular myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 32, pp. 903–913.
- 136)** Thannickal VJ, Fanburg BL (2000). Reactive Oxygen species in cell signalling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 279:1005-1028.
- 137)** Thornberry NA, Lazebnik Y (1998). Caspases: enemies within. *Science.* 28; 281(5381):1312-6. Review.
- 138)** Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S (2009). Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodelling. *Cardiovasc Res.* 81(3):449-56. Review.
- 139)** Urhausen A, Kindermann W (1999). Sports-Specific Adaptations and Differentiation of the Athlete's Heart; *Sports Med* 28 (4): 237-244
- 140)** Ushio-Fukai M, Alexander RW (2004). Reactive oxygen species as mediators of angiogenesis signalling, Role of NAD(P)H oxidase; *Molecular and Cellular Biochemistry*, 264: 85–97.
- 141)** Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease; *Int J Biochem Cell Biol.* 39(1):44-84.
- 142)** Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem.* 266(1-2):37-56. Review.
- 143)** Van Remmen H, Ikeno Y, Hamilton M, Pahlavani M, Wolf N, Thorpe SR, Alderson NL, Baynes JW, Epstein CJ, Huang TT, Nelson J, Strong R, Richardson A (2003). Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging. *Physiol Genomics.* 16(1):29-37.
- 144)** Van Remmen H, Williams MD, Guo Z, Estlack L, Yang H, Carlson EJ, Epstein CJ, Huang TT, Richardson A (2001). Knockout mice heterozygous for Sod2 show alterations in cardiac mitochondrial function and apoptosis; *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 281: H1422-H1432, 2001; 0363-6135/01

- 145)** Venditti P, Masullo P, Meo SD (1999). Effect of exercise duration on characteristics of mitochondrial population from rat liver. *Arch Biochem Biophys.* 368(1):112-20.
- 146)** Venditti P, Di Meo S (1997). Effect of training on antioxidant capacity, tissue damage, and endurance of adult male rats. *Int J Sports Med.* 18(7):497-502.
- 147)** Wan XS, Devalaraja MN, St Clair DK (1994). Molecular structure and organization of the human manganese superoxide dismutase gene. *DNA Cell Biol.* 13 (11): 1127-36.
- 148)** Wang Y (2007). Mitogen-activated protein kinases in heart development and diseases. *Circulation.* 116(12):1413-23. Review.
- 149)** Wang LI, Miller DP, Sai Y, Liu G, Su L, Wain JC, Lynch TJ, Christiani DC (2001). Manganese Superoxide Dismutase Alanine-to-Valine Polymorphism at Codon 16 and Lung Cancer Risk; *Journal of the National Cancer Institute.* Vol. 93, No. 23.
- 150)** Wei YH, Lee HC (2002). Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp Biol Med (Maywood).* 227(9):671-82. Review.
- 151)** Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev.* 79(1):143-80.
- 152)** Wilson DO, Johnson P (2000). Exercise modulates antioxidant enzyme gene expression in rat myocardium and liver; *J Appl Physiol.* 88: 1791-1796.
- 153)** Zhang P, Liu B, Kang SW, Seo MS, Rhee SG, Obeid LM (1997). Thioredoxin peroxidase is a novel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of Bcl-2. *J Biol Chem.* 272: 30615–30618.
- 154)** Zheng W, Seftor EA, Meininger CJ, Hendrix MJ, Tomanek RJ (2001). Mechanisms of coronary angiogenesis in response to stretch. role of VEGF and TGF-. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 280: H909–H917.

7. Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen

Auszüge meiner vorliegenden Doktorarbeit wurden mit der Genehmigung des Dekans der Hohen medizinischen Fakultät der Universität zu Köln und Herrn Prof. Wilhelm Bloch wie folgt veröffentlicht:

Publikationen

Richters L, Lange N, Renner R, Treiber N, Ghanem A, Tiemann K, Scharffetter-Kochanek K, Bloch W, Brixius K (2011). Exercise-Induced Adaptations of Cardiac Redox Homeostasis and Remodelling in Heterozygous SOD2-Knockout mice. *J Appl Physiol*, 2011 Nov;111(5):1431-40. Epub 2011 Aug 11.

Kongressbeiträge

Brixius K, **Richters L**, Lange N, Scharffetter Kochanek K, Treiber N, Schwinger RHG, Ghanem A, Tiemann K, Bloch W (2006). Die Induktion der Gefäßneubildung unter körperlichem Training fehlt bei Mäusen mit verminderter MnSOD-Proteinexpression. *Z Kardiologie* 95 (Suppl): V1519
72. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie Mannheim 20.-22. April 2006

Willkomm L, Brixius K, Lange N, **Richters L**, Treiber N, Kümin A, Werner S, Scharffetter Kochanek K, Bloch W (2007). Exercise-induced alterations in skeletal muscle of heterozygous MnSOD-deficient mice. *Ann Anat* 189: MT I-8
102. Jahrestreffen der Anatomischen Gesellschaft 30.3.-2. April 2007, Gießen

Brixius K, **Richters L**, Lange N, Treiber N, Scharffetter Kochanek K, Schwinger RHG, Ghanem A, Tiemann K, Bloch W (2007). Fehlende Gefäßneubildung unter körperlichem Training bei Mäusen mit verminderter MnSOD-Proteinexpression. *Deut Z Sportmedizin* 58(7-8): 197
40. Deutscher Sportärztekongress 27.-29. September 2007 Köln

8. Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schema zur Entstehung radikaler Sauerstoffspezies	8
Abbildung 2:	Übersicht über die trainingsinduzierten Veränderung antioxidativer Enzymaktivitäten im Myokard.....	17
Abbildung 3:	Enzymaktivität der SOD1 und 2 im Vergleich bei MnSOD ^{+/-} - und MnSOD ^{+/-} -Mäusen	19
Abbildung 4:	Foto von 6 Mäusen gemischter Genotypen während des Trainings	22
Abbildung 5:	Schemazeichnung des verwendeten Laufbandes	23
Abbildung 6:	Schematische Darstellung immunhistochemischer Färbung.....	30
Abbildung 7:	Herzgewichts-/Körpergewichtsratio.....	39
Abbildung 8:	Kardiomyozytendurchmesser	40
Abbildung 9:	Fotografien zur Darstellung der Kardiomyozytendiameter	41
Abbildung 10:	Ejektionsfraktion.....	43
Abbildung 11:	LVED	43
Abbildung 12:	Fotografien der HE-gefärbten Myokardschnitte.....	44
Abbildung 13:	Fotografien der nach Van Gieson gefärbten Myokardschnitte	45
Abbildung 14:	Gefäße pro Kardiomyozyt.....	46
Abbildung 15:	VEGF-ELISA.....	47
Abbildung 16:	Anti-8-Isoprostan-Färbung.....	49
Abbildung 17:	Fotografien der anti-8-Isoprostan-gefärbten Kardiomyozyten	49
Abbildung 18:	Anti-Nitrotyrosin-Färbung.	50
Abbildung 19:	Fotografien der anti-Nitrotyrosin-gefärbten Kardiomyozyten	51
Abbildung 20:	Anti-Caspase3-Färbung.	52
Abbildung 21:	Anti-phospho-ERK1/2-Färbung.	54
Abbildung 22:	Anti-akt-p38-Färbung.	54
Abbildung 23:	Anti-pAKT ₁ -Färbung.....	55
Abbildung 24:	Anti-Prx-Färbungen 1-3.....	58
Abbildung 25:	Anti-Prx-Färbungen 4-6.....	59

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.