

Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin B, Kardiologie
(Direktor: Prof. Dr. Stephan Felix)
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

Thema:

Der Einfluss des Interleukin-6/gp130 Rezeptor-Signalweges auf die
Entstehung einer Sepsis-induzierten Kardiomyopathie

Inaugural – Dissertation
zur
Erlangung des akademischen
Grades
Doktor der Medizin
(Dr. med.)
der
Universitätsmedizin
der
Universität Greifswald
2022

vorgelegt von:
Sebastian Graeger
geb. am: 24.05.1994
in: Geesthacht

Dekan: Prof. Dr. Karlhans Endlich
1. Gutachter: Prof. Dr. Jens Fielitz
2. Gutachter: Prof. Dr. Kai Kappert
Ort, Raum: Greifswald, Seminarraum J04.33/34
Tag der Disputation: Dienstag, 16. Mai 2023

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VI
Zusammenfassung.....	VIII
Summary.....	X
1. Einleitung	1
1.1 Das Herz	1
1.1.1 Die Anatomie des Herzens	1
1.1.2 Der Aufbau und die Anpassung der Herzmuskulatur	1
1.1.3 Kontraktionszyklus einer Herzmuskelzelle	4
1.1.4 Mitochondrium	5
1.2 Sepsis	10
1.2.1 Definition der Sepsis	10
1.2.2 Epidemiologie der Sepsis	11
1.2.3 Sepsis-induzierte Kardiomyopathie	12
1.3 Interleukin-6	15
1.3.1 Der Interleukin-6/gp130/JAK/STAT-Signalweg	18
1.4 Die Rolle des Interleukin-6 in der Pathogenese der Sepsis	20
2. Zielsetzung/Hypothese.....	23
3. Material und Methoden.....	24
3.1 Material	24
3.1.1 Geräte und Labormaterialien	24
3.1.2 Chemikalien und Reagenzien	25
3.1.3 Antikörper, Oligonukleotide	26
3.1.4 Puffer und Lösungen.....	27
3.1.5 Nährmedien	27
3.1.6 Primersequenzen.....	28
3.1.7 Software	29
3.2 Zellbiologische Methoden.....	29
3.2.1 Zelllinie	29
3.2.2 Kultivierung von HL-1 Kardiomyozyten	29
3.2.3 Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer	30
3.2.4 Behandlungsexperimente	30
3.2.5 Transfektion	30

3.3	Molekularbiologische Methoden	31
3.3.1	RNA-Isolation aus kultivierten HL-1 Kardiomyozyten und Geweben	31
3.3.2	Messung der RNA-Konzentration.....	32
3.3.3	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	32
3.3.4	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)	33
3.3.5	Isolation von Proteinen	35
3.3.6	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	35
3.3.7	Western Blot	36
3.4	Bestimmung der Kardiomyozytenkontraktion mittels IonOptix®	37
3.5	Real-time deformability cytometry (RT-DC)	39
3.6	High Resolution Respirometrie, der Oroboros Oxygraph -2K	40
3.7	Tierexperimentelle Methoden	49
3.7.1	Versuchstiere.....	49
3.7.2	Induktion einer polymikrobiellen Sepsis mittels Durchführung einer zökalen Ligatur und Punktion (<i>Cecal and ligature puncture</i> , CLP).....	49
3.7.3	Transthorakale Echokardiographie	51
3.8	Graphische Darstellung	52
3.9	Statistische Auswertung	53
4.	Ergebnisse	54
4.1	Zellbiologische Ergebnisse.....	54
4.1.1	Interleukin-6 aktiviert den Trans-Signalweg in HL-1 Kardiomyozyten....	54
4.2	Interleukin-6 induziert die Expression von Stressmarkern in Kardiomyozyten	55
4.3	Die zellulären Effekte von IL-6 werden durch den Knockdown von <i>Gp130</i> reduziert.....	57
4.4	IL-6 führt zu einer Reduktion der Kontraktilität von primären Herzmuskelzellen <i>in vitro</i>	60
4.5	<i>Real-time deformability cytometry</i> (RT-DC) Messungen der Zellgröße und Deformation in HL-1 Kardiomyozyten.....	62
4.6	Kardiale Dysfunktion in septischen <i>gp130</i> WT und <i>gp130</i> cKO Mäusen	65
4.7	Expression kardialer Stressmarker in Herzen von septischen WT und <i>gp130</i> cKO Mäusen	67
4.8	Die Funktion der Atmungskette in der Sepsis im Herzen wird durch die Deletion von <i>gp130</i> aufrechterhalten.....	71
5.	Diskussion	74
5.1	Der IL-6 <i>Trans</i> -Signalweg ist in HL-1 Kardiomyozyten aktiv	74
5.2	Validierung der <i>gp130</i> Deletion in Kardiomyozyten	76

5.3	IL-6 führt zu einer Reduktion der Kontraktilität von Kardiomyozyten <i>in vitro</i> 77	77
5.4	Interleukin-6 führt zu keiner Zellgrößenveränderung von Kardiomyozyten ..77	77
5.5	Die Rolle von Interleukin-6 in der Genexpression der Myosin-Isoformen <i>Myh6</i> und <i>Myh7</i>	79
5.6	Die <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Genexpression von <i>Nppb</i>	81
5.7	Die Sepsis-induzierten Kardiomyopathie ist gp130 abhängig	82
5.8	Die mitochondriale Dysfunktion der Kardiomyozyten ist in der Sepsis-induzierten Kardiomyopathie vom gp130 Rezeptor abhängig.....	84
5.9	Limitationen.....	91
Anhang.....		94
Abbildungsverzeichnis		97
Tabellenverzeichnis		98
Literaturverzeichnis		99
Abstracts und Anteilserklärung an folgender Publikation		119
Danksagung.....		120

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
ARVM	Kardiomyozyten aus dem Myokard erwachsener Ratten (engl. <i>adult rat ventricular myocytes</i>)
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid (engl. <i>B-type Natriuretic Peptide</i>)
BSA	Bovines Serumalbumin
BSF-2	B-Zell stimulierender Faktor 2
CD126	α -Untereinheit des IL-6-Rezeptors
CD130	Glykoprotein 130
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cKO	Engl. <i>conditional knockout</i> ; Hier: <i>gp130 cKO</i>
CLP	Zökale Ligatur und Punktion (engl. <i>cecal ligation and puncture</i>)
CO	Herzzeitvolumen (engl. <i>cardiac output</i>)
CRP	C-reaktives Protein
CT-1	Cardiotrophin-1
DAMPs	Schaden-assoziierte molekulare Muster (engl. <i>damage-associated molecular patterns</i>)
<i>DNM1L</i>	Dynamin-1-like protein (Gen)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejektionsfraktion (engl. <i>ejection fraction</i>)
FADH	Flavinadenindinukleotid
FCS	Fetales Kälberserum (engl. <i>fetal calf serum</i>)
FS	Fraktionelle Verkürzung (engl. <i>fractional shortening</i>)
<i>gp130</i>	Glykoprotein 130 (Gen)
gp130	Glykoprotein 130
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IL-6R	Interleukin-6 Rezeptor
IL-6R α	IL-6-Rezeptor α Untereinheit
JAK	Janus-assoziierte Kinase
KO	Knockout
LIF	Leukozyten induzierender Faktor
LPS	Lipopolysaccharid
<i>Mfn1</i>	Mitofusin-1 (Gen)
<i>Mfn2</i>	Mitofusin-2 (Gen)
mIL-6R α	Membranständige IL-6-Rezeptor α Untereinheit
mRNA	Messenger RNA
<i>Myh6</i>	Myosin heavy chain 6 (Gen)
<i>Myh7</i>	Myosin heavy chain 7 (Gen)
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NF- κ B	Engl. <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
<i>Nppb</i>	Engl. <i>Natriuretic peptide precursor B</i> (Gen)
OPA1	Engl. <i>mitochondrial dynamin like GTPase</i>
OXPPOS	Oxidative Phosphorylierung
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl. <i>pathogen-associated molecular pattern</i>)

PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
<i>Ppargc1a</i>	Engl. <i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i> (Gen)
PINK1	Engl. <i>PTEN-induced putative kinase 1</i>
PPR	Engl. <i>pattern-recognition receptor</i>
qRT-PCR	Quantitative Real-time PCR
q-SOFA	Engl. <i>quick-Sequential Organ Failure Assessment</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROX	Restsauerstoffverbrauch
RT-DC	Engl. <i>Real-time deformability cytometry</i>
SDS	Engl. <i>Sodiumdodecylsulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler (engl. <i>standard error of the mean</i>)
SFM	Serum-freies Medium
shRNA	Engl. <i>short hairpin RNA</i>
sIL-6R α	Engl. Soluble löslicher IL-6-Rezeptor
siRNA	Engl. <i>short interfering RNA</i>
SOCS	Engl. <i>Suppressor of cytokine signalling</i>
<i>Socs3</i>	Engl. <i>Suppressor of cytokine signalling</i> (Gen)
SOFA	Engl. <i>Sequential Organ Failure Assessment</i>
STAT	Engl. <i>signal transducers and activators of transcription</i>
SUIT	Engl. <i>Substrate-Uncoupler-Inhibitor-Titration</i>
SV	Schlagvolumen (engl. <i>stroke Volume</i>)
TBST	Engl. <i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
WT	Wildtyp

In der folgenden Arbeit wird aus Gründen der besseren Lesbarkeit ausschließlich die männliche Form verwendet. Selbstverständlich sind jedoch, sofern nicht explizit angegeben, beide Geschlechter gemeint.

Zusammenfassung

Das Krankheitsbild der Sepsis zählt zu den Haupttodesursachen weltweit. Die Sepsis-induzierte Kardiomyopathie, erstmalig 1984 beschrieben, ist eine Begleiterkrankung der Sepsis, für die es keine spezifische Therapie gibt. Die Pathogenese der septischen Kardiomyopathie ist weitestgehend unklar. Mehrere Einflussfaktoren werden diskutiert. Das Zytokin Interleukin-6 (IL-6) wird während der Sepsis im menschlichen Organismus vermehrt gebildet und ist mit der Schwere der Sepsis assoziiert. Sein Einfluss auf die Herzmuskulatur und sein Anteil an der Ausbildung einer Sepsis-induzierten Kardiomyopathie ist bisher ungeklärt. Weiterhin ist nicht bekannt, ob die Hemmung der IL-6 Wirkung auf die Herzmuskulatur einen protektiven Effekt aufweist. Die vorliegende Arbeit konnte einen negativen Einfluss von IL-6 über den gp130 Rezeptor auf Kardiomyozyten *in vitro* und das Herz *in vivo* nachweisen. So zeigten *in vitro* Untersuchungen, dass IL-6 die Expression von Stress-assoziierten Genen im Herzen steigert. Zudem konnte gezeigt werden, dass IL-6 die kontraktile Funktion von adulten Ratten-Kardiomyozyten reduziert. Um die Hypothese zu überprüfen, dass IL-6 die Entstehung einer Sepsis-induzierten Kardiomyopathie fördert, wurde in männlichen in Herzmuskelzell-spezifischen *gp130* Knockout (cKO) und *gp130* WT Geschwistermäusen eine polymikrobielle Sepsis induziert und die Herzfunktion und die Expression kardialer Stressmarker und mitochondrialer Gene nach 24 Stunden quantifiziert. Zusätzlich wurde die mitochondriale Funktion in den Herzen dieser Tiere mittels Respirometrie untersucht. Die Induktion der Sepsis erfolgte durch die Ausführung einer zökalen Ligatur und Punktion (engl. *cecal ligation and puncture*, CLP). Als Kontrolle dienten Schein (engl. *Sham-*) operierte Mäuse. Echokardiographisch konnte nach 24 Stunden eine kardiale Dysfunktion in den septischen *gp130* WT Mäuse nachgewiesen werden, welche die septischen *gp130* cKO Mäuse nicht zeigten. Die Expression mitochondrialer Gene war in den Herzen der septischen WT Mäuse, jedoch nicht der *gp130* cKO Mäuse fehlreguliert.

Die Respirometrie-Messungen wiesen eine signifikant reduzierte Sauerstoffdurchflussrate der Atmungskette der Mitochondrien in den Herzen der septischen *gp130* WT Mäusen im Vergleich zu Sham-Tieren nach, was für eine verschlechterte Mitochondrien Funktion spricht. Eine Verschlechterung der

mitochondrialen Funktion konnte in den Herzen der *Gp130* cKO Mäuse nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass erhöhte IL-6 Spiegel in der Sepsis über den gp130 Rezeptor auf den Herzmuskelzellen zu einer mitochondrialen Dysfunktion im Herzen führt, was an der Entwicklung einer Sepsis-induzierten Kardiomyopathie beteiligt sein könnte.

Summary

Sepsis is one of the main causes of death worldwide. Sepsis-induced cardiomyopathy, first described in 1984, is a concomitant disease of sepsis for which there is no specific therapy. The pathogenesis of septic cardiomyopathy is largely unclear, but several influencing factors are discussed. The cytokine interleukin-6 (IL-6) is increasingly formed in the human organism during sepsis and is associated with the severity of the disease sepsis. Its influence on the heart muscles and in the development of a sepsis-induced cardiomyopathy is still unknown. Furthermore, it is not known whether the inhibition of the IL-6 effect on the heart muscles has a protective effect. The present work was able to demonstrate a negative influence of IL-6 via the gp130 receptor on cardiomyocytes in vitro and the heart in vivo. In vitro studies showed that IL-6 increases the expression of stress-associated genes in the heart. In addition, it could be shown that IL-6 leads to a deterioration in the contractile function of adult rat cardiomyocytes. To test the hypothesis that IL-6 influences the development of sepsis-induced cardiomyopathy, polymicrobial sepsis was induced in male *gp130* WT and *gp130* cKO sibling mice and cardiac function, the amount of cardiac stress markers and the expression of mitochondrial genes were quantified after 24 hours. In addition, the mitochondrial function in the hearts of these animals was examined using respirometry. Sepsis was induced by performing a cecal ligation and puncture (CLP). Sham-operated mice served as controls. After 24 hours, a cardiac dysfunction could be detected in the septic *gp130* WT mice by echocardiography, which the septic *gp130* cKO mice did not show. The expression of mitochondrial genes was dysregulated in the hearts of septic WT mice but not in *gp130* cKO mice.

Respirometry measurements showed that the mitochondrial respiratory chain in septic *gp130* WT mice produced a significantly reduced oxygen flow rate compared to sham animals, indicating impaired mitochondrial function. *Gp130* cKO mice were protected from deterioration in mitochondrial function.

In summary, it could be shown that increased IL-6 levels in sepsis via the gp130 receptor lead to mitochondrial dysfunction in the heart, which could be involved in the development of sepsis-induced cardiomyopathy.

1. Einleitung

1.1 Das Herz

1.1.1 Die Anatomie des Herzens

Das Herz ist ein zentrales Organ des menschlichen Körpers, welches durch seine Kontraktilität für einen stetigen Blutfluss sorgt und damit den Körper mit Sauerstoff, Nährstoffe und Hormonen versorgt. Das Herzgewicht beträgt bei einem normalgewichtigen, gesunden Erwachsenen 250-300 g. Es besteht aus zwei Vorhöfen, den Atria und zwei Kammern, den Ventrikeln. Die Trennung von Atrium und Ventrikel erfolgte durch Taschen- bzw. Segelklappen, die einen unidirektionalen Blutfluss sicherstellen. Sauerstoffarmes Blut fließt über die untere und obere Hohlvene in den rechten Vorhof und durch die Trikuspidalklappe in den rechten Ventrikel. Durch die Kontraktion des rechten Ventrikels gelangt das Blut über die Pulmonalklappe in den Lungenkreislauf. Hier erfolgt die Oxygenierung des Blutes und Abatmung des Stoffwechselendproduktes Kohlenstoffdioxid. Im Anschluss wird das oxygenierte Blut über den linken Vorhof durch die Mitralklappe in den linken Ventrikel transportiert. Von dort erfolgte über die Aortenklappe und die Aorta die Blutverteilung in den Körperkreislauf. Für eine normale Herzfunktion ist das gemeinschaftliche Zusammenspiel von Herzmuskelzellen, den sogenannten Kardiomyozyten, erforderlich (Renz-Polster and Krautzig 2013; Lüllmann-Rauch and Asan 2015).

1.1.2 Der Aufbau und die Anpassung der Herzmuskulatur

Die Herzwand besteht aus drei Schichten, dem Epi-, Myo und Endokard. Äußerlich grenzt das von den Koronargefäßen durchzogene Epikard das Herz von angrenzenden Strukturen ab und bedeckt das Myokard. Luminal liegt dem Myokard die Schicht des Endokards/ die endokardiale Schicht an. Die Funktion des so eingebetteten Myokards besteht in der Kontraktilität und Relaxation des Herzens.

Das Myokard setzt sich aus einkernigen Herzmuskelzellen mit einem Durchmesser von circa 15 µm und einer Länge von 100 µm zusammen, welche untereinander durch

End-zu-End Kontakte mittels Glanzstreifen (lateinisch *Discus intercalaris*) und *gap junctions* verbunden sind. Über die Glanzstreifen wird die Weiterleitung von kontraktile Kräften zwischen den Zellen vermittelt. Die *gap junctions* stellen eine elektrische Verbindung zwischen den Herzmuskelzellen her, die die Weiterleitung von Aktionspotenzialen und somit die Synchronität der Kontraktion ermöglichen. In Ihrem Verbund wirken die Herzmuskelzellen als funktionelles Synzytium (Pape 2014; Lüllmann-Rauch and Asan 2015).

Die einzelne Herzmuskelzelle, der Kardiomyozyt, besteht aus mehreren Myofibrillen, die von Mitochondrien umgeben sind, sowie einem zentralen Zellkern. Die Myofibrillen sind aus mehreren aneinander gelagerten Sarkomeren aufgebaut. Die Sarkomerstruktur konnte erstmals 1949 durch die australischen Wissenschaftler Draper und Hodge im Elektronenmikroskop identifiziert werden. Hierzu schauten sie sich aufbereitete Myofibrillen der Beinmuskulatur von Kröten und Kaninchen an. Im Elektronenmikroskop konnten sie periodisch aufleuchtende Bandenmuster erkennen. Aufleuchtenden Banden wurden als anisotrope Banden (A-Banden) und nicht-aufleuchtende Bande als isotrope Banden (I-Banden) definiert. Als Begrenzung eines Sarkomers wurden die sogenannten Z-Scheiben definiert. Ein aufgehellter Bereich innerhalb der A-Bande wurde als H-Bande bezeichnet (vgl. Abbildung 1) (DRAPER and HODGE 1949). Für die Kontraktilität der Kardiomyozyten sind die, in jedem Sarkomer vorkommenden Proteine Myosin, Aktin, Troponin und Tropomyosin zuständig.

Die Aktinfilamente bestehen aus α -Aktin-Molekülen, welche in den Z-Scheiben verankert sind und vor allem in den sogenannten I-Banden des Sarkomers vorkommen. Sie wirken gemeinsam mit den ebenfalls für die Kontraktion wichtigen Begleitproteinen Tropomyosin und dem Troponin-Komplex (vgl. Abbildung 2).

Die Myosinfilamente bestehen aus einer Schwanz- und einer Kopf-Domäne (vgl. Abbildung 2) und sind durch das Protein Titin mit der Z-Scheibe verbunden. Die Kopfdomäne der Myosinfilamente ist für die Bindung mit dem Aktinfilament und den Kontraktionszyklus essentiell. Die A-Bande stellt den Bereich der Aktin- und vorherrschend der Myosinfilamenten dar, wohingegen die H-Zone nur durch die Myosinfilamente gebildet wird (Pape 2014; Lüllmann-Rauch and Asan 2015).

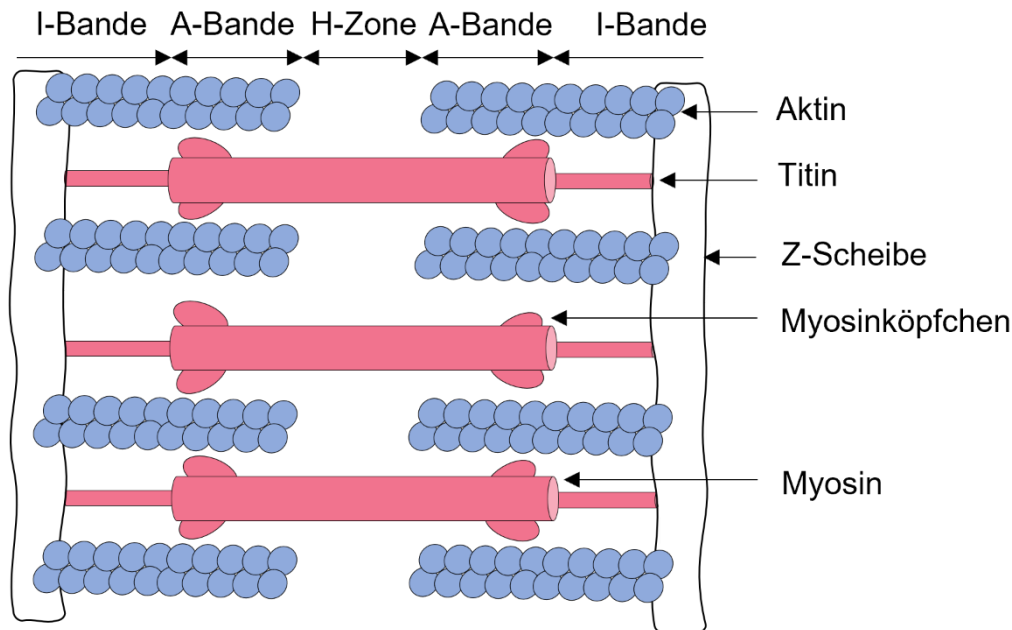


Abbildung 1: Aufbau eines Sarkomers

Ein Sarkomer ist die kleinste kontraktile Einheit im Muskel, die durch Z-Scheiben begrenzt wird und Aktin- und Myosinfilamente enthält. In der I-Bande (im Elektronenmikroskop isotrop, einfach brechend) sind nur Aktinfilamente, in der A-Bande (im Elektronenmikroskop anisotrop, doppelt brechend) beide Filamente und in der H-Zone nur Myosinfilamente vorzufinden. Die Myosinfilamente sind über das Protein Titin mit der Z-Scheibe verbunden. Die Struktur der Filamente zueinander ist essentiell für die Entstehung einer Kontraktion. Eigene vereinfachte Darstellung nach (Pape 2014; Lüllmann-Rauch and Asan 2015).

Die Herzmuskulatur kann durch Umbauprozesse, sogenanntes kardiales Remodelling, auf verschiedene Reize reagieren. Durch Sport oder eine Schwangerschaft kommt es zu einer vermehrten kardialen Belastung, die zu einer geringen, reversiblen Vergrößerung der Zellgröße führt und als physiologische Hypertrophie bezeichnet wird. Im Gegensatz dazu kommt es bei mechanischem Stress der Kardiomyozyten als Folge eines arteriellen Hypertonus oder eines Klappendefekt zu einer pathologischen Hypertrophie. Diese ist nicht reversibel und führt zu einer längerfristigen Einschränkung der Kontraktilität und Relaxation des Herzens und somit zu einer geringen Perfusionsleistung (Samak et al. 2016; Hill and Olson 2008).

Neben der kardialen Hypertrophie kann das kardiale Remodelling zu einer Verkleinerung der Herzmuskulatur, einer Atrophie, führen. Die kardiale Atrophie ist Folge einer Verschiebung des Gleichgewichts von einer Proteinsynthese zu einem erhöhten Proteinabbau innerhalb der Kardiomyozyten. Die Ursachen dieser

Entwicklung können Folge einer Mangelernährung, einer längeren Bettlägerigkeit oder von Krebserkrankungen bzw. derer Therapien sein (Hill and Olson 2008).

1.1.3 Kontraktionszyklus einer Herzmuskelzelle

Der Kontraktionszyklus einer Herzmuskelzelle beginnt mit der Erregung der Kardiomyozyten durch ein Aktionspotential. Dieses wird durch den Sinus- oder Atrioventrikularknoten gebildet und breitet sich über das His'sche Bündel und die Purkinje-Faser über die Ventrikel aus. Die Depolarisation der einzelnen Kardiomyozyte führt zu einer Freisetzung von Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum, welches den Kontraktionszyklus induziert. Neben dem intrazellulären Calcium wird auch ATP als Energieträger für die kontraktile Funktion benötigt. Die Grundlage für die Kontraktion bildet die Interaktion zwischen Myosin- und Aktinfilamenten (vgl. Abbildung 2).

Im Grundzustand befindet sich der Myosinkopf durch Bindung von ATP auf einem energetisch niedrigen Niveau. Die Bindungsstelle zwischen Aktin und Myosin ist durch die Regulatorproteine Tropomyosin und Troponin C blockiert. Die Hydrolyse des gebundenen ATPs zu ADP und Phosphat induziert eine Veränderung des Neigungswinkels des Myosinkopfes zu einer energiereicheren Position. Für eine Kontraktion wird der intrazelluläre Calciumeinstrom benötigt. Calcium bindet an das Troponin C, wodurch es seine Konformation ändert und das Tropomyosin verdrängt. Dies ermöglicht eine Verbindung zwischen dem Myosinkopf und dem Aktinfilament, was als Querbrückenverbindung bezeichnet wird. Durch Freisetzung des durch ATP-Hydrolyse entstandenen Phosphats kommt es einer Verschiebung zwischen Myosin- und Aktinfilamenten um 6 - 8 nm, was eine Verkürzung des Sarcomers bewirkt und so zu einer Kontraktion führt. Nach Freisetzen des ADPs und Bindung von ATP löst sich das Myosinköpfchen vom Aktinfilament und kann nach Hydrolyse eine weitere Bindung eingehen (Pape 2014).

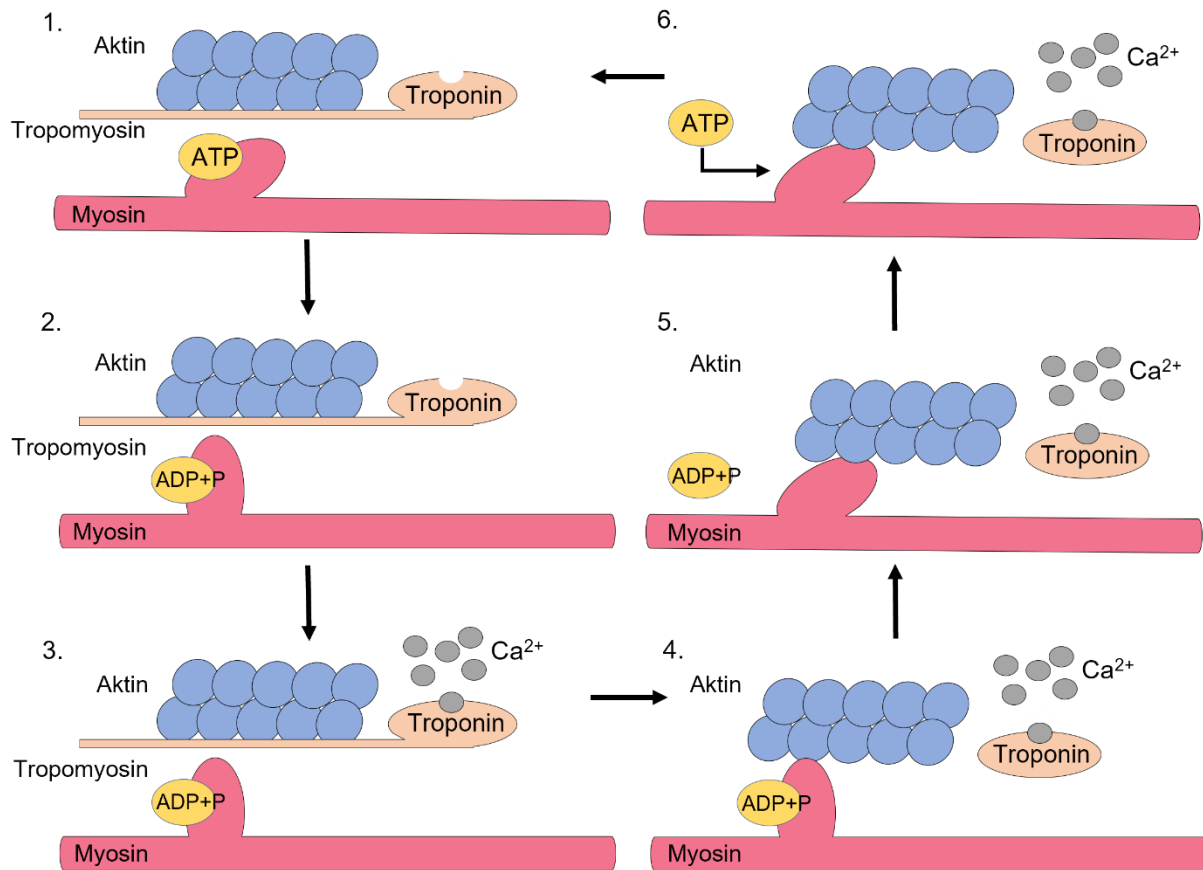


Abbildung 2: Kontraktionszyklus einer Herzmuskelzelle.

Die Herzmuskelzelle besteht aus Myosin- und Aktinfilamenten. Eine Verbindung vom Myosinköpfchen zum Aktinfilament wird durch Tropomyosin blockiert (1). Durch Hydrolyse des ATPs des Myosinköpfchens kommt es zu einer energiereichen Stellungsänderung (2). Calcium bindet Troponin (3) und führt zu einer Konformationsänderung des Tropomyosins, welches eine Verbindung zwischen Myosin- und Aktinfilament ermöglicht (4). Die Freisetzung des ADP und Phosphats führt zu einer Verschiebung der Filamente (5). Anschließend ist eine erneute ATP Bindung notwendig, um einen weiteren Kontraktionsvorgang einzuleiten (6). Eigene Darstellung nach (Pape 2014).

1.1.4 Mitochondrium

Das Herz benötigt zur Aufrechterhaltung des Membranpotentials und seiner kontraktile Funktion eine konstante Energiezufuhr. Die Energiespeicher der Herzmuskelzellen reichen nur für wenige Herzschläge (Brown et al. 2017). Zur Deckung des erhöhten Energiebedarfs werden großen Menge an ATP benötigt, die in den Herzmuskelzellen vor allem durch die Mitochondrien bereitgestellt werden.

Aufgrund diesen hohen Energiebedarfs nehmen die Mitochondrien je nach Organismus 22 – 37 % des Volumens eines Kardiomyozyten ein (Barth 1992). Eine mitochondriale Dysfunktion ist an der Entstehung verschiedener kardiovaskulärer Krankheiten wie Herzinsuffizienz oder Kardiomyopathien beteiligt (Murphy et al. 2016; Brown et al. 2017). Zudem konnte eine Reduktion der Mitochondrien und Autophagie in Herzen septischer Versuchstiere nach CLP-Operation gemessen werden (Watts et al. 2004).

Mitochondrien sind essenzielle eukaryontische, intrazelluläre Organellen. Eine ihrer Hauptfunktionen ist die sauerstoffabhängige Synthese von Adenosintriphosphat (ATP) durch oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) (vgl. Abbildung 3). Bei der oxidativen Phosphorylierung handelt es sich um eine chemieosmotische Kopplung eines Redoxprozesses, was zur Bildung von ATP führt (Mitchel 1961). Als Ausgangsstoffe für diesen Prozess dienen die Reduktionsäquivalente Nikotinamidadenindinukleotid (NADH) und Flavinadenindinukleotid (FADH), deren Elektronen über die Atmungskette transportiert werden. Die Atmungskette besteht aus der NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I), der Succinat-Dehydrogenase-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex II), der Ubichinon-Cytochrom-c-Oxidoreduktase (Komplex III) und der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV). Das Ziel der Atmungskette ist die Ausbildung eines Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran durch Transport von Protonen aus der Mitochondrienmatrix in den Raum zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran (Intermembranraum). Durch die Komplexe I, III und IV werden Protonen aktiv in den Intermembranraum transportiert. Komplex II transportiert keine Protonen in den Intermembranraum, sondern überträgt diese auf Ubichinon, welches dann in Komplex III verwertet wird. Der anschließende Rückfluss von Protonen aus dem Intermembranraum in die Mitochondrienmatrix entlang zuvor aufgebauten elektrochemischen Gradienten, erfolgt über den Komplex V, der diesen Protonengradienten für die ATP-Synthese nutzt und so die Energieversorgung der Zelle sicherstellt (Sun et al. 2013). Die Messung der Aktivität der mitochondrialen Atmungskette und der verwendeten Substanzen und Inhibitoren wird im Kapitel 3.6 (Material und Methoden) beschrieben.

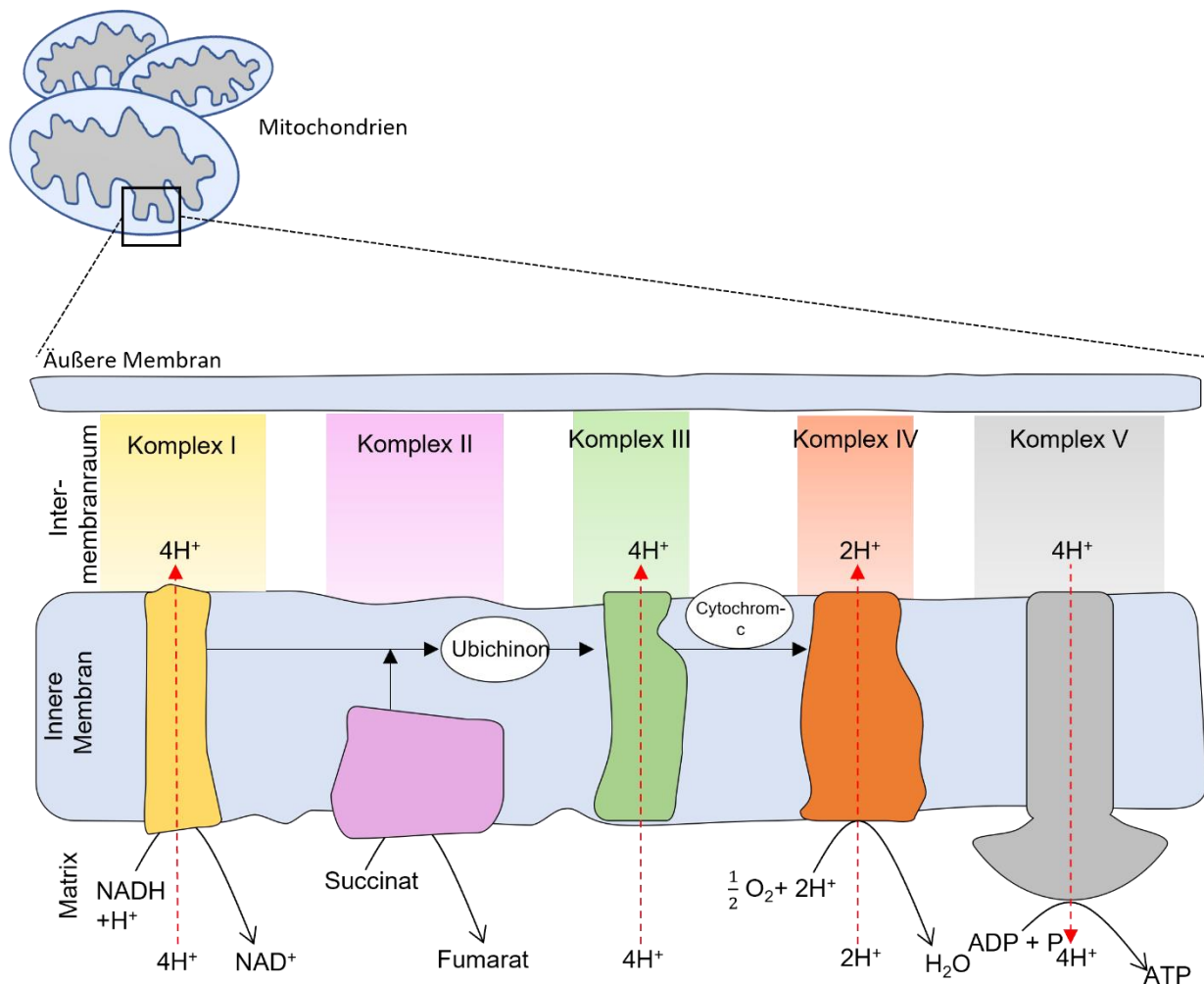


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Atmungskette.

Die mitochondriale Atmungskette dient der Bereitstellung von Energie in Form von ATP. Das Nikotinamidadenininukleotid (NADH) überträgt Elektronen über die NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I) auf Ubichinon und dabei werden vier Protonen in den Intermembranraum gepumpt. Über die Succinat-Dehydrogenase-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex II) werden ebenfalls Elektronen auf Ubichinon übertragen. In der Ubichinon-Cytochrom-c-Oxidoreduktase (Komplex III) werden Elektronen auf Cytochrom C übertragen. Cytochrom C wird somit reduziert. Dabei werden vier Protonen in den Intermembranraum transportiert. Die Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) oxidiert Cytochrom C zurück und reduziert Sauerstoff zu Wasser. Zwei Protonen werden in den Intermembranraum übertragen. Die sich im Intermembranraum befindlichen Protonen folgen dem entstandenen Gradienten durch die ATP-Synthase (Komplex V) und katalysieren die Synthese von ATP. Eigene Darstellung nach (Sun et al. 2013).

Mitochondrien sind durch verschiedene Anpassungsreaktionen in der Lage sich auf die stetig wechselnden, energetischen Anforderungen der Kardiomyozyten anzupassen (vgl. Abbildung 4):

a) Mitochondriale Biogenese

Langanhaltenden Stimuli wie Muskeltraining oder Fasten fördern die mitochondriale Biogenese durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie *peroxisome proliferator-activated receptor γ* (PPAR γ) - *coactivator-1 α* (PGC-1 α). PGC-1 α gilt als Hauptregulator der mitochondrialen Biogenese, wodurch die Produktion von Mitochondrien gesteigert wird (Patten and Arany 2012; Di et al. 2018).

b) Mitochondriale Fusion (engl. *fusion*)

Die Fusion von gesunden und defekten Mitochondrien dient dem Austausch von Proteinen und RNA zwischen ihnen. Dadurch wird die Funktion der defekten Mitochondrien unterstützt (Youle and van der Bliek, Alexander M. 2012). Die Mitochondrien Fusion wird durch Mitofusin-1 (Gen *Mfn-1*) und Mitofusin-2 (Gen *Mfn-2*) an der äußeren Mitochondrienmembran und *optic atrophy-1* (OPA-1; Gen *Opa-1*) in der inneren Mitochondrienmembran vermittelt (Gottlieb and Bernstein 2016) (vgl. Abbildung 4).

c) Mitochondriale Spaltung (engl. *fission*)

Die Spaltung von Mitochondrien dient der Abtrennung und Entfernung von beschädigten Organellanteilen. Das mitochondriale Fission Protein 1 (FIS1, Gen *Fis-1*) dient je nach Organismus der Rekrutierung des jeweiligen cytosolischen Dynamin-1 verwandten Proteins (DRP1, Gen *Drp-1*). Dieses lagert sich in die äußere mitochondriale Membran ein und führt zur Spaltung eines Mitochondriums in zwei Tochter-Mitochondrien (vgl. Abbildung 4).

d) Mitochondriale Autophagie (*Mitophagie*)

Der Prozess der mitochondrialen Autophagie (Mitophagie) sorgt für die Entfernung von durch mitochondriale Spaltung abgespaltenen defekten Mitochondrien. Hierbei kommt es in den defekten Mitochondrien zu einer Akkumulation von *PTEN-induced putative kinase 1* (PINK1), welche zur Bindung von Parkin führt. Parkin aktiviert die Autophagie

über die Proteine p62 und dem Mikrotubulin-assoziierten Protein 1A/1B leichte Kette 3 (Lc3) (Gottlieb and Bernstein 2016).

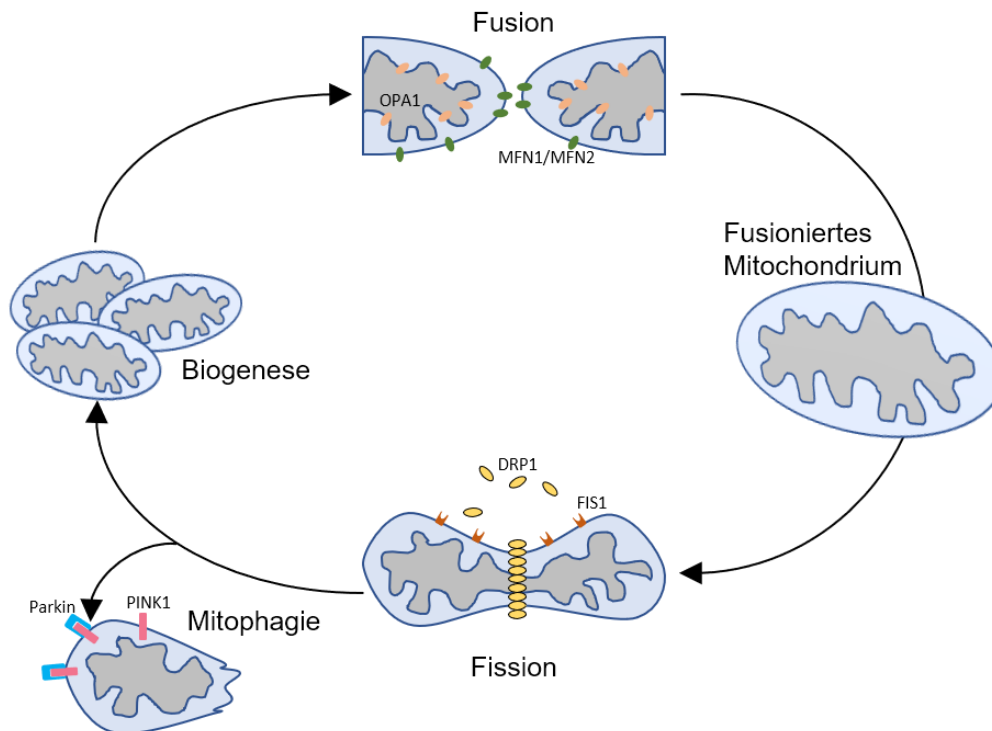


Abbildung 4: Übersicht der dynamischen mitochondrialen Prozesse.

Zunächst werden durch den Prozess der **Biogenese** Mitochondrien synthetisiert. Die Regulation dieser Prozesse wird in Kardiomyozyten vor allem durch *peroxisome proliferator-activated receptor* γ (PPAR γ) - *coactivator-1 α* (PGC-1 α , Gen *Ppargc1a*) vermittelt. Einzelne Mitochondrien werden durch **Fusion** an der inneren Membran durch *optic atrophy-1* (OPA1) und an der äußeren durch Mitofusin-1 und Mitofusin-2 (MFN1/MFN2) zu einem Mitochondrium verbunden. Die Teilung der Mitochondrien erfolgt durch **Fission**. Die Regulation wird durch das cytosolische Dynamin 1 verwandte Protein (DRP1) und das mitochondriale Fissions Protein (FIS1) vermittelt. Defekte Mitochondrien werden durch Akkumulation von PINK1 und anschließend Bindung von Parkin zum Abbau durch Autophagosomen (**Mitophagie**) markiert. Eigene Darstellung nach (Gottlieb and Bernstein 2016).

1.2 Sepsis

1.2.1 Definition der Sepsis

Bei dem Krankheitsbild der Sepsis handelt es sich, entsprechend der *Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)* von 2016, um eine pathologisch überschießende Immunreaktion des menschlichen Körpers auf eine vermutete oder nachgewiesene Infektion, die einer sofortigen Behandlung mit intensiver Fokussuche und -sanierung bedarf. Hierbei steht vor allem die Therapie der Organdysfunktion im Vordergrund, zunächst unter probatorischer Annahme einer pulmonalen oder renalen Infektionsgenese.

In der Klinik wird der *Sequential Organ Failure Assessment (SOFA)*-Score für die Beurteilung des Schweregrades einer Organdysfunktion verwendet. Als Bedingung für eine Organdysfunktion gilt die akute Veränderung von mindestens zwei Punkten des SOFA-Scores. Ein SOFA Score von mindestens zwei Punkten ist mit einer Mortalität von 10 % assoziiert (Singer et al. 2016). Für die klinische Ersteinschätzung einer Sepsis kann der sogenannte *quick-SOFA (qSOFA)* Score verwendet werden (vgl. Abbildung 5). Bei Vorliegen von mindestens zwei der drei qSOFA Kriterien ist eine Sepsis des Patienten anzunehmen. Kommt es im Verlauf der Sepsis zu einer zellulären, metabolischen Funktionseinschränkung und einem Kreislaufversagen, welches zur adäquaten Volumengabe eine Katecholamintherapie erfordert und ein Serum-Laktat von über 2 mmol/L ausweist, so entspricht dies einem septischen Schock (Singer et al. 2016).

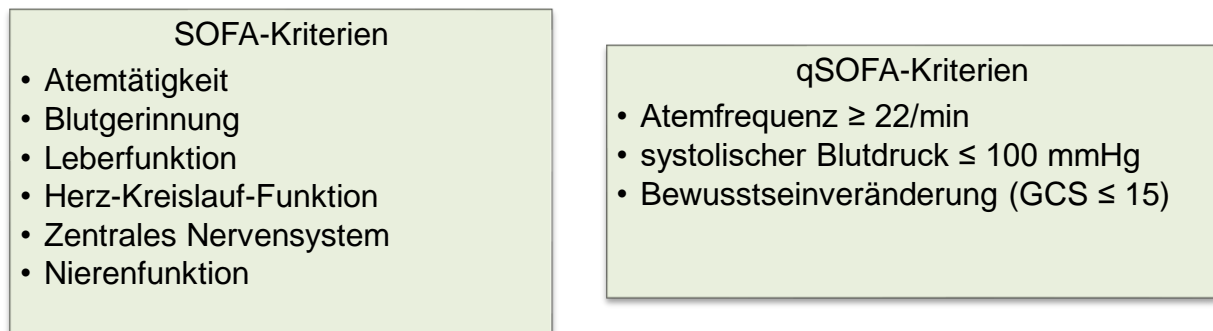


Abbildung 5: **Überblick über den SOFA- und qSOFA Score.**

Der *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA) Score dient der klinischen Feststellung des Schweregrades einer Organdysfunktion und korreliert mit der Mortalität. In der linken Darstellung sind die in den SOFA Score eingehende Kriterien aufgeführt. Als vereinfachte Form des SOFA-Score dient der „*quick-SOFA*“ (qSOFA) Score, der zur klinischen Ersteinschätzung bei Verdacht auf eine Sepsis verwendet wird. Die qSOFA Kriterien sind auf der rechten Seite dargestellt. Eigene Darstellung nach (Singer et al. 2016). GCS (*Glasgow-Coma-Scale*)

1.2.2 Epidemiologie der Sepsis

Eine Sepsis zählt weltweit zu den Haupttodesursachen. Im Jahre 2017 wurden weltweit 48,9 Millionen Sepsisfälle und 11 Millionen Sepsis-bedingte Todesfälle registriert. Diese entsprachen 20 % aller weltweit registrierten Todesfälle in diesem Zeitraum. Zwischen 1990 und 2017 sank die Anzahl der Sepsisfälle um 18,8 % und die altersstandardisierte Inzidenz nahm um 37 % ab (Rudd et al. 2020). Trotz sinkender Zahlen bedingen die entstehenden Behandlungskosten einer Sepsis mit 23,7 Milliarden US\$ im Jahre 2013 die höchsten Ausgaben im Gesundheitssektor der USA (Celeste M Torio and Brian J Moore 2016).

In Deutschland konnte von 2007 – 2013 ein Anstieg der Sepsis Fälle um 5,7 % pro Jahr auf insgesamt 279.530 Sepsisfälle im Jahr 2013 registriert werden. Von diesen Fällen verstarben 2013 67.849 Patienten, was einer Mortalität von 24,3 % entspricht (Fleischmann et al. 2016).

1.2.3 Sepsis-induzierte Kardiomyopathie

Die septische Kardiomyopathie, als prognosebestimmende Begleiterkrankung einer Sepsis, erfährt oft keine ausreichende Beachtung in der Klinik (Ebelt and Werdan 2010).

1.2.3.1 Veränderung der Herzfunktion in der Sepsis

Eine Sepsis-induzierte Kardiomyopathie als Komplikation einer schweren Sepsis und eines septischen Schocks wurde im Jahre 1984 erstmalig durch Parker et al. mit Hilfe der Radionuklidventrikulographie beschrieben. Die betroffenen Patienten zeigten eine rasch auftretende Verminderung der linksventrikulären Ejektionsfraktion und eine Vergrößerung des linken Ventrikels. Sieben bis zehn Tage nach erfolgreicher Behandlung der Sepsis war jedoch eine Reversibilität der kardialen Veränderungen und eine Normalisierung der Funktionsparameter festzustellen (Parker et al. 1984). Diese Beobachtungen wurden in den folgenden Jahren in weiteren klinischen Studien (Ellrodt et al. 1985; Parker et al. 1990; Bloch et al. 2016) und experimentellen Untersuchungen (Natanson et al. 1989; Suffredini et al. 1989) bestätigt. Die Inzidenz der Sepsis-induzierten Kardiomyopathie ist aufgrund der nicht eindeutig festgelegten diagnostischen Kriterien schwer zu eruieren (Beesley et al. 2018). In der Literatur werden Inzidenzen von 14 % (Sato et al. 2016) bis zu 60 % (Vieillard-Baron et al. 2008) beschrieben. Allgemein gilt das Vorliegen einer systolischen und diastolischen Dysfunktion als starker Prädiktor für eine früher und vermehrt auftretende Mortalität (Landesberg et al. 2012; Wilhelm et al. 2013; Sanfilippo et al. 2015; L'Heureux et al. 2020). Die Pathophysiologie der Sepsis-induzierten Kardiomyopathie ist bis dato unklar und mehrere Faktoren werden als Ursache diskutiert (Flierl et al. 2008).

1.2.3.2 Diagnostik der septischen Kardiomyopathie

Die Diagnose einer Sepsis-induzierten Kardiomyopathie ist schwer zu stellen und klare Kriterien für die Diagnosestellung fehlen (L'Heureux et al. 2020).

Um diesen Umstand zu verbessern, wurden bekannte Biomarker in klinischen Studien auf ihre Aussagekraft hinsichtlich der Diagnose einer septischen Kardiomyopathie untersucht. Der Serumspiegel von natriuretischen Peptiden (z.B. *B-type Natriuretic Peptide*, BNP) wird in der Kardiologie vor allem in der Diagnostik der Herzinsuffizienz und der kardialen Dysfunktion verwendet (Maalouf and Bailey 2016). In Studien konnte

BNP als ein Biomarker für die Schwere und die Prognose einer Sepsis ermittelt werden (Charpentier et al. 2004), dennoch ist er nicht zur Diagnosestellung einer Sepsis-induzierten Kardiomyopathie geeignet (Rudiger et al. 2006; Roch et al. 2005). Weiterhin wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Biomarkern Troponin I, dem hochsensitiven Troponin T (hsTnT) und einer Sepsis untersucht. Bei Troponin handelt es sich um ein Strukturprotein des kontraktiven Herzapparates. Es bildet einen Komplex, der aus drei Untereinheiten, dem Troponin I, dem Troponin T und dem Troponin C besteht. Bei einer Herzmuskelschädigung, die beispielsweise als Folge eines Herzinfarktes entstehen kann, werden die verschiedenen Troponine in den Blutstrom freigesetzt und sind laborchemisch nachweisbar (Lüllmann-Rauch and Asan 2015). Troponin wurde erstmalig 1965 beschrieben und wird als Marker zur Detektion von myokardialer Ischämie und Herzinfarkten verwendet (Ebashi and Kodama 1965; Garg et al. 2017). In Studien zeigte sich eine Korrelation zwischen erhöhten Troponin I-Werten und der Schwere der Sepsis sowie ihrer Mortalität (Bessière et al. 2013; Fernandes et al. 1999). Außerdem besteht ein Zusammenhang zwischen erhöhten hsTnT-Werten und einer reduzierten systolischen und diastolischen Herzfunktion (Landesberg et al. 2012; Landesberg et al. 2014). Da erhöhte Troponin-Werte nicht nur in der Sepsis, sondern auch bei verschiedenen anderen Krankheitsprozessen, wie beispielsweise einem Myokardinfarkt, Nierenfunktionsstörungen oder akute neurologische Ereignisse auftreten ist dessen Verwendung als Biomarker für die spezifische Diagnostik einer septischen Kardiomyopathie nur eingeschränkt möglich.

Aufgrund der ubiquitär zugänglichen und gut etablierten Echokardiographie setzt sich diese zur Diagnosestellung der septischen Kardiomyopathie durch. Jedoch wird die Evidenz der Echokardiographie in der Diagnose der septischen Kardiomyopathie aufgrund unterschiedlicher Studienergebnisse als sehr gering bis gering eingeschätzt (vgl. Tabelle 1) (Ehrman et al. 2018).

Tabelle 1: Übersicht von echokardiographischen Parametern zur Diagnostik oder Prognose der Überlebenschancen einer Sepsis-induzierten Kardiomyopathie. Eigene tabellarische Darstellung nach (Ehrman et al. 2018)

Echokardiographische Parameter			Referenz
Ejektionsfraktion (LVEF)	↓	Septische Patienten zeigten eine verringerte LVEF. Die LVEF von Genesenen war geringer als die der Verstorbenen.	(Parker et al. 1984; Jardin et al. 1999)
	↔	In einer Metaanalyse aus 14 Studien konnte kein Unterschied in der LVEF zwischen Genesenen und Erkrankten nachgewiesen werden.	(Huang et al. 2013)
Globaler Longitudinaler 2D Strain (GLS)	↓	GLS Messungen können als prognostischer Marker für die Sterblichkeit verwendet werden.	(Chang et al. 2015)
	↔	Es konnte kein Unterschied in den GLS Messungen zwischen Genesenen und Verstorbenen mit septischem Schock nachgewiesen werden.	(Geer et al. 2015)
e' und E/e'	↓	Eine verringerte septale e' Welle und ein vergrößertes E/e' Verhältnis ist mit einer erhöhten Sterblichkeit assoziiert.	(Landesberg et al. 2012)

1.2.3.3 Sepsis-induzierte Veränderung von Herzmuskelzellen

Parrillo et al. isolierten Kardiomyozyten von Ratten und inkubierten diese mit Serum von Patienten mit septischem Schock. Sie beobachteten, dass dadurch die Zellverkürzung der Kardiomyozyten, d.h. deren Kontraktion, gehemmt wurde (Parrillo et al. 1985). In den folgenden Jahren gelang es unter anderem TNF und Interleukin-1 β (Kumar et al. 1996), den Komplementfaktor C5a (Niederbichler et al. 2006), Interleukin-2 und Interleukin-6 (IL-6) (Finkel et al. 1992) als kardiodepressive Zytokine zu identifizieren. Pathan et al. beschrieben eine Korrelation zwischen der Serum IL-6 Konzentration und der Schwere einer Meningokokken Sepsis. Weiterhin konnten sie nachweisen, dass rekombinantes IL-6 und Serum von Patienten mit Meningokokken-Sepsis die Kontraktilität von Ratten-Kardiomyozyten ähnlich stark vermindern. Erfolgte eine vorherige Immunabsorption von IL-6 aus dem Serum der septischen Patienten,

konnten die kardiodepressiven Effekte aufgehoben werden (Pathan et al. 2004). Außerdem scheint der Calciumstoffwechsel und die Calciumsensitivität von Kardiomyozyten durch inflammatorische Zytokine beeinträchtigt zu sein. Zhong et al. wiesen eine verringertes Aktionspotentialdauer sowie einen verringerten Calciumfluss über die L-typ Calciumkanäle in Kardiomyozyten von mit Endotoxin behandelten Meerschweinchen nach (Zhong et al. 1997). Des Weiteren werden L-typ Calcium Kanäle unter Endotoxin-Behandlung vermindert exprimiert, was für eine verminderte linksventrikulären Kontraktilität verantwortlich sein könnte (Lew et al. 1996). In einem fäkalen Peritonitis Sepsis-Modell in Schweinen konnten ebenfalls verringerte Calcium-Effekte in isolierten Kardiomyozyten gezeigt werden (Jarkovska et al. 2018). Auch in mit Endotoxin behandelten Kaninchen ist die Calciumsensitivität von Einzelfasern aus dem Rattenmyokard reduziert (Tavernier 1998). Eine verminderte mitochondriale Funktion wird als weitere Ursache einer septischen Kardiomyopathie diskutiert. Belege für einen Zusammenhang zwischen der klinischen Schwere der Sepsis und der mitochondrialen Dysfunktion erbrachten Brealey et al. (Brealey et al. 2004). In Herzen von septischen Tieren wurden weniger Mitochondrien, sowie ein Energiedefizit als Folge einer verringerten ATP-, Kreatininphosphat- und Glykogenkonzentration nachgewiesen (Watts et al. 2004), ebenso wie eine verminderte Aktivität der Atmungskette (Levy et al. 2004; Jarkovska et al. 2018).

1.2.3.4 Therapie der septischen Kardiomyopathie

Ein spezifisches Konzept zur Behandlung der Sepsis-induzierten Kardiomyopathie ist nicht etabliert (L'Heureux et al. 2020; Beesley et al. 2018). Im Vordergrund steht die Therapie der Sepsis nach S3-Leitlinie (Brunkhorst et al. 2020).

1.3 Interleukin-6

Im Jahr 1986 wurde die cDNA eines B-Zell stimulierenden Faktor 2 von der Kishimoto Gruppe in Japan entdeckt (Hirano et al. 1986). Mit Hilfe der isolierten cDNA wurde festgestellt, dass es sich bei weiteren, zur selben Zeit isolierten Proteinen, wie dem 26 kDa Protein (Haegeman et al. 1986), Interferon β_2 (Zilberstein et al. 1986), Hepatozyten-simulierender Faktor (Gauldie et al. 1987) und dem Hybridoma Plasmacytoma-Wachstumsfaktor (Brakenhoff et al. 1987) um dasselbe Protein handelt, dass im Kontext unterschiedlicher Funktionen untersucht worden ist.

Daher beschloss die *New York Academy of Science* im Jahre 1988 die einheitliche Bezeichnung als Interleukin-6 (IL-6) (Sehgal et al. 1988; Sehgal et al. 1989).

IL-6 ist das namensgebende Zytokin der IL-6-Zytokinfamilie, zu der u.a. auch IL-11, Cardiotrophin-1 (CT-1), Leukozyten-induzierender Faktor (LIF), Neuropoitin (NPN) und Oncostatin-M (OSM) gehören (Rose-John 2018). IL-6 wird in diversen Zellarten, wie den Makrophagen, Monozyten, Epithel- und Endothelzellen, sowie in einigen malignen Tumorzelllinien produziert (Heinrich et al. 1990). Es besitzt vielfältige Funktionen in der Immunantwort, der Hämatopoese und der Entwicklung von Entzündungsreaktionen (vgl. Abbildung 6). Außerdem beeinflusst IL-6 die Funktionen verschiedener Organe, wie zum Beispiel dem Herzen. In zwei prospektiven Patientenstudien und einer Metaanalyse konnte festgestellt werden, dass langfristig erhöhte IL-6-Plasmaspiegel mit dem Risiko einer koronaren Herzkrankheit assoziiert sind. Diese Assoziation ist ansonsten nur für etablierte kardiovaskuläre Risikofaktoren bekannt (Danesh et al. 2008). Es konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass chronisch erhöhte IL-6 Spiegel zu einer Hypertrophie (Terrell et al. 2006; Tanaka et al. 2004) und verringerten Kontraktilität von Kardiomyozyten führen (Kinugawa et al. 1994).

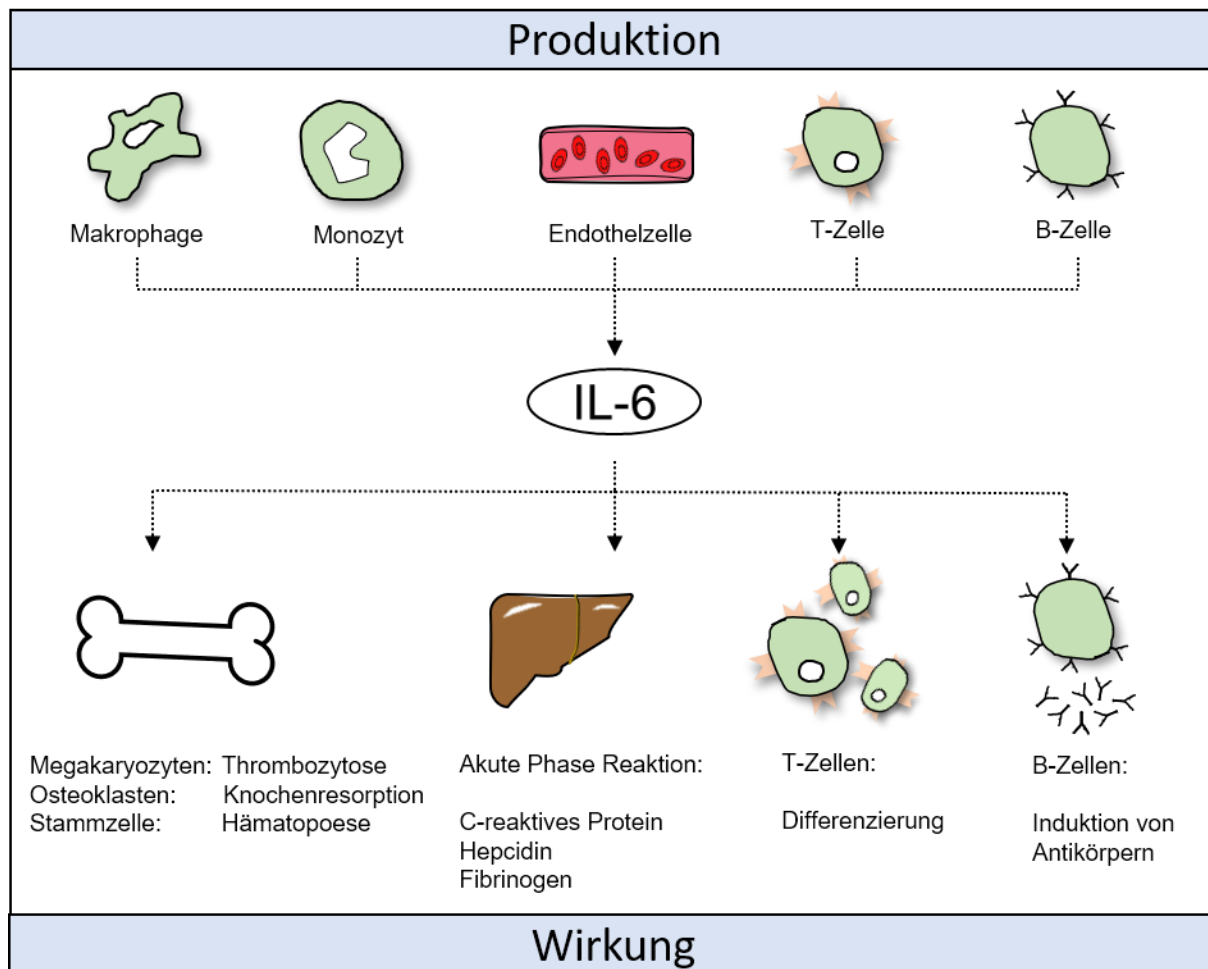


Abbildung 6: **Interleukin-6 Produktion und Wirkung.**

Interleukin-6 (IL-6) wird von verschiedenen Zellen des menschlichen Körpers produziert. Hierzu zählen Zellen der Immunabwehr, wie Makrophagen, Monozyten, T- und B-Zellen sowie Endothelzellen. Keratozyten und Mesangiumzellen produzieren ebenfalls IL-6, sind aber aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. IL-6 stimuliert Megakaryozyten, Osteoklasten und Stammzellen. Zudem induziert IL-6 die Thrombozytose, Knochenresorption und Hämatopoese. In der Leber wird durch IL-6 die Akute Phase Reaktion mit Bildung vom C-reaktiven Protein, Hepcidin und Fibrinogen eingeleitet. In T-Zellen wird die Differenzierung angeregt und B-Zellen werden zur Antikörperbildung stimuliert. Eigene Darstellung nach (Naka et al. 2002; Sebba 2008).

1.3.1 Der Interleukin-6/gp130/JAK/STAT-Signalweg

Der Rezeptor der IL-6-Zytokinfamilie (IL-6R) besteht aus zwei Untereinheiten, dem ubiquitär exprimierten, transmembranösen Glykoprotein 130 (*gp130* oder CD130) und der IL-6-Rezeptor- α -Untereinheit (IL-6R α oder CD126), die löslich oder membrangebunden vorliegen kann. Je nach Vorliegen des Rezeptors kann IL-6 seinen Signalweg auf zwei unterschiedliche Arten induzieren (vgl. Abbildung 7).

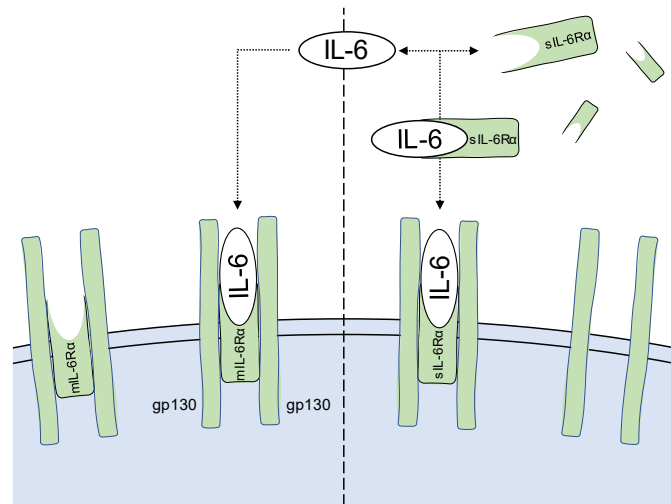


Abbildung 7: **Klassischer IL-6 Signalweg im Vergleich zum Trans-Signalweg.**

Interleukin-6 (IL-6) kann abhängig von der Zusammensetzung des IL-6-Rezeptors seine Signaltransduktion einleiten. Der *klassischen* Signalweg (links) wird durch eine Bindung von IL-6 an die membranständige IL-6-Rezeptor- α -Untereinheit (mIL-6R α) ausgelöst. Diese direkte Aktivierung des Signalweges ist nur in wenigen Zellen wie den Hepatozyten möglich, da diese den mIL-6R α exprimieren. Der *Trans*-Signalweg (rechts) ist an die Komplexbildung von IL-6 mit der löslichen IL-6-Rezeptor- α -Untereinheit (sIL-6R α) gebunden. Durch die Komplexbildung ist es möglich den IL-6 Signalweg in Zellen zu aktivieren, die keinen mIL-6R α besitzen, aber das Glykoprotein 130 (gp130) exprimieren. Eigene Darstellung nach (Rose-John 2018)

Beim *klassischen* IL-6 Signalweg bindet IL-6 direkt an den membrangebunden IL-6R α (mIL-6R α). Diese direkte Aktivierung ist nur bei Zellen möglich, die IL-6R α exprimieren, wie z.B. den Hepatozyten, Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und einen wenigen T-Zellpopulationen. Der klassische Signalweg ist mit anti-inflammatorischen Prozessen assoziiert. Im Gegensatz dazu wird für die Aktivierung des *Trans*-Signalwegs lösliche IL-6-Rezeptor α Untereinheit (sIL-6R α) benötigt. Die sIL-6R α kann dabei durch Splicing der IL-6R α Untereinheit mRNA (Lust

et al. 1992; Müllberg et al. 1993) oder durch enzymatische Spaltung des Proteins mittels Metalloproteasen (Matthews et al. 2003) bereitgestellt werden. Der Komplex, bestehend aus IL-6 und sIL-6R α bindet dann an den gp130 Rezeptor und aktiviert so die Signalkaskade. Das bedeutet auch, dass IL-6 so auch eine Reaktion in Zellen hervorrufen kann, die gp130 nicht aber den mL-6R α exprimieren, was die Zahl der möglichen Zielzellen deutlich erhöht.

Die Bindung von IL-6 an den Rezeptor initiiert die intrazelluläre Signalkaskade. Dabei werden zunächst Janus-assoziierte Kinasen (JAK, engl. *Janus-associated kinase*) aktiviert. Zur Familie der JAKs gehören JAK1, JAK2, JAK3 und Tyrosin-Kinase 2 (Tyk2). Diese sind dauerhaft mit dem zytoplasmatischen Anteil des gp130 Rezeptors verbunden (Stahl et al. 1994) und vermitteln die intrazelluläre IL-6 Signalweiterleitung (Guschin et al. 1995). Assoziierte JAKs werden durch andere JAKs, die sich an dem intrazellulären gp130 Rezeptor befinden an ihren Tyrosinresten phosphoryliert und phosphorylieren spezifische Tyrosine des intrazellulären gp130 Rezeptors. Diese phosphorylierten Tyrosine dienen als Erkennungsstelle für *Signal transducers and activators of transcription* (STAT) Proteine. Vor allem STAT3 und STAT1 binden an den intrazellulären Anteil des gp130 Rezeptors und werden an spezifischen Tyrosinresten (z.B. Y705) phosphoryliert. Nach Phosphorylierung lösen sich die STAT Proteine vom gp130 Rezeptor, bilden Homo – oder Heterodimere und translozieren in den Zellkern, wo sie an spezifischen STAT-Bindungsstellen im Promoter ihre Zielgene binden und deren Genexpression regulieren (Schaper and Rose-John 2015). Ein gut beschriebenes Zielgen des IL-6/JAK/STAT Signalwegs ist *Suppressor of cytokine signalling* (SOCS) 3, dessen Expression aktiviert wird (Starr et al. 1997; Endo et al. 1997). Das entstehende SOCS3 Protein bindet seinerseits wieder den zytosolischen gp130 Rezeptoranteil und die JAK Proteine und hemmt so den IL-6 Signalweg, wodurch ein negativer Rückkopplungsmechanismus (negativer Feedback) resultiert (vgl. Abbildung 8) (Schmitz et al. 2000; Carow and Rottenberg 2014).

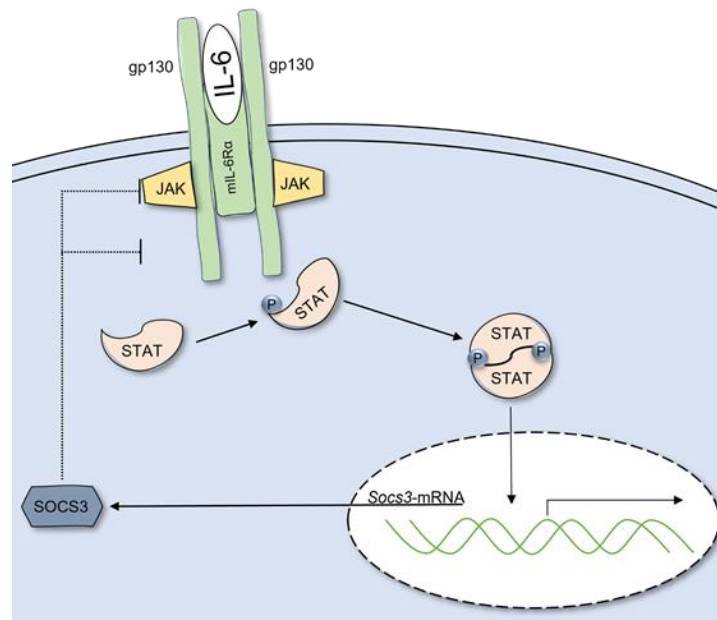


Abbildung 8: **IL-6/JAK/STAT-Signalweg.**

Die Initiierung des IL-6/JAK/STAT-Signalweges erfolgt durch die Bindung des IL-6-Rezeptorkomplexes mit IL-6. Dadurch wird die Autophosphorylierung von Janus-assoziierte Kinasen (JAKs) eingeleitet, die zur Phosphorylierung von *Signal transducers and activators of transcription* (STAT)-Proteinen führt. Diese bilden einen Homo – oder Heterodimere und gelangen in den Zellkern wo die Genexpression eingeleitet wird. Zugleich wird das *Suppressor of cytokine signalling* (Socs3) Gen transkribiert und translatiert, wodurch ein negativer Rückkopplungsmechanismus auf den gp130-Signalweg, durch Hemmung des gp130 Rezeptors und den JAKs ausgeübt wird. Eigene Darstellung nach (Schaper and Rose-John 2015).

1.4 Die Rolle des Interleukin-6 in der Pathogenese der Sepsis

Eine Sepsis kann durch eine Infektion mit einem Pathogen, wie Bakterien, Viren, Parasiten oder Pilzen, ausgelöst werden. Die sich auf oder in diesen Mikroorganismen befindlichen Pathogen-assoziierten molekularen Muster (engl. *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs)) werden unter anderem von Zellen des Immunsystems mit Hilfe von auf deren Oberfläche vorhandenen Mustererkennungsrezeptoren (engl. *pattern-recognition receptors* (PRRs)) erkannt (Takeuchi and Akira 2010). PRRs können auch Schaden-assoziierte molekulare Muster (engl. *damage-associated molecular patterns* (DAMPs)) erkennen. Hierbei handelt es sich um intrazelluläre Proteine, wie DNA, RNA, Hitzeschock Proteine und ATP, die durch Zellschädigung

nach extrazellulär gelangen und dort eine Erkennung durch vor allem Immunzellen ermöglichen (Raymond et al. 2017). Die Erkennung von PAMPs und DAMPs durch Makrophagen oder Monozyten führt zur Bildung von Zytokinen wie IL-6.

Im gesunden Menschen liegt der IL-6 Plasmaspiegel zwischen 1 – 6 pg/ml (Scambia et al. 1994). Erhöhte Plasmaspiegel von IL-6 konnten in septischen Patienten gemessen werden (Hack et al. 1989), die im Median auf bis zu 189 ng/ml ansteigen können (Waage et al. 1989). In einer Untersuchung von Patienten mit einer Meningokokken-Sepsis wurden durchschnittliche Werte von 20 ng/ml nachgewiesen (Pathan et al. 2004). Außerdem konnten Assoziationen zwischen dem IL-6 Plasmaspiegel und der Schwere der Sepsis aufgezeigt werden (Damas et al. 1992; Pinsky et al. 1993). Als diagnostischer Marker konnte sich IL-6 jedoch nicht etablieren, vielmehr könnte er zur Prognoseabschätzung in der Sepsis verwendet werden (Faix 2013).

Therapeutisch wurde mit Beginn der Entwicklung des humanisierten, monoklonalen IL-6-Rezeptor-Antikörpers, Tocilizumab im Jahre 1997, der Fokus auf die Inhibition der IL-6-Signalachse gelegt. In den folgenden Jahrzehnten wurden vermehrt Inhibitionen auf unterschiedlichen Ebenen der Signalkaskade untersucht (Garbers et al. 2018). Inzwischen konnte die Verwendung von IL-6 Antikörpern erfolgreich in der Therapie der rheumatoiden Arthritis (Narazaki et al. 2017) und der Riesenzellerarteriitis (Stone et al. 2017) etabliert werden.

Die Nutzen einer IL-6-Antikörpertherapie in der Sepsis beim Menschen ist bis dato unklar. Allerdings wurden anti-IL-6 Antikörper in Tierversuchen erfolgreich eingesetzt. Cuzzocrea et al. konnten zeigen, dass *IL-6* Knockout Mäuse im Vergleich zu Wildtyp (WT) Mäusen bei einer durch Zymosan-induzierten Peritonitis, weniger Organdysfunktionen entwickelten und länger überlebten (Cuzzocrea et al. 1999). Die Gabe von Anti-IL-6 Antikörpern steigerte das Überleben von Mäusen bei denen eine Sepsis durch CLP induziert wurde (Riedemann et al. 2003). Die Gabe von Anti-IL-6-Antikörpern reduzierte die Aktivierung der Blutgerinnung in *E. coli*-Endotoxin-behandelten Schimpansen (van der Poll et al. 1994). In einem zellulären Lipopolysaccharid (LPS)-Sepsis Modell konnte die Zytokin-Induktion, die Aktivierung der Inflammation und die Phagozytose durch den humanisierten antihumanen IL-6 Rezeptor-Antikörper Tocilizumab signifikant reduziert werden (Sheng et al. 2016). Barkhausen et al. konnten jedoch nachweisen, dass die Inhibition des Trans-

Signalweges unter Verwendung eines löslichen gp130 (sgp130) Immunglobulins gegenüber der Verwendung eines IL-6 Antikörpers bezüglich des Überlebens von Mäusen im CLP Modell signifikant überlegen ist. Zurückzuführen sei dies auf eine selektive Inhibition des Trans-Signalwegs, sodass die weiteren physiologischen Funktionen von IL-6 weiterhin ausgeführt werden können (Barkhausen et al. 2011). Da IL-6 auch antiinflammatorische Wirkungen hat wird dessen generelle Suppression, z.B. durch Antikörper kritisch gesehen (Xing et al. 1998). IL-6 Knockout-Mäuse zeigten zudem keinen Überlebensvorteil im Vergleich zur WT-Gruppe im CLP-Modell, was wiederum die Notwendigkeit der Aufrechterhaltung der physiologischen IL-6 Funktionen unterstreicht (Remick et al. 2005).

Im Rahmen der weltweiten SARS-CoV-2 Pandemie wurde die Verwendung von IL-6 Antikörper, z.B. Tocilizumab, erneut diskutiert. Grundlage der Diskussion war der Nachweis erhöhter Konzentrationen inflammatorischer Zytokine im Plasma schwer erkrankter COVID-19 Patienten. Zudem wurde gezeigt, dass die SARS-CoV-2-Infektion von Bronchialzellen zu einer gesteigerten IL-6 Produktion führt (Yoshikawa et al. 2009; Wang et al. 2020). Eine Metaanalyse von 27 randomisierten Studien konnte eine positive Assoziation zwischen der Verwendung von IL-6 Antikörpern und einer reduzierten 28-tägigen Mortalität von hospitalisierten SARS-CoV2 Patienten nachweisen (Shankar-Hari et al. 2021), woraufhin die Weltgesundheitsorganisation die Verwendung von IL-6 Antikörpern als Therapie von COVID-19 Patienten empfahl (WHO 2021).

2. Zielsetzung/Hypothese

Die Sepsis stellt mit ihrer hohen Inzidenz, der hohen Letalität und der enormen gesundheitswirtschaftlichen Kosten eine gesellschaftlich bedeutsame Erkrankung dar. Die Sepsis-induzierte Kardiomyopathie ist ein wesentlicher Faktor, der die erhöhte Morbidität und Mortalität in der Sepsis bedingt. Eine spezifische Therapie der Sepsis-induzierten Kardiomyopathie gibt es bisher nicht. Detaillierte Kenntnisse der Pathogenese der Sepsis-induzierten Kardiomyopathie böten die Möglichkeit spezifische Behandlungsansätze abzuleiten und diese bei Bedarf in den Rahmen der allgemeinen Sepsis-Therapie zu integrieren.

Das Ziel dieser Dissertation war es die Hypothese zu überprüfen, dass IL-6 eine Schlüsselrolle in der Entstehung der Sepsis-induzierten Kardiomyopathie spielt.

Daher sollte der Einfluss von IL-6 auf die Genregulation von Kardiomyozyten, hier exemplarisch an HL-1 Kardiomyozyten, untersucht werden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob Mäuse mit einer Kardiomyozyten-spezifischen Deletion des gp130 Rezeptors vor einer Sepsis-induzierten Kardiomyopathie geschützt sind. Der Fokus lag hierbei auf der Messung der Herzfunktion, der Quantifizierung der mitochondrialen Genexpression und der funktionellen Untersuchung der mitochondrialen Atmungskette.

Diese Arbeit sollte einen Beitrag zum weiteren Verständnis der Pathogenese der Sepsis-induzierten Kardiomyopathie leisten und die Rolle von IL-6 in der Entwicklung einer mitochondrialen Dysfunktion in der Sepsis-induzierten Kardiomyopathie aufzeigen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Labormaterialien

Tabelle 2: Geräte und Labormaterialien

Produkt	Hersteller
Axio Vert. A1 Mikroskop	Carl Zeiss, Jena
BeadBlaster™ 24 Microtube Homogenizer	Benchmark Scientific, Inc., USA
C-Chip Neubauerkammer	NanoEnTek Inc. Südkorea
ChemiDoc™ MP Imaging System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Echokardiograph	Vevo® 2100, FUJIFILM VisualSonics®, Inc.
Falcon® Multiwell 6-Well	Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, Niederlande
Flic20 PDMS Mikrofluidik Chip	Zellmechanik Dresden GmbH
HERAFreeze™ -80 °C	Heraeus, Hanau
HERASafe® Bench	Heraeus, Hanau
Infinite M200 Pro	Tecan, Männedorf, Schweiz
Inkubator	BINDER GmbH, Tuttlingen
Mehrkanalpipette (200 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Micro Star 17R	VWR, Darmstadt
MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
Mini PROTEAN® Tetra System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Oroboros Oxygraph -2K	Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich
PCR Workstation Pro	VWR, Darmstadt
PowerPac™ 200	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
PowerPac™ 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
ProFlex™ PCR System	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Rocking Platform	VWR, Darmstadt
Rotixa 50 RS	Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
Schüttelwasserbad SW22	Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland
TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamid Kit 12 %	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Thermo Mixer C	Eppendorf AG, Hamburg

Thermocycler	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge	VWR, Darmstadt
Trans Blot® Turbo™ Mini-size Nitrocellulose	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Trans Blot® Turbo™ Mini-size Transfer Stacks	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Vakuumabsaugsystem Vacusafe™ Integra	VWR, Darmstadt
Zentrifuge Rotina 46R	Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
IonOptix®	IonOptix LLC, Westwood, USA

3.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Hersteller
10x Tris-Glycin-Puffer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
2x Laemmli Puffer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
4x Laemmli Puffer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Albumin Fraktion 5	Roth, Karlsruhe
Alexa Fluor 568	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
CellCarier	Zellmechanik Dresden GmbH
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Clarity™ Western ECL Substrate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Claycomb Medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Diethylpyrocarbonat(DEPC)-behandeltes Wasser	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
Dharmafect™ 3 Transfektionsreagenz	Dharmacon, Lafayette, USA
Dithiothreitol (DTT) 0,1 M	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ethanol (70 %, 90 %)	Roth, Karlsruhe
FastStart™ Universal SYBR® Green Master (ROX)	Roche Diagnostik GmbH, Mannheim
Fetales Kälberserum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Fibronectin (1 mg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Fura 2-AM	Sigma, St. Louis, USA
Gelantine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
L-Glutamin, 200 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Norepinephrin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Nuklease-freies Wasser	Qiagen, Venlo, Niederlande
ON-TARGETplus® SMARTpool® Mouse IL6st 20 nmol	Dharmacon, Lafayette, USA
ON-TARGETplus® Control Pool Non-Targeting Pool 20 nmol	Dharmacon, Lafayette, USA

Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Precision Plus Protein™ Dual Color Standard	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Random Primer	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
Rekombinantes Maus IL-6	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
rml6/IL-6Rα	R&D Systems, Minneapolis, USA
RNaseOut™ Ribonuclease Inhibitor	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
ROTI®Load 1 (reduzierend)	Roth, Karlsruhe
SuperScript® II Reverse Transcriptase	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Thioharnstoff	Roth, Karlsruhe
Trans-Blot Turbo™ 5x Transferpuffer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
TRizol® Reagenz	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Trypsin Inhibitor Typ I-S, Soybean	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Harnstoff	Merck KGaA, Darmstadt

3.1.3 Antikörper, Oligonukleotide

Tabelle 4: Antikörper und Oligonukleotide

Name (Klonnummer)	Herkunft	Artikelnummer	Hersteller
GAPDH (D4C6R)	Maus	97166S	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
STAT3 (D3Z2G)	Kaninchen	12640S	
p-STAT3 (Tyr705) (D3A7)	Kaninchen	9145S	
GP130	Kaninchen	3732	

Name	Artikelnummer	Hersteller
Anti-Maus IgG HRP	7076S	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-Kaninchen IgG HRP	7074S	

3.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 5: Puffer und Lösungen

Produkt	Zusammensetzung
UT-Puffer	1,92 g Urea, 0,61 g Thioharnstoff, 2 ml Millipore-Wasser
1* Laufpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3
1*Transferpuffer	200 ml Ethanol, 200 ml 5*Transferpuffer, 1,6 l Aqua dest.
6xLaemmli Probenpuffer	5 ml Glycerol (87 %), Mercaptoethanol 7,5 ml, SDS 3 g, Bromphenolblau 23 µg, Roti®Load 1 37,5 ml
5% BSA	1,5 g Albumin-Fraktion 5 in 50 ml Millipore-Wasser
Triton X	0,1 % in PBS gelöst
Milchpulver	5 % in TBST gelöst
MIR06	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (0.5 mM) MgCl ₂ × 6 H ₂ O (3 mM) Taurin (20 mM) KH ₂ PO ₄ (10 mM) Ethansulfonsäure (HEPES) (20 mM) D-Sucrose (110 mM) Bovines Serumalbumin (1 g/l)
BIOPS	CaK ₂ EGTA (2.77 mM) K ₂ EGTA (7.23 mM) Na ₂ ATP (5.77 mM) MgCl ₂ × 6 H ₂ O (6.56 mM) Taurin (20 mM) Na ₂ Kreatinphosphat (15 mM) Imidazol (20 mM) Dithiothreitol (DTT) (0.5 mM) MES-Hydrat (50 mM)
Kollagenase-Lösung (IonOptix®)	Kollagenase Typ II (30-35 mg) Bovines Serumalbumin (174 mg) In 20 ml Isolations-/Hepespuffer + 25 µl 100mmol CaCl ₂ gelöst.

3.1.5 Nährmedien

Tabelle 6: Nährmedien

Medium	Zusammensetzung
Kulturmedium	Dulbecco's PBS FCS 10 % L-Glutamin (2 mM) Penicillin (100 U/ml) Streptomycin (100 µg/ml)
Spülmedium	Dulbecco's PBS Penicillin (100 U/ml) Streptomycin (100 µg/ml) FCS 5 %

3.1.6 Primersequenzen

Tabelle 7: Primersequenzen

Alle Primer basieren auf der genomischen DNA-Sequenz der Maus (*Mus musculus*), wurden selbst designt und von Eurofins Scientific, Luxemburg produziert.

Gen	Primersequenz (5'-3')
<i>Beclin1</i>	Forward: GGATGGTGTCTCTCGAAGATT Reverse: ATCAGAGTGAAGCTATTAGCACTTTC
<i>Drp1</i>	Forward: TCCCAATTCCATTATCCTCGC Reverse: CATCAGTACCCGCATCCATG
<i>Gapdh</i>	Forward: ATGGTGAAGGTCGGTGTGA Reverse: AATCTCCACTTTGCCACTGC
<i>Gp130</i>	Forward: CCCATGGGCAGGAATATAGA Reverse: CATAATCCAAGATTTTCCCATTG
<i>Mfn1</i>	Forward: CATTGCGTTTTCGGTTTTCCC Reverse: GAAGGAGCAGTAGGAGTTGAAG
<i>Mfn2</i>	Forward: CGAGGCTCTGGATTCACTTC Reverse: CAACCAGCCAGCTTTATTCC
<i>Myh6</i>	Forward: GCCAAGACTGTCCGGAATGA Reverse: TGGAAGATCACCCGGGACTT
<i>Myh7</i>	Forward: CGCATCAAGGAGCTCACC Reverse: CTGCAGCCGCAGTAGGTT
<i>Nppb</i>	Forward: GCACAAGATAGACCGGATCG Reverse: CTTCAAAGGTGGTCCCAGAG
<i>Ppargc1a</i>	Forward: TGAAAGGGCCAAACAGAGAG Reverse: GTAAATCACACGGCGCTCTT
<i>Socs3</i>	Forward: GAATTTTCGCTTCGGGACTAG Reverse: AACTTGCTGTGGGTGACCAT

Drp1 = *Dynamamin-related protein 1*; *Gapdh* = *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*; *Gp130* = *Glycoprotein 130*; *Mfn1* = *Mitofusin1*; *Mfn2* = *Mitofusin2*; *Myh6*-*Myosin heavy chain 6*; *Myh7* = *Myosin heavy chain 7*; *Nppb* = *Natriuretic Peptide B*; *Ppargc1a* = *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*; *Socs3* = *Suppressor of Cytokine Signaling 3*

3.1.7 Software

Tabelle 8: Verwendete Software

Software	Version	Hersteller
DatLab Software	Version 7.4	Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria
Excel 2016	Version 2016	Microsoft, Redmond, WA, USA
Graphpad Prism	Version 8.3.0	Graph Pad Software, La Jolla, CA, USA
Image Lab™	Version 6.0.1	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
QuantStudio™ Design & Analysis	Version 1.4.3	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA
ShapeOut	Version 0.9.1	Zellmechanik Dresden
Vevo® LAB software	Version 3.2.6	Vevo® 2100, FUJIFILM VisualSonics®, Inc.
Word 2016	Version 2016	Microsoft, Redmond, WA, USA

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Zelllinie

Sämtliche zellulären Experimente wurden mit immortalisierten atrialen Maus-Kardiomyozyten, konkret HL-1 Kardiomyozyten, durchgeführt, die von der *American Type Culture Collection* (ATCC) käuflich erworben wurden.

3.2.2 Kultivierung von HL-1 Kardiomyozyten

Die Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen innerhalb einer Sterilbank in den S1-Laboren des Forschungsclusters III in der Klinik für Innere Medizin B, Kardiologie der Universitätsmedizin Greifswald durchgeführt. Die HL-1 Kardiomyozyten wurden in Kulturmedium (vgl. Tabelle 6) bei konstanten 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt kultiviert. Sie wurden bei Überschreiten von 80 % Konfluenz, alle zwei Tage, passagiert. Hierfür wurden die Zellkulturflaschen nach Abnahme des Mediums einmalig mit 6 ml PBS gewaschen und mit 3 ml Trypsin/EDTA versetzt, welches nach 1 Minute Inkubationszeit bei Raumtemperatur abpipettiert und durch frische 3 ml Trypsin/EDTA Lösung ersetzt wurde. Die Zellkulturflasche wurde danach für 5 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt inkubiert. Anschließend wurde zur Inaktivierung 3 ml Trypsin-Inhibitor hinzugefügt und das Gemisch in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellkulturflasche wurde mit 15 ml Wasch-Medium (vgl. Tabelle 6) gewaschen und das Medium ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen überführt. Nach 5-minütiger Zentrifugation der Zellsuspension bei 500 g wurde der Überstand

abgetragen, das verbleibende Zellisolat in Kulturmedium resuspendiert und nach dem gewünschten Verhältnis in eine neue Zellkulturflasche überführt. Die neu verwendeten Zellkulturflaschen wurden mindestens 1 Stunde vor der Subkultivierung mit 1,5 ml einer Gelatine/Fibronektin-Lösung gleichmäßig beschichtet.

3.2.3 Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer

Die Zellzahlbestimmung der HL-1 Kardiomyozyten erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Dafür wurden 10 µl der Zellsuspension in die Zählkammer pipettiert. Die Kapillarkräfte zwischen den Deckplättchen bewirken eine gleichmäßige Verteilung mit definiertem Abstand und ermöglichen ein Auszählen der Zellen. Unter Einsatz eines Lichtmikroskops (Axio Vert. A1 Mikroskop, Carl Zeiss, Jena) wurden die in den peripheren Quadranten befindlichen Zellen ausgezählt. Daraufhin musste das arithmetische Mittel aller Zählerergebnisse gebildet werden, sodass die anschließende Berechnung der Zellzahl nach der folgenden Formel durchgeführt werden konnte.

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Anzahl der gezählten Zellen}}{4 * 10^4}$$

3.2.4 Behandlungsexperimente

Für die durchgeführten Behandlungsexperimente wurden jeweils 500.000 HL-1 Kardiomyozyten pro *Well* einer 6-*Well*-Platte ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Kulturmedium mittels Vakuumpumpe abgesaugt und durch Serum-freies Kulturmedium (SFM) ersetzt. Die Zellen wurden jeweils zwei Stunden in SFM inkubiert und anschließend für die in den jeweiligen im Ergebnisteil angegebenen Zeiträume behandelt.

3.2.5 Transfektion

Hierfür wurden 300.000 HL-1 Zellen pro *Well* einer 6-*Well*-Platte ausgesät (vgl. Kapitel 3.2.2). Nach 24 Stunden wurde das Kulturmedium durch Penicillin- und Streptomycin-freies Medium ersetzt und weitere 24 Stunden inkubiert. Für die Transfektion der HL-1 Zellen mit siRNA, wurden zwei Mastermixe angesetzt.

Tabelle 9: Ansatz des siRNA Mastermix

Reagenzien	Mastermix 1	Mastermix 2
Serum-freies Medium	95 µl	95 µl
siRNA stock (20 µM)	5 µl	0
Dharmafect™ 3	0	5 µl

Die beiden Mastermixe wurden vermischt und für 20 Minuten auf Eis gekühlt. In der Zwischenzeit wurde das Medium abgesaugt und durch 800 µl pro *Well* SFM ersetzt. Jeweils 200 µl des Mastermix wurde tröpfchenweise zu den 800 µl SFM hinzu pipettiert. Die Zellen wurden dann für 24 Stunden im Inkubator (BINDER GmbH, Tuttlingen) bei konstanten 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt gelagert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit IL-6 nach dem zuvor beschriebenen Schema.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 RNA-Isolation aus kultivierten HL-1 Kardiomyozyten und Geweben

Für die Extraktion von RNA aus HL-1 Kardiomyozyten oder aus Gewebe wurde TRIzol® -Reagenz entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Nach Beendigung des Experiments und Absaugen des Mediums wurden die *Wells* einer 6-*Well*-Zellkulturplatte mit je 1 ml kalter Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, mit jeweils 1 ml TRIzol®-Reagenz versetzt und die Zellkulturplatte bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden bis zur Durchführung der RNA-Isolation bei -20 °C gelagert. Das TRIzol®-Gemisch wurde mit 200 µl Chloroform versetzt und durch Schwenken vermischt. Nach zwei- bis drei-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Probe durch 15-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 12.000 rpm in ihre Phasen aufgetrennt. Die obere Phase beinhaltet die RNA, die mittlere Phase die DNA und die untere Phase die Proteine. Die wässrige, obere RNA-Phase wurde in ein RNA-freies Mikroreaktionsgefäß überführt, mit 500 µl Isopropanol versetzt und vermischt. Nach einer 10-minütigen Inkubation der RNA-Probe auf Eis, wurde auch diese Probe 10 Minuten bei 4 °C und 12.000 RPM zentrifugiert. Durch diesen Schritt wurde die RNA gefällt und als Pellet im Mikroreaktionsgefäß sichtbar. Der Überstand wurde abgetragen und das Pellet zweimalig gewaschen. Dafür wurde das Pellet in 80 % Ethanol resuspendiert, auf dem Vortex-Gerät geschüttelt und für 5 Minuten bei 4°C und 7500 RPM zentrifugiert. Nach Abschluss des zweimaligen Waschvorgangs wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und in RNA-freiem Wasser aufgenommen.

Die Resuspension erfolgte dabei, je nach Größe des Zellisolats in 15-20 µl RNAase-freiem Wasser und die anschließende Lagerung bei -80°C.

3.3.2 Messung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentration wurde mit einem NanoDrop™ 2000 Spektrophotometer gemessen. Dafür wurde die zuvor isolierte RNA aufgetaut, abzentrifugiert und 1 µl der Probe auf den Messarm des Spektrophotometers pipettiert. Die Absorptionsmessung der Proben wurde bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge durchgeführt. Die Absorption bei 260 nm Wellenlänge dient der Konzentrationsbestimmung der Nukleotide und die Absorption bei 280 nm Wellenlänge gibt die Konzentration der eventuell vorhandenen Proteine an. Der Quotient aus 260 nm/280 nm ist ein Indikator für die Reinheit der Probe und sollte bei einer RNA-Messung ca. 2,0 betragen. Die Berechnung der Konzentration erfolgt entsprechend dem Lambert-Beer'schens Gesetz:

$$c = \lambda_{260nm} * \epsilon * \text{Verdünnungsfaktor}$$

c = Konzentration in µg/ml

λ = Optische Dicht bei 260 nm

ε = Extinktionskoeffizient - Für RNA beträgt dieser 40 µg/ml

3.3.3 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die Synthese der komplementären DNA erfolgte durch das Enzym reverse Transkriptase und unter Zugabe von Oligonukleotiden. Dafür wurden die RNA-Proben mit DEPC-behandelten Wasser auf eine Konzentration von 100ng/µl verdünnt. Der Angleich der Konzentrationen der Proben ist notwendig, um eine Vergleichbarkeit der Proben gewährleisten zu können. Anschließend wurden die verdünnten Proben mit jeweils 2 µl Random Primer versetzt und für 10 Minuten bei 70 °C im ProFlex PCR System inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde der Mastermix (vgl. Tabelle 10) hergestellt.

Tabelle 10: Ansatz des cDNA-Mastermix

Reagenz	Volumen
5 × First Strand Buffer	4 µl
DTT 0,1M	2 µl
RNase Out Ribonuclease Inhibitor	1 µl
dNTP	1 µl
SuperScript® Reverse Transcriptase	1 µl

Nach der Inkubationszeit wurde jeder Probe 9 µl des Mastermix hinzugefügt. Im Anschluss wurden die Proben gemischt, kurz zentrifugiert und für die cDNA-Synthese in ein ProFlex™ PCR System (vgl. Tabelle 11) gestellt.

Tabelle 11: Programmierung des ProFlex™ PCR System

Zeit	Temperatur
10 Minuten	20 °C
50 Minuten	42 °C
5 Minuten	95 °C
∞	4 °C

Nach Abschluss des Inkubationsprogramms wurde die cDNA bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.3.4 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Bei der *quantitative Real-Time PCR* (qRT-PCR) handelt es sich um eine Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren und zur in Echtzeit detektierbaren Quantifizierung der Genexpression eines zuvor festgelegten Gens. Sie kann entweder mit Hilfe eines spezifischen Fluoreszenzfarbstoffs oder unter Verwendung von fluorophor-markierten Sonden erfolgen. Durch die Amplifikation eines Zielgens und der damit vermehrten Einlagerung von Fluoreszenzfarbstoff an die doppelsträngige vorliegende RNA (Interkalierung), die zu einer vermehrt messbaren Emission von Fluoreszenzfarbstoff führt, können unter Zuhilfenahme einer Standardreihe die Proben quantifiziert werden.

Zur Quantifizierung der zu messenden Proben wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, die als Standardkurve diente. Hierfür wurden 5 µl oder 10 µl der einzelnen Proben gemeinsam in ein Mikroreaktionsgefäß pipettiert und sodann eine Verdünnungsreihe von 50 ng/ml bis 3,25 ng/ml (1:2 Verdünnung) erstellt.

Anschließend wurden die Proben auf eine Konzentration von 5 ng/µl verdünnt. Die Verdünnung der Standardreihe und der Proben wurde hierbei mit Nuklease-freiem Wasser durchgeführt. Für die qRT-PCR wurde der Fast Start Universal SYBR Green Master (ROX) im Ansatz (vgl. Tabelle 12) eingesetzt.

Tabelle 12: Ansatz des qRT-PCR Mastermix pro Probe

Reagenz	Volumen
Nuklease-freies Wasser	6 µl
Forward-Primer (50 pmol/ml)	1 µl
Reverse-Primer (50 pmol/ml)	1 µl
FastStart Universal SYBR Green Master	10 µl

2 µl der Verdünnungsreihe, sowie 2 µl der Proben wurden im Doppelansatz in eine 96-Well-Platte pipettiert, zu der 18 µl des Mastermix hinzugefügt wurden. Als Negativkontrolle wurden 2 µl Nuklease-freies Wasser mit 18 µl Mastermix verwendet. Die PCR Reaktion und die Echtzeitanalyse erfolgte im QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System (vgl. Tabelle 13).

Tabelle 13: Programmierung des QuantStudio™ 3 Real-Time PCR Systems

Programm	Dauer	Temperatur
Denaturierung	2 Minuten	50 °C
	10 Minuten	95 °C
Denaturierung	15 Sekunden	95 °C
Anlagerung/Elongation	1 Minuten	60 °C
Schmelzkurve (40-fache Wiederholung)	15 Sekunden	1,6°C/Sek. auf 95°C
	1 Minuten	60 °C
	15 Sekunden	0,1°C/Sek. auf 95°C
Lagerung	∞	4°C

Die Auswertung der qRT-PCR wurde mit dem Programm QuantStudio™ Design & Analysis Software (Version 1.4.3) vorgenommen. Dabei wurde zunächst die Schmelzkurve der PCR-Produkte beurteilt, um die Spezifität des PCR-Produktes sicherzustellen. Durch die Mitamplifikation der Verdünnungsreihe konnten durch die Software die relative Veränderung der Genmengen der eingesetzten Proben ermittelt werden. Für die Ermittlung der relativen Genexpression wurden die jeweiligen Proben auf das Housekeeping-Gen *Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Gapdh)* normalisiert. In jeden experimentellen Ansatz wurden auch unbehandelte Zellen einbezogen, die bezüglich *Gapdh* und des jeweiligen Zielgens analysiert wurden.

Diese Kontrollproben wurden in der Auswertung gleich 1 gesetzt und die Veränderung der Genexpression der Proben in Hinblick auf die Kontrollproben betrachtet.

3.3.5 Isolation von Proteinen

Für die Proteinisolation wurden die HL-1 Kardiomyozyten nach ihrem Behandlungszeitraum einmalig mit 4°C-kaltem PBS gewaschen und 200 µl UT-Puffer pro *Well* hinzugefügt. Mit Hilfe der stumpfen Seite einer 200 µl Pipettenspitze wurden adhärenente Zellen mechanisch abgelöst und die Lösung in ein Mikroreaktionsgefäß übertragen. Das Gewebe wurde in ein Homogenisationsröhrchen überführt und zweimalig für 1 Minute bei 5 m/s im Bead Blaster™ homogenisiert. Anschließend erfolgte die Überführung der Probe in ein Mikroreaktionsgefäß. Die Mikroreaktionsgefäße wurden 5-fach abwechselnd in Stickstoff eingefroren und in einem Thermomixer für 5 Minuten bei 30 °C und 1200-2000 rpm aufgetaut. Es schloss sich die Zentrifugation der Proben für 30 Minuten bei 20 °C und maximaler Geschwindigkeit an. Hieraufhin wurde der Überstand in ein neues Mikroreaktionsgefäß übertragen, welches anschließend bei -80 °C gelagert wurde.

3.3.6 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Damit in einem Western Blot die gleiche Proteinmenge aufgetragen und damit eine Vergleichbarkeit der Proben sichergestellt werden kann, wurde eine Proteinmengenmessung nach Bradford durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine Proteineichkurve erstellt. Hierfür wurden Milli-Q-Wasser, UT-Puffer, BSA -Lösung und Bradford-Reagenz in einer definierten Menge in eine 96-*Well*-Platte pipettiert (vgl. Tabelle 14). Die Messung der Proteinkonzentration schloss sich nach 5 - 10 Minuten lichtgeschützter Inkubation in einem Tecan Infinite M200 ohne Deckel und bei 595 nm an.

Tabelle 14: Zusammensetzung der Proben für die Eichkurve

Proteinmenge	BSA-Stammlösung (0,2µg/µl)	Mili-Q-Wasser	Puffer	Bradford- Lösung
0	Leerwert	18 µl	2 µl	300 µl
0,4 µg	2 µl	16 µl	2 µl	300 µl
0,8 µg	4 µl	14 µl	2 µl	300 µl
1,2 µg	6 µl	12 µl	2 µl	300 µl
1,6 µg	8 µl	10 µl	2 µl	300 µl
2,0 µg	10 µl	8 µl	2 µl	300 µl
2,4 µg	12 µl	6 µl	2 µl	300 µl
2,8 µg	14 µl	4 µl	2 µl	300 µl

3.3.7 Western Blot

Für die Erstellung der Western Blot Gele wurde das TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamid Kit verwendet und die Gele entsprechend der Herstellerangaben hergestellt. Die Proteinproben (siehe 3.3.6) wurden bei 95 °C für 5 Minuten denaturiert und im Anschluss in die Geltaschen pipettiert. Der Precision Plus Protein™ Dual Color Standard Markers dient als Marker. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 300 Volt für 20-25 Minuten entsprechend ihres Molekulargewichtes. Es schloss sich die Äquilibrierung des Blots, der Nitrocellulose-/PVDF-Membran sowie der Transferpapiere in Transferpuffer an. Die PVDF-Membran wurde vor Verwendung in Methanol aktiviert. In einem Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell wurden luftblasenfrei zuerst eine Lage Transferpapier, die Membran, der Blot und erneute eine Lage Transferpapier geschichtet. In diesem Aufbau wurden die Proteine bei 15 Volt für 15 Minuten auf die Membran übertragen. Nach der Übertragung wurde die Membran in 3 % BSA-Lösung oder Milchpulver-Lösung bei Raumtemperatur auf einem Schüttelinkubator für eine Stunde blockiert. Der erste Antikörper wird im angegebenen Verhältnis (S. 1.1.4 Puffer und Lösungen) in 1 % BSA/TBST angesetzt und mit der Membran über Nacht unter schüttelnder Bewegung im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Vor Inkubation mit dem zweiten Antikörper wurde die Membran dreimal für jeweils 5 Minuten mit TBST gewaschen. Das Ansetzen des zweiten Antikörpers erfolgte im angegebenen Verhältnis in TBST und die Membran wurde mit diesem für eine weitere Stunde inkubiert. Die Membran wurde erneut dreimal für 5 Minuten mit TBST gewaschen und anschließend im ChemiDoc™ MP Imaging System detektiert. Das Enzym GAPDH diente als Ladekontrolle und seine Signalstärke wurde auf derselben Membran gemessen.

3.4 Bestimmung der Kardiomyozytenkontraktion mittels IonOptix®

Der Einfluss von IL-6 auf die Funktion von Kardiomyozyten wurde zusammen mit unseren Kooperationspartnern Brita Püschel und Dr. med. Bishwas Chamling untersucht. Die Zellverkürzung und die Kalziumkinetik in Kardiomyozyten dienten als entsprechende Messparameter. Das Video - Bild Detektionssystem der Firma IonOptix®, bestehend aus einem Mikroskop und einem Photomultiplier, wurde verwendet, um Veränderungen der Myozytenlänge und Veränderungen der zytosolischen Calcium-Konzentration zu messen (vgl. Abbildung 9). Die Detektion der Konzentrationsänderungen des Calciums wurden durch die Verwendung eines Calcium-Fluoreszenz Farbstoffes, Fura 2-AM, ermöglicht. Das intrazelluläre Calciumverhältnis wird dabei über eine Veränderung der Wellenlängenverhältnisse bei 340 nm (gebundener Zustand von Fura 2-AM und Calcium) und 380 nm (ungebundener Zustand von Fura 2-AM und Calcium) bestimmt. Die IonOptix®-Messungen erfolgten an ventrikulären Kardiomyozyten (ARVM, engl. *adult rat ventricular myocytes*), die aus den Herzen von adulten 7 – 10 Wochen alten Wistar Ratten (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) isoliert wurden. Die Isolation der Kardiomyozyten erfolgte dabei über eine retrograde Kollagenase-Perfusion (vgl. Tabelle 5) eines, sich in einer Langendorff Apparatur befindlichen, isolierten Herzens. Die isolierten Ratten-Kardiomyozyten wurden in Versuchspuffer (vgl. Tabelle 15) suspendiert und zu Laminin-beschichtete *Wells* pipettiert und bei Raumtemperatur für 1 Stunde inkubiert.

Tabelle 15: Zusammensetzung des IonOptix® Versuchspuffers

Substanz	Konzentration
NaCl	117 mM
KCl	2,8 mM
MgCl ₂	0,6 mM
KH ₂ PO ₄	1,2 mM
CaCl ₂	1,2 mM
Glucose	20 mM
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure)	10 mM
pH= 7,3	

Für die Detektion der Calcium-Verhältnisse wurden die Zellen mittels Fura 2-AM gefärbt und anschließend per IonOptix® vermessen. Dabei wurden Kardiomyozyten mit einer klar erkennbaren muskulären Streifung und nicht vorhandener spontane Kontraktilität ausgewählt. Nach Selektion der Zellen wurden diese mit 1 Hz und für eine Dauer von 5 ms per Feldstimulator angeregt und als Basiswerte die Zellverkürzung und die Calciumverhältnisse aufgezeichnet. Danach erfolgte die Zugabe von IL-6 und nach fünf Minuten erneut die Messung der Zellverkürzung und der Calciumverhältnisse. Als Kontrolle diente die Messung von Zellen, die für fünf Minuten mit dem IL-6 Lösungsmittel inkubiert wurden.

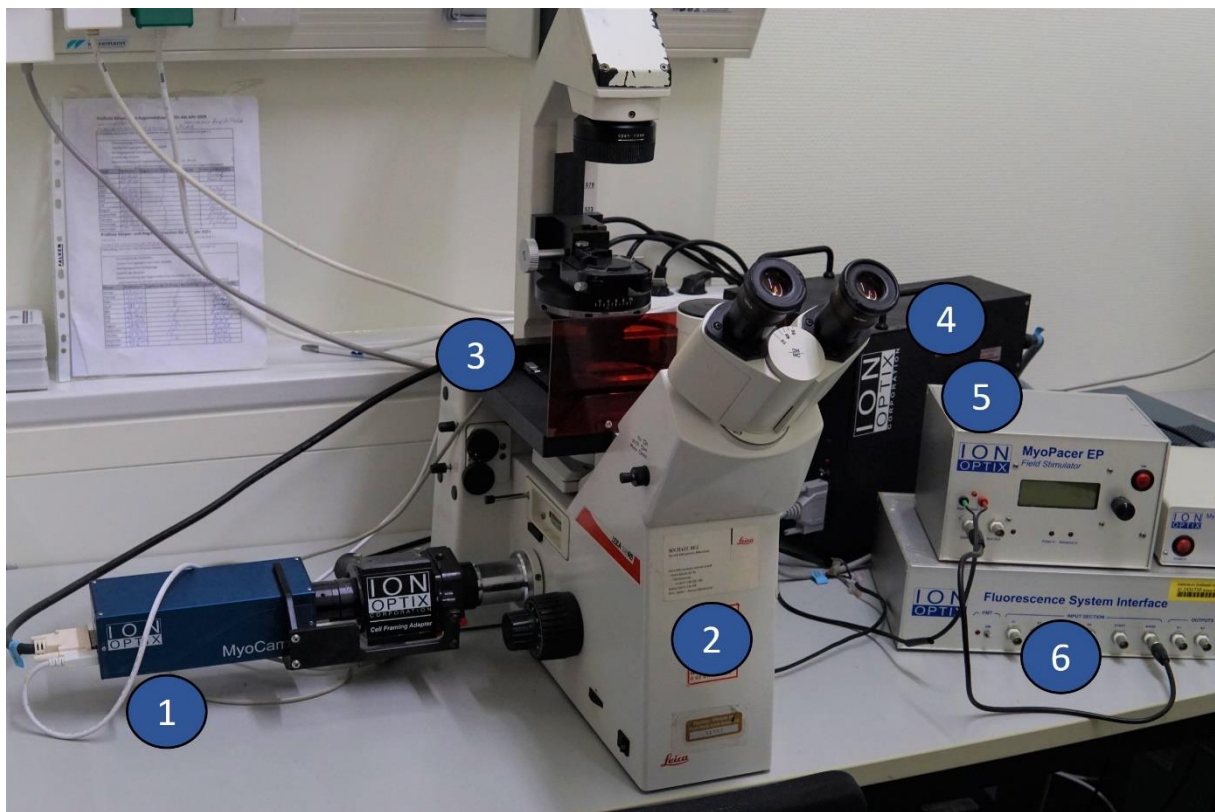


Abbildung 9: Aufbau des Video - Bild Detektionssystem der Firma IonOptix®

(1) IonOptix® Kamera, (2) Inverses Mikroskop, (3) Messplatz, (4) IonOptix® HyperSwitch Excitation Light Source, (5) Feldstimulator, (6) Fluoreszenz System Interface. Eigene Fotografie des IonOptix® Messplatzes im Forschungsclusters III. Eigene Fotografie der Messapparatur des Forschungscluster III, Klinik für Innere Medizin B, Kardiologie der Universitätsmedizin Greifswald.

3.5 Real-time deformability cytometry (RT-DC)

Bei der *Real-time deformability cytometry* (RT-DC) handelt es sich um eine Methode mit der die Mechanik von Zellen ohne Zusetzen von Fluoreszenzmarkern oder Antikörpern untersucht werden kann. Dabei durchströmen 100 Zellen pro Sekunde einen Kanal mit einem Durchmesser von 40 μm im AcCelerator und werden parallel mit einer Hochgeschwindigkeitskamera in Echtzeit fotografiert (vgl. Abbildung 10).

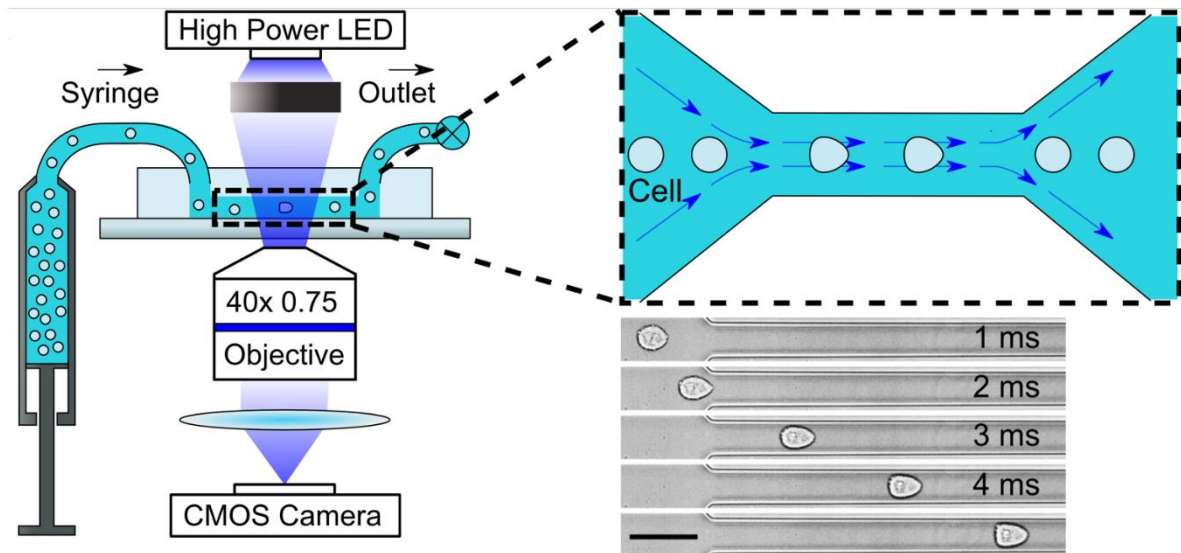


Abbildung 10: Schematische Darstellung der *Real-time deformability cytometry* (RT-DC).

Mittels *Real-time deformability cytometry* (RT-DC) Messungen können tausende Zellen in kürzester Zeit hinsichtlich ihrer Größe und Deformation vermessen werden. Hierfür wird die zu untersuchende Zellsuspension über eine Spritze in einen 40 μm durchmessenden Kanal eingeleitet. Hunderte Zellen durchlaufen den Kanal pro Sekunde und werden dabei von einer Hochgeschwindigkeitskamera fotografiert. Das Foto einer beispielhaften Zelle, die den Kanal durchläuft und dabei ihre Form ändert, ist unter dem Schema des Kanals dargestellt. Die Analyse der zellmechanischen Eigenschaften erfolgt über die Software ShapeOut. Mit freundlicher Genehmigung durch Springer Nature aus Otto et al. 2015.

Durch anschließende Analyse mit Hilfe der Software ShapeOut Version 0.9.1 lassen sich die Zellen hinsichtlich ihrer Größe und Deformation untersuchen und verschiedene Behandlungen miteinander vergleichen.

Die Messungen erfolgten mit Hilfe von Doreen Biedenweg in den Räumlichkeiten des ZIK-HIKE in Greifswald (Biomechanik Greifswald, Prof. Oliver Otto).

Es wurden 300.000 HL-1 Zellen wie beschrieben (S. 3.2.2) im 6-*Well*-Platten ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte die Behandlung der Zellen mit IL-6 für weitere 24 Stunden bei konstanten 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt. Schließlich wurde die Ablösung der Zellen, wie zuvor beschrieben (S. Kapitel 3.2.2) durchgeführt und die Zellen in 80 – 100 µl viskösem Medium (1xPBS Puffer mit < 1% Methylcellulose, CellCarrier, Zellmechanik Dresden GmbH) gelöst. Zur Vorbereitung der Messungen wurde der Flic20 PDMS Mikrofluidik Chip (Zellmechanik Dresden GmbH) mit Zellsuspension gespült und der Zellfluss eine Minute lang stabilisiert. Aus jedem *Well* wurden mindestens 1000 Zellen gemessen und in die Auswertung eingezogen. Die Darstellung und statistische Auswertung erfolgte mit der Software Shape Out V.0.9.1.

3.6 High Resolution Respirometrie, der Oroboros Oxygraph -2K

Der Oroboros Oxygraph -2K ermöglicht die Quantifizierung der Funktion der mitochondrialen Atmungskette unter Verwendung der Software Datlab. Dabei wird die Änderungsrate der Sauerstoffkonzentration in der Messkammer über eine Sauerstoffelektrode quantifiziert (Sauerstoffdurchflussrate). In dem Oroboros Oxygraph können sowohl permeabilisierte Gewebe als auch Zellen gemessen werden. Die Änderungsrate der Sauerstoffkonzentration entspricht der Zellatmung. Eine Aussage über die Funktion der jeweiligen Komplexe der Atmungskette wird unter Verwendung von Substraten und spezifischen Inhibitoren ermöglicht (vgl. Abbildung 11) (Gnaiger 2020).

Die hier verwendete Messung der metabolischen und respiratorischen Kapazität von Herzgewebeproben erfolgte unter Verwendung eines durch die Firma Oroboros etablierten Protokolls, das als „Substrat-Entkoppler-Inhibitor Titrations (*substrate-uncoupler-inhibitor-titration*, *SUIT*) Protokoll 002 O₂ pfi D006“ (vgl. Abbildung 11) (*SUIT-002 O₂ pfi D006* - Bioblast 2021) bezeichnet wird (vgl. Abbildung 12).

Die Aufbereitung, die Messung der Proben und die Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe von Frau Elisa Martin und Herrn Niklas Dörmann der AG Fielitz, Klinik für Innere Medizin B, Universitätsmedizin Greifswald.

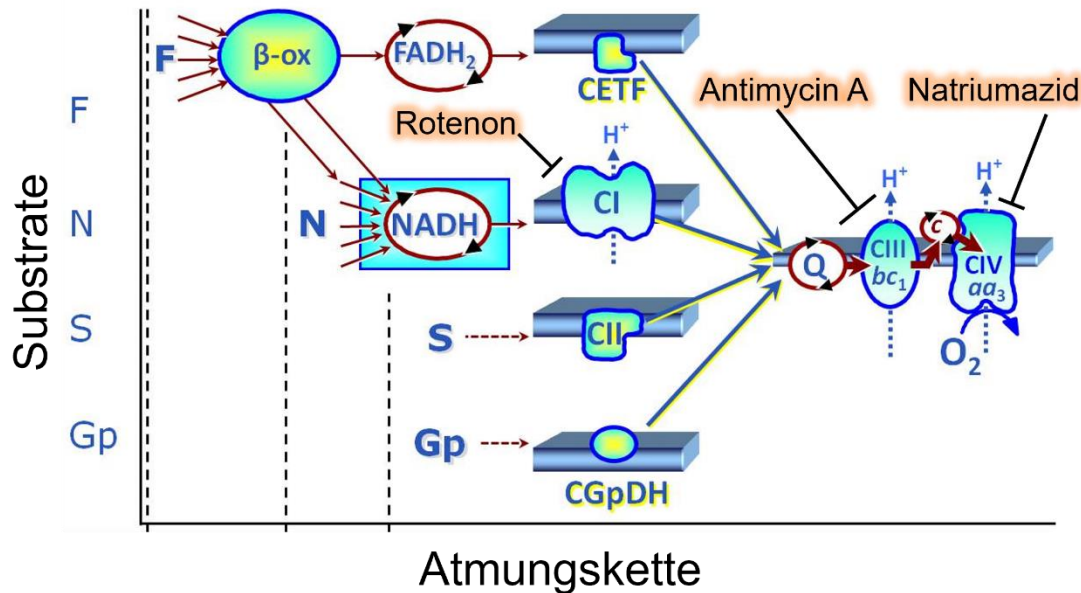


Abbildung 11: Darstellung der mitochondrialen Atmungskette.

Die Fettsäuren (**F**, hier Octanoylcarnitin) werden durch die β -Oxidation (β -Ox) in FADH_2 und NADH umgewandelt, welche über den Komplex I (CI; NADH : Ubichinon–Oxidoreduktase) der Atmungskette oder den elektronentransferierenden Flavoproteinkomplex (CETF) Elektronen an den Elektronenüberträger Ubichinon (Coenzym Q; Q) weitergeleitet werden. Über den Citratzyklus stellen NADH -produzierende Substrate (**N**, hier Malat, Pyruvat, Glutamat) $\text{NADH} + \text{H}^+$ her, die dann dem Komplex I zur Verfügung gestellt werden. Das Ubichinon (Q-Zyklus) erhält zusätzlich Elektronen von Succinat (**S**) über den Komplex II (Succinat: Ubichinon–Oxidoreduktase) und Glycerolphosphat (**Gp**) über die cytosolische Glycerolphosphat-Dehydrogenase (CGpDH). Das Ubichinon gibt die Elektronen an Komplex III (Cytochrom c–Oxidoreduktase) und Komplex IV (Cytochrom-c-Oxidase) weiter. Durch Gabe von Rotenon wird Komplex I, durch Antimycin A Komplex III und durch Azide Komplex IV inhibiert. **F** (Fettsäuren), **N** (NADH -produzierende Substrate), **S** (Succinat), **Gp** (Glycerolphosphat), ROX (Restsauerstoffverbrauch), CIII (Komplex III), CIV (Komplex IV), CETF (Elektronentransferierendes Flavoprotein). Die Abbildung stammt mit freundlichen Genehmigung aus Gnaiger 2020 (CC BY-NC-ND 4.0).

Die Herzen wurden nach der Entnahme mit Hilfe zweier Pinzetten in einer auf Eis gelagerten Petrischale in MIR06 Puffer (vgl. Tabelle 5) mechanisch aufgetrennt. Dabei wurden die Muskelfasern separiert bei erhaltender netzartiger Gerüststruktur. Eine erfolgreiche Muskelfasertrennung wird durch das Erblässen der roten Herzmuskelfasern angezeigt, welches unter dem Mikroskop beobachten wurde und durch den Verlust von Myoglobin und der Entfernung von Gefäßen verursacht wird. Die präparierten und nun permeabilisierten Herzmuskelfasern wurden in ein mit 2 ml

eiskalter BIOPS Lösung gefülltes Well einer 12-Well-Platte gegeben. Zur chemischen Permeabilisierung wurden die Fasern danach in eine 2 ml eiskalte BIOPS Pufferlösung, die 50 µg/ml Saponin enthielt überführt und darin für 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Herzmuskelfasern wiederum in MIR06 Puffer für 10 Minuten bei 4 °C geschwenkt und im Anschluss für 5 Sekunden auf Filterpapier getrocknet. Zur Messung im Oroboros Oxygraph-2K wurden 0,5 – 2 mg Herzmuskelfasern verwendet, die bis zum Transfer in die Messkammer in 2 ml eiskaltem MIR06 Puffer gelagert wurden. Schließlich erfolgte die Messung der Änderungsrate der Sauerstoffkonzentration in den zuvor kalibrierten und jetzt mit Herzmuskelfasern versetzten Messkammern des Oroboros Oxygraph-2K bei 37 °C und unter konstantem Rühren der Proben.

Zu Beginn des *SUIT* Protokolls wurde die Sauerstoffkonzentration in den Messkammern durch Zugabe von H₂O₂ auf 400 µM erhöht. Während der Messungen wurde die Sauerstoffkonzentration in der Messkammer durch wiederholte Zugabe von H₂O₂ auf eine Konzentration von über 250 µM gehalten. Nach Einbringen der Herzmuskelfasern in die Messkammer erfolgte deren Inkubation bis sich ein stabiler Ausgangswert der Sauerstoffkonzentration in der Messkammer eingestellt hatte. Anschließend erfolgte die Applikation von verschiedenen Substraten und Inhibitoren entsprechend des *SUIT* Protokolls (Tabelle 16) wie folgt:

Tabelle 16: Applikationsreihenfolge der Substanzen im Oroboros System

Reihenfolge	Abkürzung	Substanz	Konzentration in der Messkammer
1	D	Adenosindiphosphat	7,5 mM
2	M.1	Malat	0,1 mM
3.1	Oct; c	Octanoylcarnitin	0,5 mM
3.2		Cytochrom C	10 µM
4	M2	Malat	2 mM
5	P	Pyruvat	5 mM
6	G	Glutamat	10 mM
7	S	Succinat	50 mM
8	Gp	Glycerolphosphat	10 mM
9	U	Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon	0,5 µM
10	Rot	Rotenon	0,5 µM
11	Ama	Antimycin A	2,5 µM
12.1	As	Ascorbat	2 mM
12.2	Tm	Tetramethylphenylendiamin	0,5 mM
13	Azd	Azide	200 mM

Im Folgenden werden die in Tabelle 16 aufgeführte Applikationsschritte ausgeführt und die Funktion ihrer Applikation erläutert (vgl. Abbildung 12):

1) ADP

Das *SUIT* Protokoll startet mit der Zugabe von 7.5 mM ADP (Abbildung 12A, 1, D) in die Messkammer. Durch die Bereitstellung von ADP werden die mitochondriale Atmung und die oxidative Phosphorylierung miteinander gekoppelt und die maximale Kapazitätsleistung hergestellt. Vorhandene Substrate der Herzmuskelfasern werden verbraucht und dadurch eine Ausgangssituation geschaffen, die die Vergleichbarkeit von Proben untereinander gewährleistet. Der Verbrauch der vorhandenen Substrate wird durch einen negativere Sauerstoffdurchflussrate im Vergleich zu Start Sauerstoffdurchflussrate angezeigt.

2) Malat

Im Anschluss erfolgt die Zugabe des Metaboliten Malat (Abbildung 12A, 2, M1) in einer verringerten Konzentration verglichen mit einer späteren Malatgabe (Abbildung 12A, 4, M2). Die geringe Malat Konzentration wird als Co-Substrat für das in Schritt 3.1 zugegebene Octanoylcarnitin zur Stimulation des β -Oxidation benötigt.

3.1) Octanoylcarnitin (F_p -Stadium)

Der Beginn der Oroboros Messungen wird durch die Gabe der Fettsäure Octanoylcarnitin (Abbildung 12A, 3.1, Oct) gestartet. Octanoylcarnitin wird durch die β -Oxidation in NADH und $FADH_2$ umgewandelt. Die entstehenden Reduktionsäquivalenten werden vom Flavoproteinkomplex (CETF, $FADH_2$) und dem Komplex I (NADH) verarbeitet und die Elektronen über Ubichinon der Atmungskette zugeführt. Mit diesen Substraten startet die oxidative Phosphorylierung, was an dem tiefgestellten Index p zu erkennen ist. Hierbei ist bei einem intaktem CETF und intaktem Komplex I eine Reduktion der Sauerstoffkonzentration zu erwarten, was sich invers in einem Anstieg der Sauerstoffdurchflussrate darstellt..

3.2) Cytochrom C

Zur Testung der Integrität der äußeren Mitochondrienmembran wird der Messkammer Cytochrom C (Abbildung 12A, 3, C) hinzugefügt. Im physiologischen Zustand befindet sich Cytochrom C in der inneren Membran der Mitochondrien und dient dem

Elektronentransfer zwischen dem Komplex III und Komplex IV (vgl. Abbildung 11). Bei einem Membrandefekt würde Cytochrom C in die mitochondriale Matrix verloren gehen und stände somit nicht zur Übertragung von Elektronen zwischen Komplex III und Komplex IV zur Verfügung. Folglich wäre die Funktion der Atmungskette eingeschränkt und es würde weniger ATP synthetisiert werden.

Die Gabe von Cytochrom C würde bei einem Defekt der mitochondrialen Membran zu einem Anstieg der respiratorischen Funktion führen, da es die Funktion des fehlenden Cytochrom C übernehmen und Elektronen vom Komplex III zu Komplex IV übertragen würde. Dies würde sich in einer erhöhten Sauerstoffdurchflussrate widerspiegeln.

4) Malat ($F(N)_p$ -Stadium)

Nach Durchführung des Cytochrom C Tests und der Sicherstellung der respiratorischen Funktion der Mitochondrien wird der Messkammer das NADH-produzierende Substrat Malat (Abbildung 12A, 4, M2) hinzugefügt. Durch Malat wird $NADH^++H^+$ über dem Komplex I der Atmungskette hinzugefügt. Additiv wird -zur vorherigen Gabe von Octanoylcarnitin (Abbildung 12A, 3.1, Oct)- durch die Gabe des NADH-produzierenden Substrats Malat das $F(N)_p$ -Stadium eingeleitet.

5) Pyruvat (FN_p -Stadium)

Nach Gabe von Malat erfolgt die Gabe des NADH-produzierenden Substrats Pyruvat (Abbildung 12A, 5, P).

6) Glutamat (FN_p -Stadium)

Im Anschluss erfolgt die Gabe des NADH-produzierenden Substrats Glutamat (Abbildung 12A, 6, G). Durch Gabe dieser zuvor aufgeführten Substrate (Malat, Pyruvat und Glutamat) werden mit diesem Schritt dem Komplex I der Atmungskette ausreichend Reduktionsäquivalente, vor allem $NADH^++H^+$, zur Verfügung gestellt. Diese Substrate bewirken eine maximale Oxidationskapazität. Durch Weitergabe von Elektronen über die Atmungskette wird somit unter Sauerstoffverbrauch an Komplex IV und am folgenden Komplex V ATP synthetisiert.

Ein intakter Komplex I führt zu einer Abnahme der Sauerstoffkonzentration in der Messkammer, was für eine Zunahme der Sauerstoffdurchflussrate und indirekt für eine gesteigerte ATP Synthese spricht. Würde der Komplex I eine gestörte Funktion

aufweisen, die eine Übertragung von Reduktionsäquivalent auf Elektronen der Atmungskette verhindern würde, käme es zu keiner Veränderung der Sauerstoffkonzentration in der Messkammer bzw. der Sauerstoffdurchflussrate, was indirekt auf eine reduzierte ATP Synthese schließen ließe.

7) Succinat (*FNS_p-Stadium*)

Anschließend werden der Atmungskette durch Zugabe von Succinat (Abbildung 12A, 7, S) weitere Elektronen der Atmungskette zugeführt. Dabei dient Succinat als Substrat für den Komplex II durch den es, unter Bildung von FADH₂ zu Fumarat, reduziert wird. Durch Gabe von Succinat wird das FNS_p-Stadium erreicht.

8) Glycerolphosphat (*FNSGp_p-Stadium*)

Im Anschluss wird Glycerolphosphat (Abbildung 12A, 8, Gp,) hinzugefügt, welches der Atmungskette Elektronen über den Glycerolphosphat-Dehydrogenase (CGpDH) Komplex hinzufügt.

Ein intakter Komplex II und eine intakter CGpDH Komplex führen zu einer Abnahme der Sauerstoffkonzentration in der Messkammer, was für eine Zunahme der Sauerstoffdurchflussrate spricht. Dies ist die Folge der Synthese von ATP unter Sauerstoffverbrauch.

Ein Defekt von Komplex II oder des CGpDH Komplexes würde keine ATP-Synthese initiieren und somit zu keiner messbaren Abnahme der Sauerstoffkonzentration führen.

9) Carbonylcyanid *m*-chlorphenylhydrazon (*FNSGp_E-Stadium*)

Nachfolgend wird der aufgebaute Protonengradient zwischen dem Innenraum und der mitochondrialen Matrix durch mehrfache vorsichtige Titration des Entkopplers Carbonylcyanid *m*-chlorphenylhydrazon (CCCP) aufgehoben (Abbildung 12A, 9, U*). Dies führt zu einer Aufhebung des elektrochemischen Gradienten und somit zu einer Entkopplung der ATP-Synthase von den Komplexen der Atmungskette. Die oxidative Phosphorylierung ist somit nicht mehr möglich. Zwar ist ein Elektronentransfer zwischen den Komplexen weiterhin möglich, allerdings erfolgt hiernach keine ATP-Synthese mehr. Dieser Zustand wird durch das tiefgestellte Index E (Elektronentransfer) gekennzeichnet. Im zuvor gekoppelten Zustand hemmt die ATP-Synthase den Elektronentransfer, was durch die Entkopplung entfällt und zu einer

maximale gesteigerten Aktivität der Atmungskette führt. Aufgrund dessen führt die Gabe von CCCP zu einer weiteren Abnahme der Sauerstoffkonzentration bzw. Zunahme der Sauerstoffdurchflussrate.

Sollte sich die Sauerstoffdurchflussrate nach Gabe von CCCP unverändert darstellen, ist anzunehmen, dass die Atmungskette durch die Zugabe der Substrate bereits maximal stimuliert wurde und eine Hemmung der Atmungskette durch die ATP-Synthase zuvor nur marginal stattfand.

10) Rotenon (*SGp_E-Stadium*)

Rotenon ist eine natürliche, lipophile Verbindung, die spezifisch den Komplex I der Atmungskette hemmt (Palmer et al. 1968; Heinz et al. 2017). Dadurch werden der Atmungskette keine Elektronen mehr über den Komplex I hinzugeführt, wohingegen Komplex II und CGpDH nicht in ihrer Funktion beeinträchtigt sind. Die Messung der Respiration in Anwesenheit von Rotenon lässt somit Rückschlüsse auf die Aktivität von Komplex II und CGpDH zu (vgl. Abbildung 11). Somit ist nur noch der Einfluss von Succinat und Glycerolphosphat auf die Funktionsweise der Atmungskette quantifizierbar, daher *SGp_E-Stadium*. Nach Zugabe von Rotenon wird eine Abnahme der Sauerstoffdurchflussrate erwartet (Abbildung 12A, 10, Rot), da ein Großteil der an der Atmungskette beteiligten Elektronen über Komplex I bereitgestellt wird. Wäre die Sauerstoffdurchflussrate unverändert, würde dies auf einen Defekt von Komplex I hinweisen.

11) Antimycin A (Restsauerstoffverbrauch (*Residual Oxygen Consumption (ROX)*))

Im Anschluss an die Inhibition des Komplexes I wird der Komplex III durch Gabe von Antimycin A (Abb.12A, 11, Ama) gehemmt. Somit sind Komplex I (Rotenon) und Komplex III (Antimycin A) gemeinschaftlich inhibiert, so dass der Atmungskette keine Substrate mehr zugeführt werden können. Der zu diesem Zeitpunkt ermittelte Sauerstoffverbrauch wird als *Residual Oxygen Consumption (ROX)* bezeichnet. Die ROX ist Ausdruck der nicht-mitochondrialen zellulären Atmung und wird als Nebenreaktion von den zuvor ermittelten mitochondrienspezifischen Werten abgezogen (Gnaiger 2020).

12-13) Ascorbat und Tetramethylphenylendiamin (CIV) und Natriumazid (Chem ROX)

Die Quantifizierung des Komplex IV der Atmungskette, der Cytochrom C Oxidase, erfolgt durch Verwendung von Ascorbat und Tetramethylphenylendiamin (TMPD) (Abbildung 12A, 12, AsTm) sowie Natriumazid (Abbildung 12A, 13, Azd). Im vorherigen Applikationsschritt 11 wurde mittels Antimycin A der Komplex III inhibiert, wodurch das Cytochrom C nicht mehr reduziert werden kann und als Substrat des Komplex IV fehlt. Um dennoch die Aktivität des Komplexes IV messen zu können wird TMPD als künstlicher Elektronendonator hinzugesetzt. Als Elektronendonator imitiert TMPD die Funktion des Cytochrom C. Da TMPD autooxidiert wird, was zu dessen Funktionsverlust führt, wird es zusammen mit Ascorbat, das diesen Prozess verhindert, eingesetzt (Andrey V Kuznetsov, Erich Gnaiger 2010). Neben der Quantifizierung des Komplexes IV erfolgte zusätzlich die Quantifizierung der Autooxidation.

Um die Funktion des Komplexes IV isoliert zu quantifizieren, wird der Komplex IV durch die Gabe von Natriumazid inhibiert und damit die Aktivität der Atmungskette aufgehoben. Die zu diesem Zeitpunkt ermittelte Sauerstoffkonzentration ist auf die Autooxidation des TMPD zurückzuführen (die sogenannte *Chemical Residual Oxygen Consumption* (Chem ROX) und wird von den in Schritt 12-13 ermittelten Sauerstoffkonzentrationen subtrahiert. Damit kann eine Aussage über die isolierte Funktion des Komplex IV getroffen werden.

Nach Abschluss der Versuche wurden die Messungen mithilfe der Software DatLab V.7.4 und Excel ausgewertet.

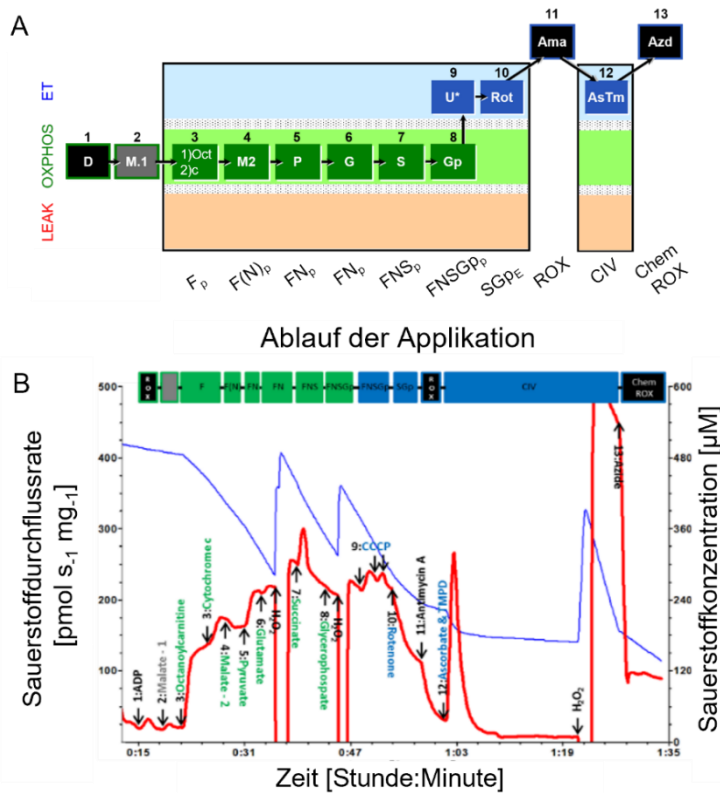


Abbildung 12: Darstellung des Ablaufs der Oroboros Messungen.

(A) Überblick des verwendeten Substrat-Entkoppler-Inhibitor Titrations (*substrate-uncoupler-inhibitor titration, SUIT*) Protokolls 002 O2 pfi D006 und Elektronentransfer-Stadien. Details zur Applikation der zugehörigen Substrate sind in Tabelle 16 aufgeführt und im dort nachfolgenden Text erläutert. 1) D = ADP; 2) M.1 = Malat 1. Gabe; 3.1) Oct = Octanoylcarnitin; 3.2) C = Cytochrom C; 4) M2 = Malat 2.Gabe; 5) P = Pyruvat; 6) G = Glutamat; 7) S = Succinat 8) Gp = Glycerolphosphat; 9) U = *Uncoupler*. Carbonylcyanid m chlorphenylhydrazon; 10) Rot = Rotenon, 11) Ama = Antimycin A; 12) AsTm = Ascorbat (As), Tetramethylphenylendiamin (Tm); 13) Azd = Natriumazid; Angepasste Grafik mit freundlichen Genehmigung von Oroboros, Österreich (Oroboros 2021). **(B)** Darstellung einer durch die DatLab Software Version 7.4 erstellten repräsentativen respiratorischen Messung der permeabilisierten Herzfasern. Die rote Linie gibt die berechnete Sauerstoffdurchflussrate der Fasern innerhalb der Kammer an. Die blaue Linie stellt die gemessene Sauerstoffkonzentration in der Kammer dar. Die erfolgten Zugaben von Substrat, Entkoppler und Inhibitor sind mittels Pfeil entsprechend dem Zeitpunkt ihrer Applikation angeführt. Die jeweiligen OXPHOS und Elektronentransfer Stadien sind oberhalb der Grafik in Boxen beigefügt. OXPHOS grün; Elektronentransfer blau; ROX schwarz. OXPHOS (oxidative Phosphorylierung), F (Fettsäure), N (NADH-produzierende Substrate), S (Succinat), Gp (Glycerolphosphat), ROX (Restsauerstoffverbrauch), Chem ROX (chemischer Restsauerstoffverbrauch), CIV (Komplex IV). Mit freundlicher Genehmigung von Niklas Dörmann.

3.7 Tierexperimentelle Methoden

3.7.1 Versuchstiere

Die verwendeten geflochtenen *gp130*-Mäuse wurden freundlicherweise von Prof. Klaus Rajewsky (Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC) in der Helmholtz Gemeinschaft) bereitgestellt (Zanders et al. 2021). Zucht und Haltung fanden in der Zentrale Service - und Forschungseinrichtung für Versuchstiere an der Universitätsmedizin Greifswald statt. Die Generierung Herzmuskelzellspezifischer Knockout Tiere erfolgte durch Kreuzung der *gp130^{loxP/loxP}* Mäuse mit transgenen Tieren, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines Kardiomyozyten-spezifischen Promoters (α MHC-CRE) ausschließlich in Herzmuskelzellen exprimieren. Aus diesen Verpaarungen resultierten *gp130^{loxP/loxP}* Mäuse, die als Wildtypiere verwendet wurden und im Weiteren als Wildtyp (WT) bezeichnet werden, und Herzmuskelzell-spezifische *gp130^{loxP/loxP}; α MHC-CRE* Knockout Mäuse, die im Weiteren als cKO bezeichnet werden. Zur Durchführung der Versuche wurden ausschließlich männliche Tiere im Alter von 15 – 24 Wochen verwendet. Sie wurden unter standardisierten Bedingungen, konstanter Raumtemperatur (24°C - 26°C), Luftfeuchtigkeit (45 % - 65 %), sowie konstantem 12h Tag/12h Nacht-Zyklus gehalten. Alle Versuchstiere hatten zu jedem Zeitpunkt freien Zugang zu Nahrung und Wasser. Alle beschriebenen Experimente wurden vom Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (LALLF) unter dem Aktenzeichen 7221.3-1-071/18 genehmigt.

3.7.2 Induktion einer polymikrobiellen Sepsis mittels Durchführung einer zökalen Ligatur und Punktion (*Cecal and ligature puncture, CLP*)

Bei der zökalen Ligatur und Punktion (engl. *cecal and ligature puncture, CLP*) handelt es sich um eine etablierte experimentelle Methode zur Induktion einer Peritonitis und einer polymikrobiellen Sepsis im Mausmodell (Rittirsch et al. 2009b) (vgl. Abbildung 13).

Caecal ligation and puncture (CLP)

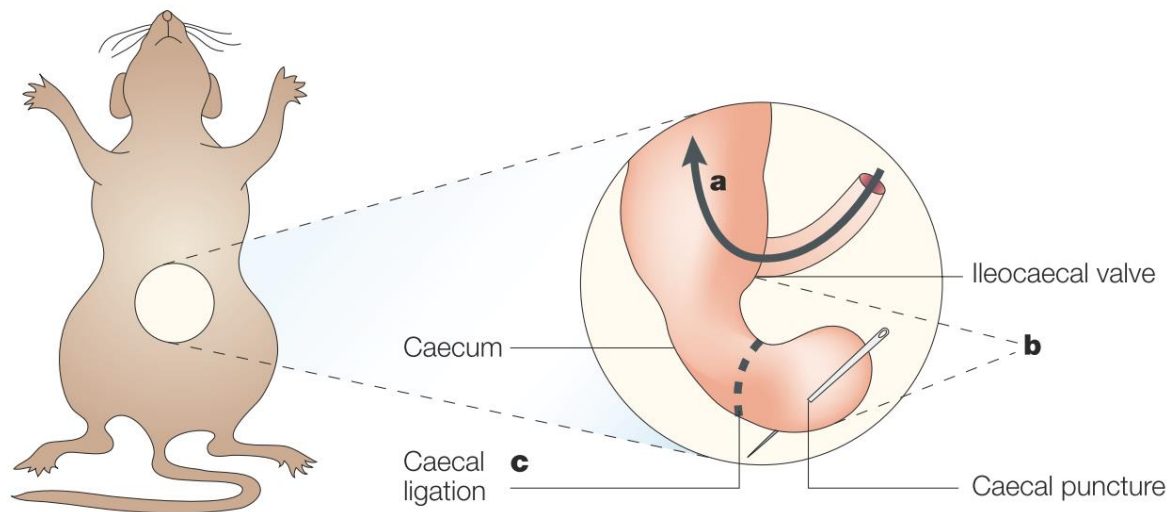


Abbildung 13: Zökale Ligatur und Punktion (*cecal and ligature puncture*, CLP).

Die Durchführung einer zökalen Ligatur und Punktion (engl. *cecal and ligature puncture*, CLP) erfolgte zur Induktion einer polymikrobiellen Sepsis im Versuchstier, hier der Maus. Nach laparotomischer Eröffnung der Bauchhöhle wird der Übergang zwischen Dünn – und Dickdarm lokalisiert (a). In anatomischer Nähe des Überganges wird das Zökum dargestellt (b) und in einem Abstand von 1cm distal des Zökalspols ligiert (c). Anschließend erfolgt die Punktion mittels Nadel, die Rückverlagerung des Zökums in die Bauchhöhle und die schichtweise Naht des Peritoneums und der Haut. Mit freundlicher Genehmigung durch Springer Nature aus Buras et al. 2005.

Die Operation erfolgte in Isoflurannarkose. Hierbei wurde die Narkose mit 3,5 % Isofluran eingeleitet und mit 2 % Isofluran aufrechterhalten. Die Applikation erfolgte über ein Inhalationsgerät. Analgetisch wurde den Versuchstieren ab 4 Stunden vor der Sham- bzw. CLP-Operation und für die gesamte Dauer des Versuchs Tramadol (2,5 mg/100 ml Tränkwasser) verabreicht. Nach Sicherstellung der vollständigen Sedierung durch Überprüfen des Zwischenzehenreflexes wurde das jeweilige Tier in Rückenlage auf einer zuvor auf 37 °C erwärmten Wärmeplatte fixiert. Die Aufrechterhaltung der Narkose wurde während der Operation durch eine Maske sichergestellt. Vor Schnittsetzung wurde das Abdomen mit 70 % Ethanol desinfiziert. Daraufhin wurde das Abdomen mit einem sterilen Präparierbesteck an der Medianlinie circa 1 cm weit eröffnet und Haut sowie Peritoneum mit Hilfe einer anatomischen Pinzette mobilisiert. Nach der Lokalisation des Zökums wurde dieses freigelegt, circa 1 cm vom Zökumpol entfernt mit Ethicon-6-0 Faden ligiert und distal der Ligatur eine

einmalige Punktion mittels einer 22G Nadel durchgeführt (Abbildung 13). Anschließend wurde stecknadelgroßer Faeces durch die Punktionsöffnung ausgestrichen und zusammen mit dem Zökum in die Bauchhöhle zurückverlagert. Das Peritoneum und die Haut wurden jeweils mit Einzelknopfnähten verschlossen und es erfolgte die subkutane Applikation von 500 µl einer sterilen physiologischen Kochsalzlösung. Nach der Operation erfolgte die Desinfektion des Operationsfeldes. Währenddessen wurde das operierte Versuchstier bis zu seinem Erwachen in einem durch Rotlicht erwärmten Käfig gelegt. Die Operation der Vergleichsgruppe, der Sham-Tiere, erfolgt durch Laparotomie, aber ohne Durchführung einer Ligatur und Punktion des Zökums. Alle Tiere wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden nach der Operation durchgängig beobachtet. Zur weiteren Feststellung der Belastung des operativen Eingriffs wurde der Gesundheitszustand der Versuchstiere mittels *Score-Sheet* dreimalig pro Tag bestimmt. Hierbei wurde auf den Ernährungszustand, dem Pflegezustand, der Atmung und dem Verhalten in der Gruppe geachtet. Bei Auftreten von gravierenden Veränderungen, wie der Einstellung der Nahrungsaufnahme, dem Einstellen der Haarkleidpflege, der Isolation der Tiere oder klinischen Symptome (Tachypnoe) wurden die Tiere frühzeitig mittels zervikaler Dislokation sakrifiziert. Am Ende des Beobachtungszeitraumes erfolgte die Tötung der Versuchstiere durch Thiopentalnarkose (200 mg/kg Körpergewicht) und zervikaler Dislokation.

3.7.3 Transthorakale Echokardiographie

Die kardiale Struktur und Funktion wurde mittels transthorakaler Echokardiographie in allen experimentellen Gruppen 24 Stunden postoperativ untersucht. Die Durchführung erfolgte durch Dr. rer. nat Julia Rüdebusch. Dafür wurden die Tiere initial mit 3 % Isofluran (Aufrechterhaltung mit 1,5 % Isofluran) anästhesiert und auf eine beheizte Wärmeplatte bei 37 °C gelagert. Die Messung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (EF), der linksventrikulären Verkürzungsfraktion (FS), des linksventrikulären enddiastolischen und -systolischen Volumens (LVEDV/LVESV), des systolischen und diastolischen Kammerdurchmessers (LVIDs/d) und der linksventrikulären Masse (LVM) erfolgten mittels M-Mode tracing (Vevo[®] LAB 3.2.6 Software, Visual Sonics[®]).

Es wurden folgenden Parameter ermittelt:

- 1) Durchmesser des linken Ventrikels am Ende der Systole (LVESD) [mm]
- 2) Durchmesser des linken Ventrikels am Ende der Diastole (LVEDD) [mm]
- 3) Volumen des linken Ventrikels in der Systole und der Diastole (LVESV, LVEDV) [μ l]
- 4) Herzfrequenz (HF) [/min]

Errechnung der folgenden Parameter aus den ermittelten Daten:

- 1) Linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) [%]
- 2) Schlagvolumen (SV) [μ l]
- 3) Herzminutenvolumen (HMV = HF*SV) [ml/min]
- 4) Verkürzungsfraktion ($FS = \left(\frac{LVEDD - LVESD}{LVEDD} \right) * 100$) [%]

3.8 Graphische Darstellung

Die graphische Darstellung der hier gezeigten Abbildungen erfolgte mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism 8 (Version 8.3.0).

3.9 Statistische Auswertung

Mit Hilfe des Softwareprogramms Excel wurden die Rohdaten aufbereitet, organisiert und berechnet. Die Software GraphPad Prism 8 wurde sowohl für die graphische Darstellung als auch für die statistische Auswertung verwendet. Die statistische Auswertung der *in vitro* Daten erfolgte mittels zweiseitigem T-Test. Bei den *in vivo* Daten wurde zunächst ein One-way ANOVA Test zwischen den Gruppen durchgeführt. Konnte eine Signifikanz ($p \leq 0.05$) ermittelt werden, wurde zur post-hoc Analyse ein zweiseitiger T-Test verwendet. Die statistische Auswertung der RT-DC Daten wurden mittels (linear) Mixed Model kalkuliert und die statistische Signifikanz hierfür mittels Wilks Theorem berechnet.

Alle p -Werte unter 0.05 wurden als signifikant bewertet. Eine genauere Eingrenzung nach * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ wurde abhängig von den Daten erhoben und ist der Beschriftung der Graphen zu entnehmen.

4. Ergebnisse

4.1 Zellbiologische Ergebnisse

4.1.1 Interleukin-6 aktiviert den Trans-Signalweg in HL-1 Kardiomyozyten

Der Effekt von IL-6 auf Kardiomyozyten wurde an HL-1 Zellen *in vitro* untersucht. Dafür wurde zunächst der optimale Zeitpunkt einer Behandlung mittels Zeitverlauf bestimmt. Zudem untersuchten wir, welcher der beiden IL-6 Signalwege in Kardiomyozyten effektiver vermittelt wird. Dafür wurde der *klassische* Signalweg durch Verwendung von IL-6 bzw. der *Trans*-Signalweg durch Verwendung eines rekombinanten IL-6 / IL-6 Rezeptor Komplexes (rmIL-6/IL-6R α) aktiviert. HL-1 Kardiomyozyten wurden mit 20 ng/ml IL-6 für 1, 2, 4, 6, 12 und 24 Stunden behandelt. Mittels qRT-PCR wurde die Socs3 Genexpression quantifiziert (vgl. Abbildung 14A). Nach einer ein- und vierstündigen Behandlung konnte kein Unterschied zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe festgestellt werden. Nach zwei-stündiger Behandlung konnte ein 1,3-facher Anstieg ($p \leq 0,01$), nach 6 Stunden ein 1,2-facher Anstieg ($p \leq 0,01$) und nach 12 Stunden ein 1,6-fachen Anstieg der Socs3 Expression ($p \leq 0,001$) nachgewiesen werden. Am Ende des Versuchs nach 24 Stunden zeigte sich eine 2,2-fache Steigerung ($p \leq 0,001$) der Socs3 Expression. Diese Daten zeigen, dass eine 24-stündige IL-6-Behandlung die Socs3 Expression am stärksten steigert, weshalb dieser Zeitpunkt in den folgenden Experimenten verwendet wurde.

Der Vergleich zwischen dem klassischen und dem Trans-Signalweg erfolgte durch den direkten Vergleich der Effekte einer 24 Stunden dauernden Behandlung von HL-1 Zellen mit 20 ng/ml IL-6 oder mit 20 ng/ml rmIL-6/IL-6R α und der anschließenden Quantifizierung der Socs3 Genexpression (vgl. Abbildung 14B). Die Socs3 Expression war durch IL-6 Behandlung um das 1,3-fache ($p \leq 0,001$) und durch rmIL-6/IL-6R α Behandlung um das 8,73-fache ($p \leq 0,001$) gesteigert, wobei die Socs3 Expression nach rmIL-6/IL-6R α signifikant höher als nach IL-6 Behandlung ($p \leq 0,001$) war. Um den größtmöglichen Effekt von IL-6 auf Kardiomyozyten untersuchen zu können wurde daher für die weiteren Experimenten rmIL-6/IL-6R α verwendet.

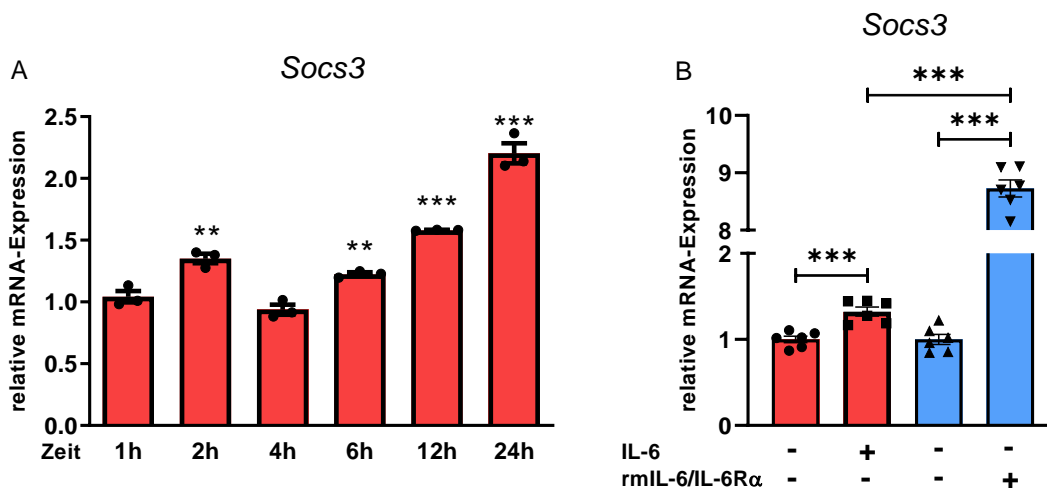


Abbildung 14: IL-6 induziert über den Trans-Signalweg die Socs3 Genexpression in HL-1 Kardiomyozyten.

(A) HL-1 Kardiomyozyten wurden mit Interleukin-6 (IL-6; 20ng/ml) für 1, 2, 4, 6, 12 und 24 Stunden behandelt. Die abgebildete Socs3 mRNA wurde mittels qRT-PCR quantifiziert und anhand von *Gapdh* mRNA Werten normalisiert. Zu jedem der gezeigten Zeitpunkte wurde eine Vehikel Probe als Kontrolle mitgeführt. Diese wurde zur statistischen Auswertung auf 1 gesetzt und die Socs3 Expression in Relation dargestellt. Die statistische Auswertung jedes Zeitpunktes bezieht sich auf die jeweilige Vehikel Kontrolle. **(B)** HL-1 Kardiomyozyten wurden für 24 Stunden mit IL-6 (20 ng/ml, n = 6) oder rekombinatem IL-6 (rmIL-6/IL-6Rα; 20 ng/ml, n = 6) inkubiert. Die abgebildete Socs3 mRNA wurde mittels qRT-PCR quantifiziert und anhand von *Gapdh* mRNA Werten normalisiert. Die Werte jedes Wells sind als einzelne Messpunkte dargestellt und der Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels eines zweiseitigen T-Tests: ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

4.2 Interleukin-6 induziert die Expression von Stressmarkern in Kardiomyozyten

Nach der Festlegung eines optimalen Behandlungszeitraums wurde untersucht, welchen Einfluss die Inkubation mit IL-6 auf die Stressantwort von Kardiomyozyten zeigt. HL-1 Kardiomyozyten wurden für 24 Stunden mit 20 ng/ml rmIL 6/IL 6Rα behandelt. Anschließend wurde die RNA isoliert und qRT-PCRs durchgeführt (vgl. Abbildung 15). rmIL-6/IL-6Rα führte zu einem 1,88-fachen signifikanten Anstieg der

Nppb Expression ($p \leq 0.001$) und einer signifikanten Reduktion der Myosinisoformen *Myh6* (0,65-faches, $p \leq 0.001$) und *Myh7* (0,72-faches, $p \leq 0.01$). Die Genexpression von *Ppargc1a* war auf das 0,43-fache ($p \leq 0.001$) reduziert.

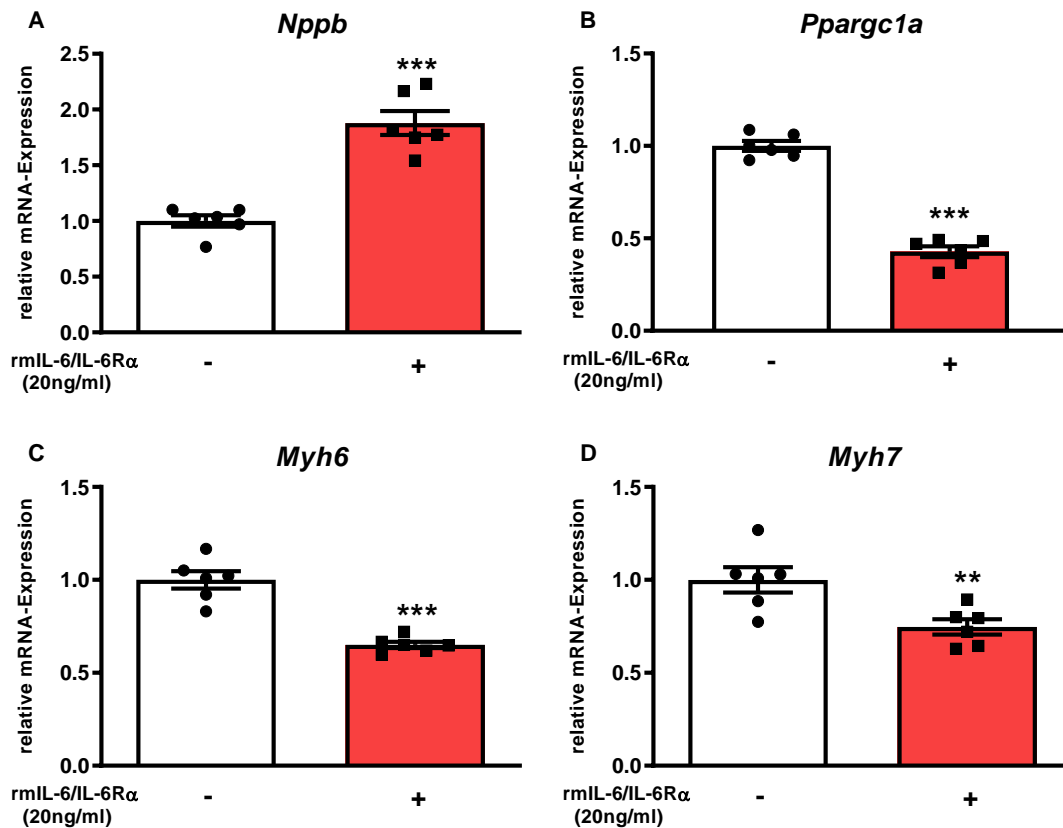


Abbildung 15: IL-6 induziert Stress-induzierte Gene nach 24-stündiger Inkubation.

HL-1 Kardiomyozyten Zellen wurden im 6-Well mit 500.00 Zellen/Well ausgesät, kultiviert und mit 20 ng/ml rekombinantem Interleukin-6 für 24 Stunden behandelt und daraufhin die Genexpression von *Nppb* (A), *Ppargc1a* (B), *Myh6* (C), *Myh7* (D) quantifiziert. Die hier abgebildete mRNA wurde mittels qRT-PCR bestimmt und anhand von *Gapdh* mRNA Werten normalisiert. Die Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels eines zweiseitigen T-Tests: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, $n = 6$.

4.3 Die zellulären Effekte von IL-6 werden durch den Knockdown von *Gp130* reduziert

Die IL-6 Signalkaskade wird durch den gp130 Rezeptor vermittelt. Wir prüften die Hypothese, dass die zuvor beschriebenen Veränderungen der Genexpression vom gp130 Rezeptor abhängig sind. Dafür wurde die Expression von *gp130* mittels siRNA in Kardiomyozyten reduziert. Hierbei konnte eine signifikante Reduktion der *gp130* Genexpression um 68 % ($p \leq 0.001$, vgl. Abbildung 16C) und eine Reduktion des GP130 Proteingehalts um 82 % ($p \leq 0.001$, vgl. Abbildung 16A) durch eine qRT-PCR und Western Blot Analyse, respektive (vgl. Abbildung 16B) gemessen werden.

Die Behandlung mit rIL-6/IL-6R α führte in den Kontroll-siRNA behandelten Kardiomyozyten zu einem 5-fachen Anstieg der *Socs3* Expression. Der Anstieg der *Socs3* Expression war in den *gp130* siRNA behandelten Kardiomyozyten signifikant geringer (3,4-fach, $p \leq 0.001$). Im Folgenden wurde die Genexpression von in Kapitel 4.2 verwendeten Genen nach Behandlung mit rIL-6/IL-6R α in Kontroll- und *gp130* siRNA transfizierten Kardiomyozyten quantifiziert. In Kontroll-siRNA behandelten Kardiomyozyten führte die Behandlung mit rIL-6/IL-6R α zu einer Reduktion von *Myh6* ($p \leq 0.001$), *Myh7* ($p \leq 0.001$), *Ppargc1a* ($p \leq 0.001$) und tendenziell zu einer Induktion von *Nppb* ($p = 0,17$). Die rIL-6/IL-6R α induzierten Genexpressionsveränderungen wurden durch die Verwendung von *gp130* siRNA in Kardiomyozyten aufgehoben. Hierbei konnte ein signifikanter Unterschied zwischen rIL-6/IL-6R α -behandelten Kontroll-siRNA und *gp130* siRNA bei der *Myh6*- ($p \leq 0.001$), *Myh7*- ($p \leq 0.01$), und *Ppargc1a*- ($p \leq 0.001$) mRNA Expression gezeigt werden. Die *Nppb* Genexpression war unverändert (vgl. Abbildung 17).

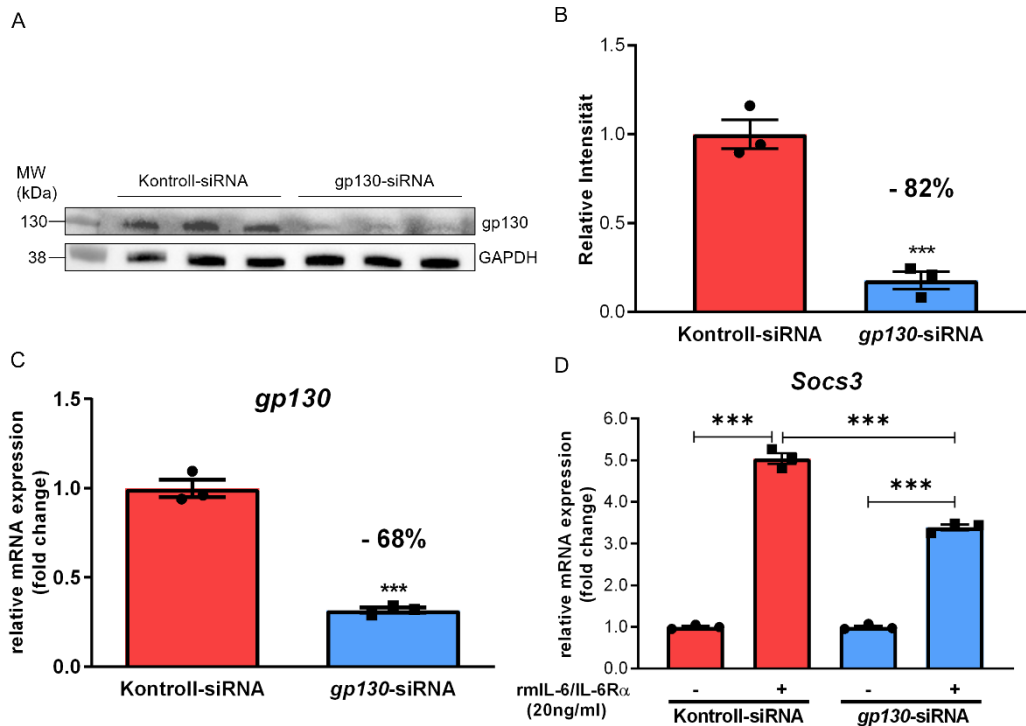


Abbildung 16: Genexpression und Proteingehalts in mit *gp130* siRNA behandelten HL-1 Kardiomyozyten.

HL-1 Kardiomyozyten wurden im 6-Well mit 300.000 Zellen/Well ausgesät, kultiviert und mit 20 μ M Kontroll-siRNA oder *gp130*-siRNA transfiziert. Zur Sicherstellung der Transfektion des *gp130* Rezeptors auf Proteinebene wurden ein Western Blot **(A)** und die relative Intensität der Signalstärke dargestellt **(B)**. Gezeigt sind die Proteinmengen von GP130 und GAPDH, welches als Ladekontrolle diente. **(C)** Zur Sicherstellung der Transfektion auf Genexpressionsebene wurde die Genexpression von *gp130* quantifiziert. **(D)** Nach erfolgreicher Etablierung wurden transfizierte Zellen für 24 Stunden mit 20 ng/ml rekombinatem IL-6 behandelt und die *Socs3* Genexpression in Kontroll-siRNA und *gp130* siRNA behandelten Zellen quantifiziert. Die hier abgebildete mRNA wurde mittels qRT-PCR bestimmt und anhand von *Gapdh* mRNA Werten normalisiert. Die Kontrollen beider Gruppen wurden auf 1 gesetzt. Die Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels eines zweiseitigen T-Tests: *** $p \leq 0.001$, $n = 3$.

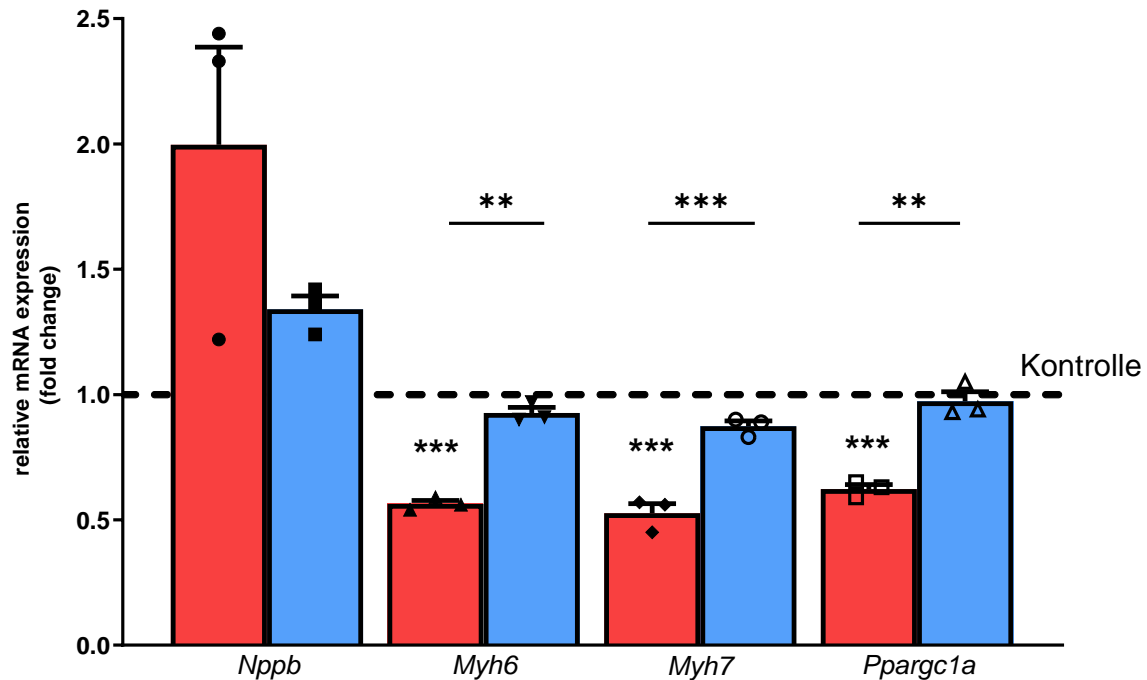


Abbildung 17: Die IL-6 induzierte Genexpression wird durch Reduktion von gp130 mittels siRNA abgeschwächt.

HL-1 Kardiomyozyten wurden im 6-Well mit 300.000 Zellen/Well ausgesät, kultiviert und mit 20 μ M Kontroll-siRNA (rot) oder *gp130*-siRNA (blau) transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die transfizierten HL-1 Kardiomyozyten mit 20 ng/ml rIL-6/IL-6R α oder Serum-freiem Medium behandelt. Nach Aufbereitung der RNA wurde die Genexpression von *Nppb*, *Myh6*, *Myh7*, und *Ppargc1a* quantifiziert. Die Genexpression wurde mittels qRT-PCR bestimmt und auf die stabil exprimierte *Gapdh* normalisiert. Die Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels eines zweiseitigen T-Tests: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, n=3.

4.4 IL-6 führt zu einer Reduktion der Kontraktilität von primären Herzmuskelzellen *in vitro*

Nachdem ein Effekt von rmlL-6/IL-6R α auf die zelluläre Stressantwort von Kardiomyozyten beobachtet werden konnte, wurde untersucht, ob rmlL-6/IL-6R α auch die Kontraktilität von Kardiomyozyten beeinflusst. Die Inkubation mit rmlL-6/IL-6R α führte zu einer signifikanten Abnahme der Zellverkürzung von adulten ventrikulären Rattenkardiomyozyten (ARVM) (rmlL-6/IL-6R α : -13,91 % \pm 2,81 %; Kontrolle: -4,29 % \pm 2,31 %, $p \leq 0.05$) (vgl. Abbildung 18A). Zugleich konnte ein reduzierter Kalzium-Transient (rmlL-6/IL-6R α : -11,68 % \pm 7,41 %; Kontrolle: 18,07 % \pm 13,29 %, nicht signifikant $p = 0,07$) nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 18B). Weiterhin wurden auch prozentuale Zwischenschritte bis zum Erreichen der maximalen Zellverkürzung gemessen, die einen Rückschluss auf die Geschwindigkeit der Kontraktion, bzw. die Kontraktilität zulassen. rmlL-6/IL-6R α -inkubierte ARVM zeigten eine signifikante Reduktion der dynamischen Zellverkürzung nach 10 % (rmlL-6/IL-6R α : -14,29 % \pm 8,34 % Kontrolle: 40,48 % \pm 19,43 %, $p \leq 0.05$), 50 % (rmlL-6/IL-6R α : -8,60 % \pm 5,25 %; Kontrolle: 21,89 % \pm 10,04 %, $p \leq 0.05$) und 90 % (rmlL-6/IL-6R α : -5,38 % \pm 4,34 % Kontrolle: 13,75 % \pm 6,51 %, $p \leq 0.05$) des Kontraktionsvorganges im Vergleich zu Vehikel-behandelten Zellen, was auf eine verringerte Kontraktionsgeschwindigkeit schließen lässt (vgl. Abbildung 18C/D/E). Zusammenfassend kontrahieren ARVM, die mit rmlL-6/IL-6R α behandelt wurden somit langsamer und weniger effektiv.

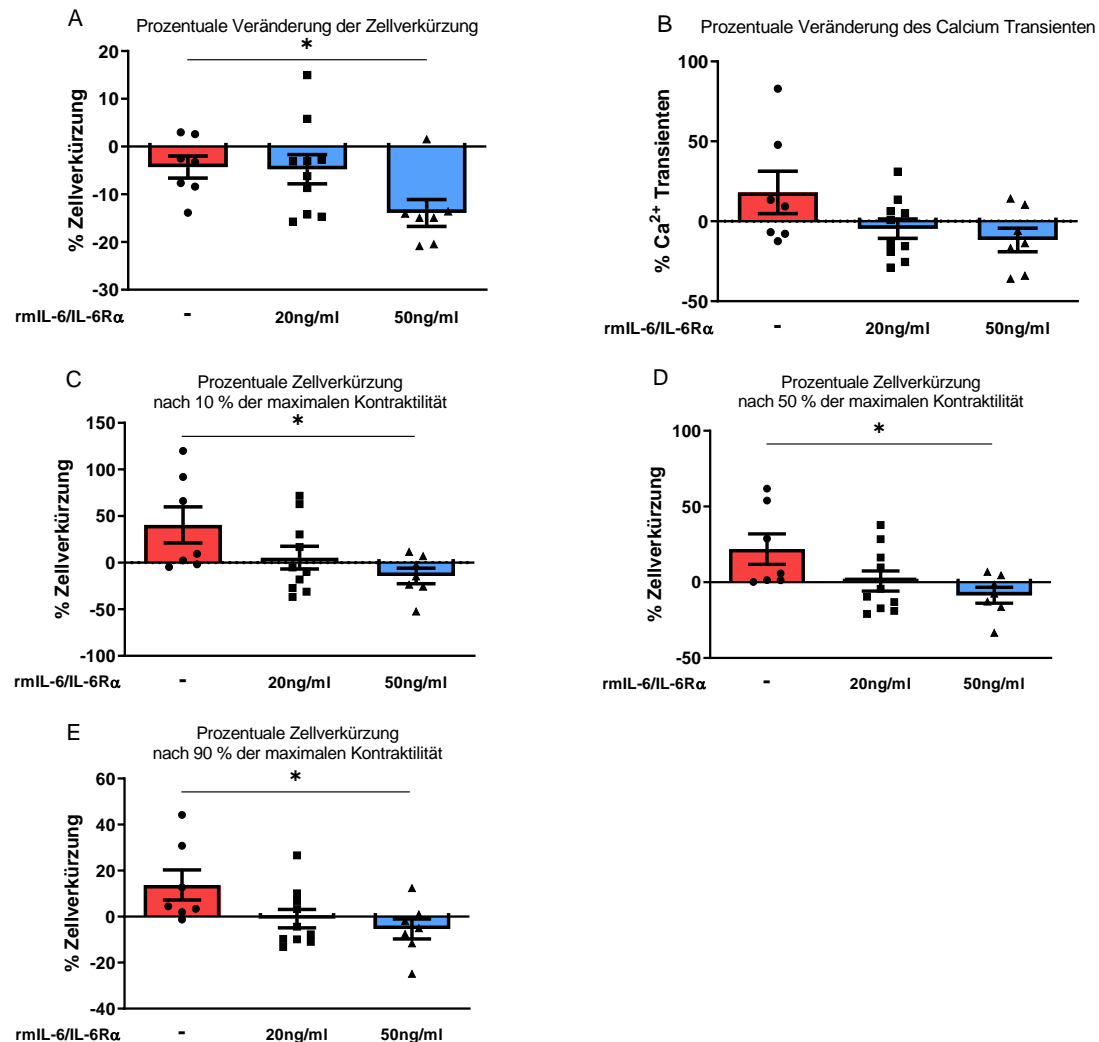


Abbildung 18: Rekombinantes IL-6 reduziert die Kontraktilität und den Geschwindigkeitsaufbau der Kontraktion in adulten Ratten Kardiomyozyten.

Adulte ventrikuläre Ratten-Kardiomyozyten wurden mit PBS (Kontrolle, $n = 7$) oder rmIL-6/IL-6R α (20 ng/ml, $n = 10$ oder 50 ng/ml, $n = 7$) für 5 Minuten behandelt und IonOptix[®] Messungen wurden durchgeführt. **(A,B)** Darstellung der prozentualen Veränderung der Zellverkürzung und des Calcium Transienten im Vergleich zu dem vorher nicht behandelten Kardiomyozyten. **(C,D,E)** Darstellung der prozentualen Zellverkürzung nach Erreichen von 10 %, 50 % und 90 % der maximalen Kontraktilität als Darstellung des Geschwindigkeitsaufbaus. Die Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels eines zweiseitigen T-Tests: * $p \leq 0.05$.

4.5 *Real-time deformability cytometry* (RT-DC) Messungen der Zellgröße und Deformation in HL-1 Kardiomyozyten

Um die Effekte einer IL-6 Behandlung auf morphologische und zellmechanische Eigenschaften von HL-1 Zellen, wie Zellgröße und Deformation zu untersuchen, wurden Kardiomyozyten im Hochdurchsatzverfahren mittels RT-DC untersucht (vgl. Abbildung 20). Eine RT-DC Untersuchung von HL-1 Kardiomyozyten war bisher noch nicht erfolgt. Es war daher erforderlich diese Methode für die Anwendung an HL-1 Zellen zu optimieren. Zunächst untersuchten wir den Einfluss von unterschiedlichen initial ausgesäten Zellzahlen auf die bildliche Darstellung der Zellen in der Hochleistungskamera. Hierbei zeigte sich, dass die Verwendung von 500.000 HL-1 Kardiomyozyten zu einer Kardiomyozyten Aggregation führt, was eine Messung von Einzelzellmessungen verhindert. Durch Reduktion der Zellzahl auf 300.000 Zellen pro *Well* einer 6-*Well*-Platte konnte die Aggregation der Kardiomyozyten soweit vermindert werden, dass eine Messung der Fläche und der Deformation von HL-1 Kardiomyozyten mit dem RT-DC Verfahren möglich wurde.

Weiterhin konnten wir nachweisen, dass Passage-Stadien, sowie die Verwendung von Norepinephrin, welches im Standardkultivierungsmedium von HL-1 enthalten ist, einen Einfluss auf die Deformationsmessungen haben. HL-1 Zellen höherer Passagen waren morphologisch weniger verformbar als Zellen niedrigerer Passagen, wobei sich ab der 15. Passage eine stabile Phase einstellt, welche zur Messung verwendet werden kann. Verglichen mit Norepinephrin-kultivierten Zellen führte die Abwesenheit von Norepinephrin im Kultivierungsmedium zu einer Versteifung der Kardiomyozyten (Abbildung 19). Basierend auf diesen Daten wurden 300.000 HL-1 Zellen in der 15-20 Passage verwendet und im Beisein von Norepinephrin kultiviert. Unter diesen Bedingungen zeigte sich zwischen rmlL-6/IL-6R α - und Vehikel-behandelten HL-1 Kardiomyozyten (Kontrolle: 179,4 μm^2 ; rmlL-6/IL-6R α : 178,3 μm^2) kein signifikanter Unterschied in der Zellfläche (vgl. Abbildung 20C). Die rmlL-6/IL-6R α Behandlung hatte auch keinen Einfluss auf die Zelldeformation im Vergleich zu den Kontrollen (Kontrolle: 0.0743; rmlL-6/IL-6R α : 0.0732) (vgl. Abbildung 20D).

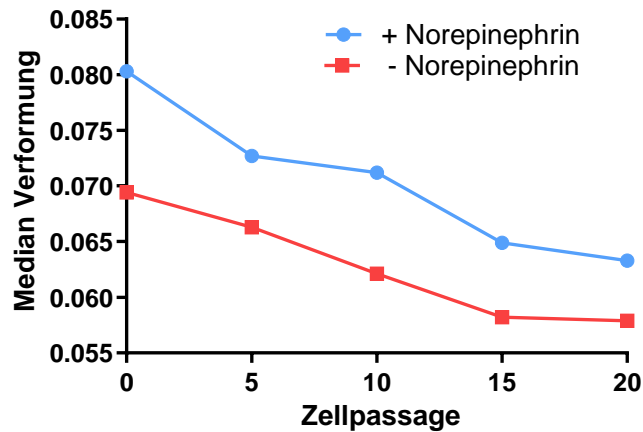


Abbildung 19: Der Einfluss der Zellpassage und dem Zusatz von Norepinephrin auf die Deformation in der RT-DC Messung.

HL-1 Kardiomyozyten Zellen unterschiedlicher Passagen (Passage 0, 5, 10, 15, 20) wurden in einer 6-Well Platte mit 300.00 Zellen/Well ausgesät, mit (blau) oder ohne Norepinephrin versetztem Medium (rot) kultiviert und nach 24-stündiger Inkubation mittels RT-DC bezüglich ihrer Deformation untersucht. Das Ablösen und Aufbereiten der Zellen erfolgte direkt vor der RT-DC Messung. Dargestellt sind die durchschnittlichen Messwerte eines Wells der jeweiligen Passage, die aus mehreren tausend Einzelwerten besteht.

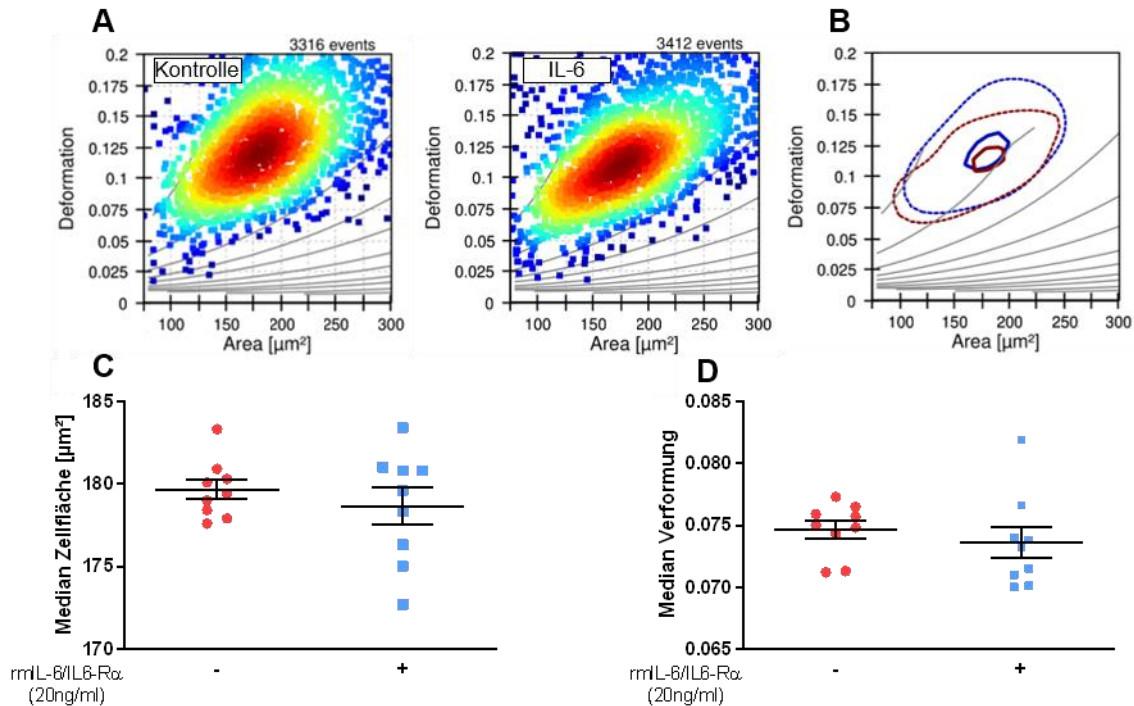


Abbildung 20: Messung von Zellgröße und Deformation mittels *Real-time deformability cytometry* (RT-DC).

HL-1 Kardiomyozyten wurden im 6-Well mit 300.00 Zellen/Well ausgesät, kultiviert und mit Kontrollmedium oder 20 ng/ml rekombinatem Interleukin-6 für 24 Stunden stimuliert. Das Ablösen und Aufbereiten der Zellen erfolgte hintereinander und direkt vor der RT-DC Messung. Es wurden Triplikate an drei unterschiedlichen Tagen aus drei verschiedenen Isolaten gemessen. Die Auswertung von Zellgröße und Deformation erfolgte nach Durchführung aller Messungen mithilfe der Software ShapeOut. **(A)** Dargestellt sind jeweils ein repräsentatives Streudiagramm mit Zellgröße (Area, μm^2) und Deformation von Kontrollmessungen (n = 3316) und IL-6 behandelten HL-1 Kardiomyozyten (n = 3412). Die Farbkodierung gibt ein Maximum (rot) und ein Minimum (blau) der gemessenen Zelldichte an. **(B)** Das Konturdiagramm stellt 50 % der Zelldichte innerhalb der gestrichelten Linie und 90 % innerhalb der durchgezogenen Linie von der Kontroll- (blau) und IL-6- (braun) Messung **(A)** dar. Die mediane Fläche **(C)** und mediane Verformung **(D)** von Kontrollzellen (n = 19334 repräsentiert durch die durchschnittlichen Werte der sechs Messungen) verglichen mit IL-6 behandelten Kardiomyozyten (n = 16356 repräsentiert durch die durchschnittlichen Werte der sechs Messungen) zeigte keinen statistischen Unterschied. Jeder dargestellte Punkt entspricht dem Median der Messungen eines Wells. Die Daten sind als Mean \pm SEM dargestellt. Die statistische Auswertung wurden mittels (linear) Mixed Model kalkuliert und die statistische Signifikanz hierfür mittels Wilks Theorem berechnet.

4.6 Kardiale Dysfunktion in septischen *gp130*WT und *gp130*cKO Mäusen

24 Stunden nach Durchführung einer Sham- oder CLP-Operation erfolgte die Messung der Herzfunktion mittels Echokardiographie in WT und *gp130* cKO (cKO) Mäusen. Die dabei erhobenen Daten sind im Anhang mit Mittelwert \pm SEM aufgelistet (Tabelle 18/19). In basalen echokardiographischen Messungen vor Durchführung der Operationen konnte kein Unterschied hinsichtlich der LVEF, des SV und der FS festgestellt werden. Lediglich das Herzzeitvolumen (CO) wies bei den cKO Mäusen auf basaler Ebene ein signifikant verringertes Herzzeitvolumen auf (WT: 28,06 ml/min zu cKO: 24,48 ml/min, $p \leq 0.05$). Dieser Unterschied konnte zwischen den Sham WT und cKO Mäusen nach 24 Stunden nicht mehr festgestellt werden.

Vierundzwanzig Stunden nach der Operation zeigten die CLP-operierten WT Mäuse mit 44,28 % eine signifikant verringerte LVEF verglichen mit den Sham WT Mäusen mit 51,57 % ($p \leq 0.05$). Die LVEF war zwischen den cKO Sham (53,73 %) und cKO CLP (47,99 %) Mäusen nicht unterschiedlich. Die LVEF von WT CLP (44,28 %) war signifikant geringer als in cKO CLP Tieren (47,99 %, $p \leq 0.05$) (vgl. Abbildung 21A). Das SV der WT CLP Mäuse war mit 34,63 μ l im Vergleich zum SV der WT Sham Mäuse von 53,50 μ l signifikant reduziert ($p \leq 0.05$). Das SV der cKO Gruppe wurde von der Sepsis nicht beeinflusst (vgl. Abbildung 21B). Der CO war nach 24 Stunden in der WT CLP (17,16 ml/min) Gruppe signifikant geringer als in der WT Sham (28,48 ml/min) Gruppe ($p \leq 0.01$). Wohingegen kein signifikanter Unterschied des CO zwischen der cKO Sham und der cKO CLP-Gruppe ermittelt werden konnte (vgl. Abbildung 21C). Die FS war nach 24 Stunden in der WT Gruppe (26,39 % zu 21,73 %, $p \leq 0.01$) signifikant verringert. Die FS war in der WT CLP Gruppe signifikant geringer als in der cKO CLP Gruppe ($p \leq 0.01$). Innerhalb der cKO Gruppe gab es bezüglich der Behandlung keinen Unterschied in der FS (vgl. Abbildung 21D).

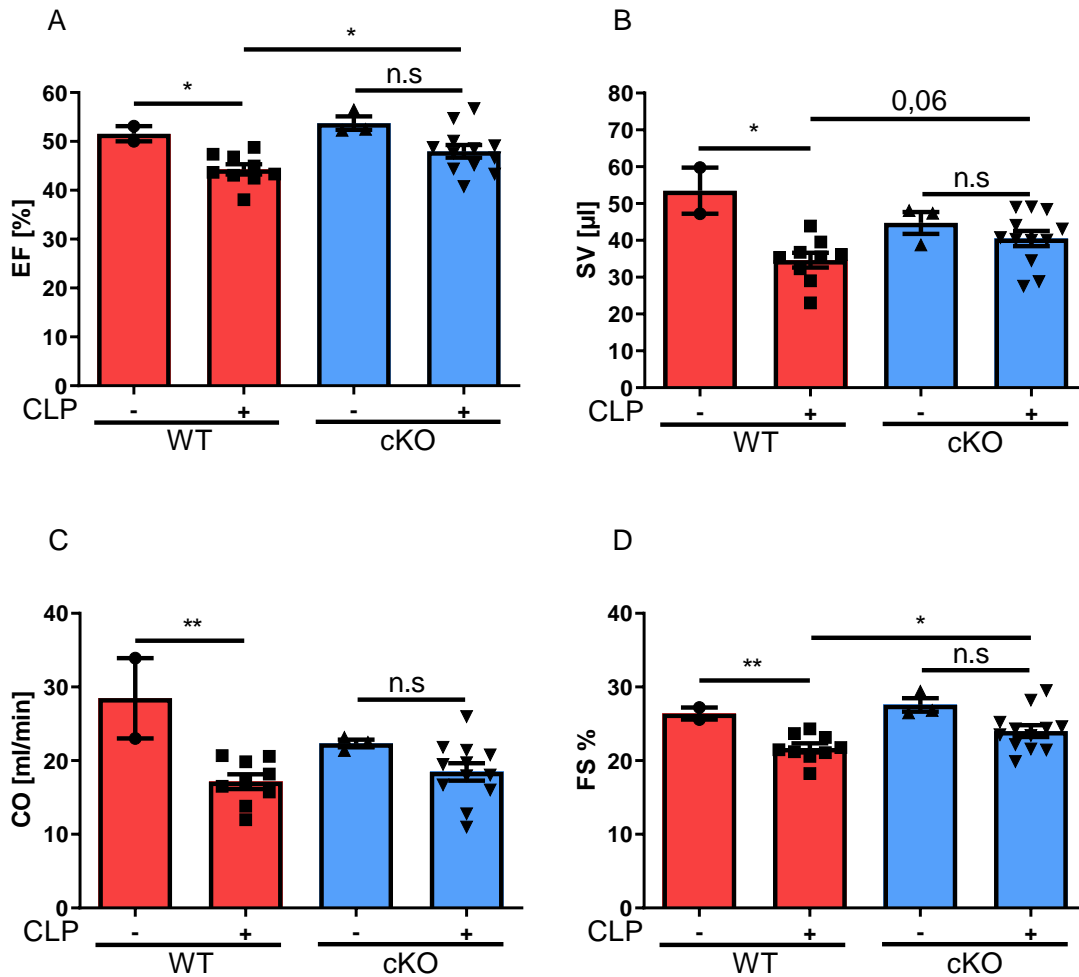


Abbildung 21: *Gp130* cKO-Mäuse weisen eine verbesserte Herzfunktion im Vergleich zu WT-Mäusen nach Induktion einer Sepsis auf.

Ergebnisse der transthorakalen Echokardiographie von WT Sham (n = 2), WT CLP (n = 9), cKO Sham (n = 3) und cKO (n = 12) Mäusen 24 Stunden nach Durchführung einer Sham- oder CLP-Operation. Dargestellt sind die Ejektionsfraktion (**A**), das Schlagvolumen (**B**), das Herzzeitvolumen (**C**) und die Verkürzungsfraktion (**D**). Die Daten jeder Maus sind als Messpunkt dargestellt und der Mittelwert \pm SEM angegeben. Zur statistischen Analyse der Daten wurde zunächst ein One-way ANOVA Test zwischen den Gruppen durchgeführt. Bei Signifikanz ($p \leq 0.05$) wurde zur post-hoc Analyse ein zweiseitiger T-Test verwendet * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$. EF (Ejektionsfraktion), SV (Schlagvolumen), CO (Herzzeitvolumen), FS (Verkürzungsfraktion).

4.7 Expression kardialer Stressmarker in Herzen von septischen WT und gp130 cKO Mäusen

Die Herzen der Mäuse wurden 24 Stunden nach Durchführung der Sham- oder CLP-Operation auf Veränderung der Expression kardialer Stressmarker und mitochondrialer Gene untersucht (vgl. Abbildung 22/23).

Es wurde zunächst untersucht, ob es hinsichtlich der Aktivität des gp130 Signalweges Unterschiede zwischen den Herzen der CLP- bzw. Sham-operierten WT und cKO Tiere gibt. Western Blot Untersuchungen zeigten, dass die pSTAT3 Y705/STAT3 Ratio in den Herzen der CLP-operierten WT Tiere 23,8-fach höher als in den Sham operierten WT Tieren war ($p \leq 0.001$). Im Gegensatz dazu zeigte sich in den Herzen der CLP-behandelten cKO Tiere nur ein 6,8-facher Anstieg der pSTAT3 Y705/STAT3 Ratio der nicht signifikant war. Die pSTAT3 Y705/STAT3 Ratio war in den Herzen der CLP-operierten WT Tiere höher als denen der CLP-operierten cKO Tieren ($p \leq 0.01$). (vgl. Abbildung 22B/C). Die Unterschiede der pSTAT3 Y705/STAT3 Ratio ließen auf Unterschiede in der GP130-abhängigen Signaltransduktion schließen, so dass im Weiteren die Socs3 Genexpression quantifiziert wurde. In den Herzen der CLP-operierten WT Tiere war die Socs3 Expression 57,1-fach höher ($p \leq 0.05$) als in den Herzen der Sham behandelten WT Tiere. Demgegenüber war die Socs3 Expression in den Herzen der CLP-operierten cKO Tiere unverändert. Die Socs3 Genexpression war in den Herzen der CLP-operierten WT Tieren signifikant ($p \leq 0.05$) höher als in denen der entsprechenden cKO Tiere (vgl. Abbildung 22A).

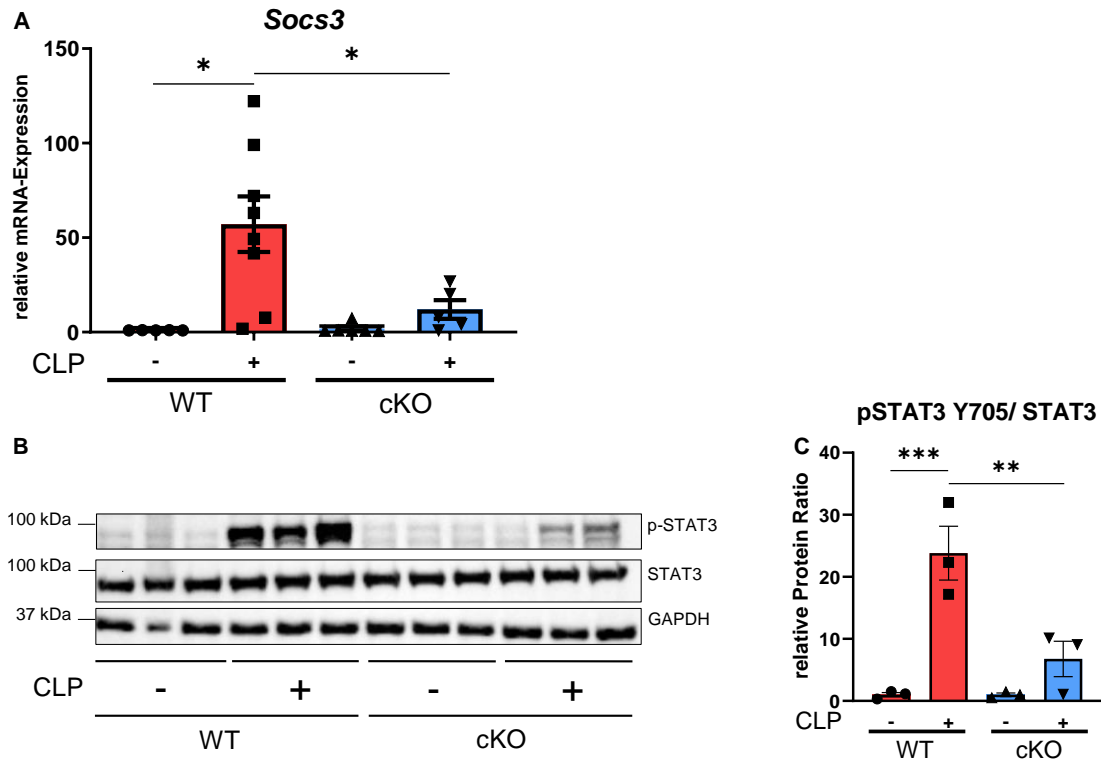


Abbildung 22: Gp130 Mäuse sind vor einer Aktivierung des gp130 Signalweges nach Induktion einer Sepsis geschützt.

(A) QRT-PCR Ergebnisse von *Socs3* in Herzen von männlichen WT und cKO-Mäusen 24 Stunden nach Sham-(WT Sham n = 5, WT CLP n = 8), bzw. CLP-Operation (cKO Sham n = 6 und cKO CLP n = 5). Die Normalisierung erfolgte mittels *Gapdh*. Die Daten jeder Maus sind als Messpunkt dargestellt und der Mittelwert \pm SEM angegeben. Zur statistischen Analyse der Daten wurde zunächst ein One-way ANOVA Test zwischen den Gruppen durchgeführt. Bei Signifikanz ($p \leq 0.05$) wurde zur post-hoc Analyse ein zweiseitiger T-Test verwendet. **(B)** Western Blot von drei beispielhaften Versuchstieren aus der jeweiligen Gruppe WT Sham, WT CLP, cKO Sham und cKO CLP 24 Stunden nach Durchführung einer Sham- oder CLP-Operation unter Verwendung von pSTAT3 Y705 oder STAT3. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. **(C)** Darstellung der Ratio zwischen p-STAT3 Y705 und STAT3, des in (B) gezeigten Western Blots. Die einzelnen Werte sind als Messpunkt dargestellt und der Mittelwert \pm SEM angegeben. Zur statistischen Analyse der Daten wurden eine One-way ANOVA zwischen den Gruppen durchgeführt. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$. kDa, kilo Dalton.

Die Expression von *Nppb* war in den Herzen der septischen WT Mäuse um das 9,9-fache gegenüber den Sham behandelten WT Tieren erhöht ($p \leq 0.01$) und war signifikant höher gegenüber den Herzen der septischen cKO Mäuse ($p \leq 0.01$). In der cKO Gruppe wurde die *Nppb* Expression durch die Behandlung nicht beeinflusst (vgl. Abbildung 23A). Die myokardiale Expression von *Myh6* war in den CLP operierten WT Tieren um 28,5 % signifikant verringert ($p \leq 0.01$) wohingegen innerhalb der cKO Gruppe keine Veränderung auftrat (vgl. Abbildung 23B). *Myh7* zeigte weder in der WT- noch in der cKO-Gruppe einen signifikanten Unterschied (vgl. Abbildung 23C). Die Expression von *Ppargc1a* war in den Herzen der CLP WT-Mäuse im Vergleich zu den Sham WT Mäusen um das 0,58-fache signifikant reduziert ($p \leq 0.05$). Die Gruppe der cKO Tiere zeigte keinen signifikanten Unterschied (vgl. Abbildung 23D). Die Expression von *Mfn1* ($p \leq 0.05$), *Mfn2* ($p \leq 0.05$) und *Drp1* ($p \leq 0.05$) war in der WT Gruppe signifikant reduziert und blieb in den Herzen der cKO Mäuse unverändert (vgl. Abbildung 23E/G/H). Die *Mfn1* Expression war in den Herzen der septischen cKO Mäuse signifikant höher als in den septischen WT Tieren ($p \leq 0.05$). Die *Beclin1* Expression war in den CLP WT Tieren, verglichen mit den Sham WT Tieren, signifikant um das 1,14-fache erhöht ($p \leq 0.05$). Innerhalb der cKO Tieren gab es keinen Unterschied zwischen Sham und CLP-operierten Tieren. Die *Beclin1* Expression der CLP WT-Tiere war jedoch signifikant gegenüber den cKO Tieren erhöht ($p \leq 0.01$) (vgl. Abbildung 23F).

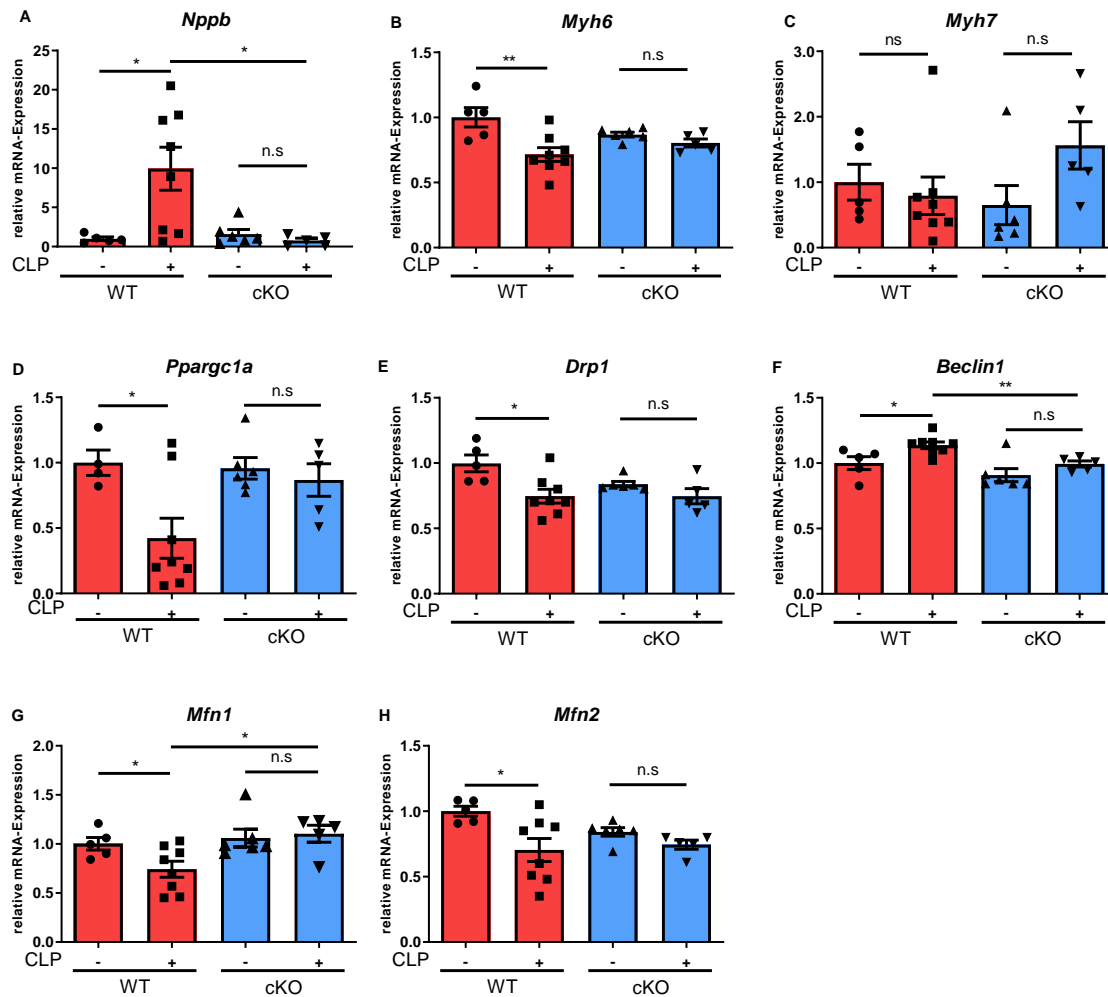


Abbildung 23: Die Expression von mitochondrialen Genen ist in Herzen von gp130 cKO-Mäusen nach CLP-Operation verringert.

qRT-PCR Ergebnisse von *Nppb* (A), *Myh6* (B), *Myh7* (C), *Ppargc1a* (D), *Drp1* (E), *Beclin1* (F) *Mfn1* (G), *Mfn2* (H) in Herzen von männlichen WT und cKO-Mäusen 24 Stunden nach Sham- (WT Sham n = 5, WT CLP n = 8), bzw. CLP-Operation (cKO Sham n = 6 und cKO CLP n = 5). Die Normalisierung erfolgte mittels *Gapdh*. Die Daten jeder Maus sind als Messpunkt dargestellt und der Mittelwert \pm SEM angegeben. Zur statistischen Analyse der Daten wurde zunächst ein One-way ANOVA Test zwischen den Gruppen durchgeführt. Bei Signifikanz ($p \leq 0.05$) wurde zur post-hoc Analyse ein zweiseitiger T-Test verwendet. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$. n.s = nicht signifikant.

4.8 Die Funktion der Atmungskette in der Sepsis im Herzen wird durch die Deletion von *gp130* aufrechterhalten

Die Funktionsweise der Atmungskette und ihrer Komplexe wurde 24 Stunden nach der Operation im Herzen von Sham- (WT Sham, $n = 6$; cKO Sham, $n = 6$) und CLP-behandelten (WT CLP, $n = 5$; cKO CLP, $n = 6$) Mäusen untersucht (vgl. Abbildung 24).

Zunächst wurden die Herzen der Sham-operierten WT und cKO Mäuse hinsichtlich ihrer Sauerstoffdurchflussrate untersucht. Es zeigte sich eine signifikant höhere Sauerstoffdurchflussrate in allen untersuchten Zuständen in den Herzen der WT Tiere verglichen mit denen der cKO Tiere; F_p ($p \leq 0.05$), FN_p ($p \leq 0.01$), FNS_p ($p \leq 0.01$), $FNSGp_p$ ($p \leq 0.001$), $FNSGp_E$ ($p \leq 0.001$) und SGp_E ($p \leq 0.001$).

Die Induktion einer Sepsis mittels CLP-Operation führte in den Herzen der WT Mäuse zu einer signifikanten Abnahme der Sauerstoffdurchflussrate gegenüber den Herzen der Sham behandelten WT Mäuse.

Im F_p -Stadium, welches durch Zugabe von Octanoylcarnitin eingeleitet wird, zeigte sich ein um 65 % signifikant verringerte Sauerstoffdurchflussrate in den WT CLP Herzen im Vergleich zu den Herzen der Sham-operierten WT Mäuse ($p \leq 0.05$). Zwischen den Herzmuskelfasern der cKO Sham- und cKO CLP-Mäuse bestand kein signifikanter Unterschied.

Im FN_p Stadium war die Sauerstoffdurchflussrate bei den WT CLP Herzen signifikant um das 4,4-fache reduziert ($p \leq 0.05$), wohingegen kein Unterschied innerhalb der cKO Gruppe besteht.

Im FNS_p Stadium zeigte sich in den Herzen der WT Sham- und der WT CLP-Mäuse eine gesteigerten Sauerstoffdurchflussrate. Die Sauerstoffdurchflussrate war in den WT Sham Herzen 3,8-fach höher als in den WT CLP Herzen ($p \leq 0.05$). Innerhalb der cKO Gruppe konnte dafür kein signifikanter Unterschied gemessen werden. Der prozentuale Anstieg vom FN_p zum FNS_p Stadium ist in den Herzen der WT Sham-Mäuse (40 %) und der WT CLP-Mäuse (65 %) nicht signifikant unterschiedlich.

Im $FNSGp_p$ Stadium zeigte sich eine 2,8-fach erhöhte Sauerstoffdurchflussrate ($p \leq 0.05$) in den WT Sham Herzen verglichen mit dem WT CLP Herzen. Zwischen den

Herzmuskelfasern der cKO Sham- und cKO CLP-Mäuse bestand kein signifikanter Unterschied.

Nach Gabe des Entkopplers CCCP (FNSG_{pE}) kam es zu einer Reduktion der Sauerstoffdurchflussrate in den Herzen beider Gruppen, wobei diese in den WT Sham- Herzen 3,0-fach höher als in den WT CLP Tieren war ($p \leq 0.05$). In den Herzen der cKO Mäuse war die Sauerstoffdurchflussrate hinsichtlich dieser Behandlung nicht unterschiedlich.

Komplex I der Atmungskette wird durch die Gabe von Rotenon inhibiert und führt damit zu einem Wechsel vom FNSG_{pP}-Stadium zum SG_{pE}-Stadium. Die Sauerstoffdurchflussrate war in den WT Sham Herzen 4,0-fach höher als in den WT CLP- Herzen ($p \leq 0.05$). In den Herzen der beiden Behandlungsgruppen der cKO Mäuse ließ sich kein Unterschied messen.

Die signifikanten Reduktionen der F_p , FN_p , FNS_p , $FNSG_p$, $FNSGP_E$ und SGP_E in den Herzen der CLP-behandelten WT Mäuse konnten in der CLP-Gruppe der cKO Herzen nicht beobachtet werden (vgl. Abbildung 24D).

Zum Abschluss des Messprotokolls erfolgte die Bestimmung der Sauerstoffdurchflussraten des Komplexes IV (vgl. Abbildung 24B). Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen WT Sham und WT CLP sowie zwischen cKO Sham und cKO CLP festgestellt werden. Weiterhin bestand kein signifikanter Unterschied zwischen WT CLP und cKO CLP.

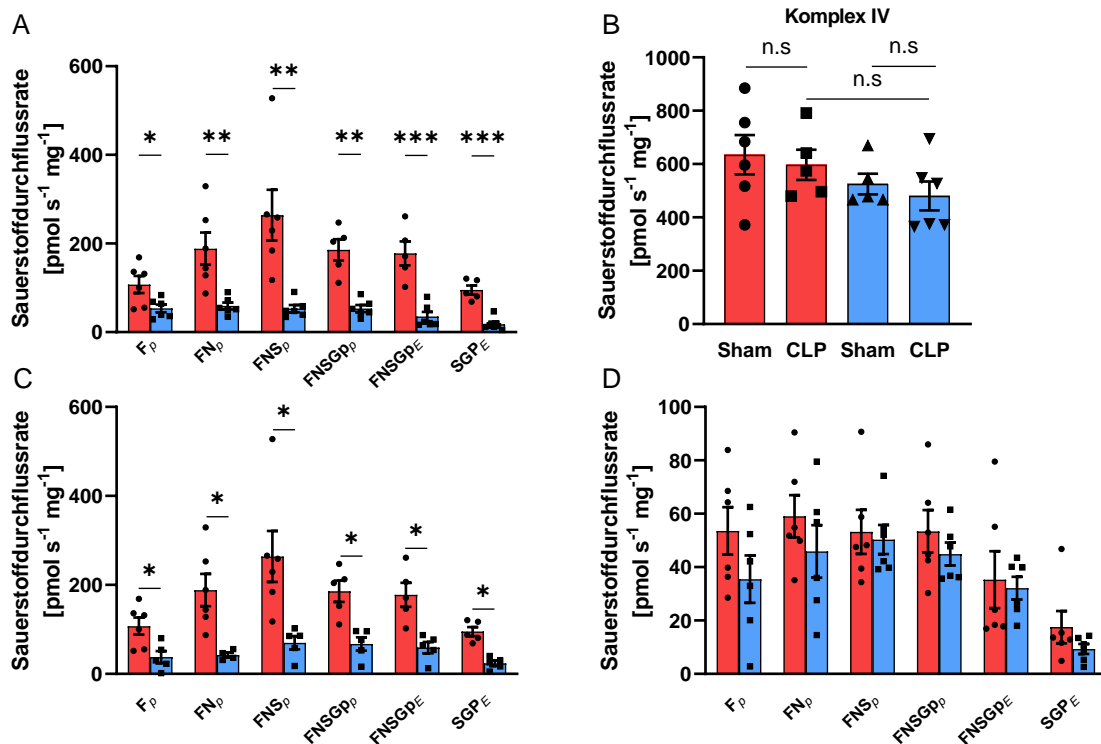


Abbildung 24: Die Funktionsfähigkeit der Atmungskette wird durch die Induktion einer Sepsis in Herzen von *gp130* cKO Mäusen aufrechterhalten.

(A) Sauerstoffdurchflussrate von Wildtyp Sham (rot, n=6) und cKO Sham (blau, n=6), (B) Wildtyp Sham (rot, n=6), Wildtyp CLP (rot, n=5), cKO Sham (blau, n=5) und cKO CLP (blau, n=6) (C) Wildtyp (Sham (rot), n = 6 und CLP (blau) n = 5), (C) cKO (Sham (rot), n = 6 und CLP (blau), n = 6) permeabilisierten Herzen 24 Stunden nach Sham- oder CLP-Operation. Dargestellt sind in A), C), D) die OXPHOS Kapazitätsstadien (F_p , FN_p , FNS_p und $FNSGP_p$) sowie die Elektronentransfer-Stadien ($FNSGP_E$ und SGP_E). In Grafik B) sind die Sauerstoffdurchflussraten des Komplex IV dargestellt. Die Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte zunächst mittels One-way ANOVA Test zwischen den Gruppen. Bei signifikant ($p \leq 0.05$) wurde zur post-hoc Analyse ein zweiseitiger T-Test verwendet: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, n.s = nicht signifikant. OXPHOS (oxidative Phosphorylierung), F (Fettsäure), N (NADH-ähnliche Substrate), S (Succinat), GP (Glycerolphosphat).

5. Diskussion

Die Sepsis-induzierte Kardiomyopathie ist eine Begleitkomplikation der Sepsis, die mit der Mortalität der betroffenen Patienten assoziiert ist (Sanfilippo et al. 2015). Die Pathogenese dieser Erkrankung ist bis heute ungeklärt (Flierl et al. 2008). Ein Verständnis der Pathogenese ist jedoch für die Entwicklung spezifischer Therapiekonzepte erforderlich. Der Pathogenese primär zugeschrieben werden unter anderem die Zytokine TNF und IL-1 β (Sato and Nasu 2015). Der Plasmaspiegel von IL-6 Plasmaspiegel steigt in der Sepsis an und wird als ein prognostischer Marker für die Schwere einer Sepsis angesehen (Damas et al. 1992; Pinsky et al. 1993). Die Wirkung von IL-6 in der Entstehung einer Sepsis-induzierten Kardiomyopathie wurden bislang weniger untersucht. Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung von IL-6 in der Entwicklung einer septischen Kardiomyopathie zu untersuchen.

5.1 Der IL-6 *Trans*-Signalweg ist in HL-1 Kardiomyozyten aktiv

Der IL-6 Signalweg wurde in HL-1 Kardiomyozyten untersucht. Dafür wurden die Zellen mit IL-6 inkubiert und die Aktivierung des Signalweges über die Quantifizierung der *Socs3* Genexpression gemessen. Die Behandlung der HL-1 Kardiomyozyten erfolgte mit einer IL-6 Konzentration von 20 ng/ml, weil sich diese Konzentration im Bereich der gemessenen IL-6 Konzentrationen septischer Patienten befindet (Waage et al. 1989; Pathan et al. 2004). Diese Experimente führten zu einer Festlegung der Inkubationszeit auf 24 Stunden (vgl. Abbildung 14A). Die Induktion des IL-6 Signalwegs kann in Zellen abhängig von der Zusammensetzung des *gp130*-Rezeptors auf zwei Signalwegen erfolgen (vgl. Abbildung 7). Durch Inkubation der HL-1 Kardiomyozyten mit IL-6 oder einer Kombination aus IL-6 und IL-6 Rezeptor konnte ein signifikanter Unterschied der *Socs3* Genexpression zugunsten der Inkubation mit dem kombinierten IL-6/IL-6R (rekombinantes IL-6) gezeigt werden (vgl. Abbildung 14B). Daraus lässt sich ableiten, dass IL-6 seine Wirkung über den *Trans*-Signalweg in HL-1 Kardiomyozyten vermittelt. Neben der von uns verwendeten *Socs3* Genexpressionsanalyse sind auch Western Blot Analysen der Rezeptorzusammensetzung mit Antikörper gegen den *gp130* Rezeptor sowie für die IL-6-R α Untereinheit in der Literatur beschrieben. Mittels Western Blot Analysen unter Verwendung von GP130 und IL-6R Antikörpern untersuchten Yang et al. den *gp130* Rezeptoraufbau in Mesothelzellen. Sie konnten nachweisen, dass IL-6/sIL-6R zur

Aktivierung der gp130 Signalkaskade notwendig ist (Yang et al. 2017). In ARVM konnte gezeigt werden, dass IL-6/sIL-6R über die Phosphorylierung von STAT3 (Y705) zur Steigerung der Expression von kardialen Hypertrophie-Markern (z.B. BNP) und zu einer Zunahme der Zellgröße führt. IL-6 allein konnte diese Effekte nicht erzielen (Szabo-Fresnais et al. 2010). Diese Ergebnisse konnten mit der hier vorliegenden Arbeit reproduziert werden. Zudem zeigen wir, dass IL-6 in Kombination mit der IL-6 Rezeptoruntereinheit notwendig ist, um den gp130 Signalweg zu aktivieren. Eine Induktion der Socs3 Genexpression durch IL-6 konnte unter anderem durch Starr et al. in verschiedenen Organen der Maus gezeigt werden. Die Autoren beschrieben unter anderem, dass IL-6 die Socs3 Expression im Lebergewebe steigert (Starr et al. 1997). Neben IL-6 können auch LPS und TNF die Socs3 Genexpression in Makrophagen induzieren (Bode et al. 1999). Außerdem steigern Angiotensin II, Interferone, IL-10 und Insulin die Socs3 Expression in Kardiomyozyten (Kurdi and Booz 2007). Durch Verwendung von *gp130* siRNA können wir *in vitro* nachweisen, dass die Socs3 Genexpression in Kardiomyozyten vom gp130 Rezeptor abhängig ist (vgl. Abbildung 16D). Auch *in vivo* zeigte sich, dass die Socs3 Expression im Herzen septischer Tiere abhängig von gp130 Rezeptor ist, da diese in den Herzen der septischen WT Tiere sehr viel stärker als in denen der septischen cKO Tieren gesteigert war (vgl. Abbildung 21A). Somit konnten wir zeigen, dass die Socs3 Genexpression sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* vom gp130 Rezeptor abhängig ist und als Marker für die Aktivierung der gp130/JAK/STAT-Signalachse im Herzen in der Sepsis verwendet werden kann. In mehreren Studien wurde eine verminderte Socs3 Expression mit einer protektiven Wirkung in Kardiomyozyten assoziiert (Kurdi and Booz 2007). Jedoch führte die Deletion von Socs3 in anderen Geweben auch zum Zelltod durch Apoptose (Lu et al. 2006; Robinson et al. 2007). Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Socs3 Expression und der Apoptose waren allerdings kein Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Weiterhin wird Socs3 nicht ausschließlich über den IL-6/gp130 Signalweg aktiviert. So können beispielsweise alle Zytokine der IL-6-Familie und Interferon- γ die Socs3 Expression über den gp130 Rezeptor induzieren (Carow and Rottenberg 2014; Gao et al. 2018). Eine erhöhte Socs3 Expression führt durch eine Hemmung von JAK- und STAT-Proteinen zu einer Inhibition des JAK/STAT-Signalwegs. SOCS3 kann ebenfalls die Aktivität des NF- κ B und des Insulin-Signalwegs, durch Hemmung von Insulin Rezeptor Substrat 1, reduzieren (Rui et al. 2002; Carow and Rottenberg 2014).

5.2 Validierung der *gp130* Deletion in Kardiomyozyten

Zur Charakterisierung des *gp130* Rezeptors ist ein Vergleich zwischen HL-1 Kardiomyozyten, die den *gp130* Rezeptor in ihrem physiologischen Ausmaß exprimieren und regulieren, und HL-1 Kardiomyozyten, die durch siRNA eine verminderte Genexpression und Proteinmenge des *gp130* Rezeptors aufweisen, notwendig. Die Herunterregulierung von *gp130* in HL-1 Kardiomyozyten erfolgte dabei durch spezifische siRNA *in vitro*. Es gelang die *gp130* mRNA um 68 % und den GP130 Proteingehalt um 82 % gegenüber den Kontrollen zu reduzieren (vgl. Abbildung 16). Vergleichbare Daten für eine Kombination aus HL-1 Kardiomyozyten und *gp130* siRNA sind in der Literatur nicht zu finden. In C2C12 Zellen konnten Zanders et al. eine relative Reduktion der *gp130* mRNA um 69 % herbeiführen (Zanders et al. 2021). Weiterhin zeigten Zhou et al. eine Verringerung von *gp130* auf Proteinebene in HL-1 Kardiomyozyten, jedoch ohne eine Angabe zum Ausmaß dessen (Zhou et al. 2020). Laut einer weiteren Studie konnte der GP130 Proteingehalt in C2C12 Muskelzellen um 30 % reduziert werden (Fix et al. 2019). Unsere Daten belegen eine ausgeprägtere Reduktion des GP130 Proteingehaltes, was sich mit unterschiedlichen Zellarten oder der Verwendung von siRNA unterschiedlicher Hersteller erklären lässt. Die von uns gezeigte Reduktion der *gp130* mRNA ist hierbei vergleichbar mit Reduktionen in C2C12 Muskelzellen.

Aufgrund der nicht signifikanten Unterschiede hinsichtlich der *gp130* mRNA zwischen unbehandelten und mit Kontroll siRNA behandelten HL-1 Kardiomyozyten kann eine Interaktion und Einflussnahme der Transfektionsreagenzien auf die Genexpression und Proteinbiosynthese des *gp130* Rezeptors ausgeschlossen werden.

Weitere Einflüsse der Transfektion auf zelluläre oder mechanische Eigenschaften wurden in diesem Rahmen nicht weiter untersucht und wären bei Verwendung von transfizierten Zellen für RT-DC Messung vorab notwendig, um einen Einfluss der Transfektionreagenzien auf Zellgröße und Deformation auszuschließen.

5.3 IL-6 führt zu einer Reduktion der Kontraktilität von Kardiomyozyten *in vitro*

Der Einfluss von IL-6 auf die Kontraktilität von Myozyten wurde in adulten ventrikulären Ratten-Kardiomyozyten (ARVM) untersucht. Wir konnten zeigen, dass IL-6 einen negativen inotropen Effekt auf ARVM hat, der durch eine signifikante Reduktion der Zellverkürzung (vgl. Abbildung 18A) und eine verzögerte Kontraktionsgeschwindigkeit (Abbildung 18C-E) verdeutlicht wird. Ein negativ inotroper Effekt von IL-6 konnte ebenfalls in isolierten Papillarmuskeln aus Herzen von Hamstern (Finkel et al. 1992) und isolierten embryonalen ventrikulären Myozyten von Küken (Kinugawa et al. 1994) nachgewiesen werden. Pathan et al. wiesen ebenfalls einen negativen inotropen Effekt von IL-6 nach. Weiterführend konnten sie durch Verwendung des JAK2-Inhibitors AG490 und eines PI3K/AKT-Inhibitor zeigen, dass dieser Effekt nicht über den JAK/STAT-Signalweg, sondern über den PI3K/AKT-Signalweg hervorgerufen wird (Pathan et al. 2011). Unsere Befunde, dass IL-6 negativ inotrop wirkt sind somit konsistent mit denen in der Literatur beschriebenen. Ein spezifischer Signalweg, der die negativ inotropen Effekte von IL-6 in ARVM vermittelt konnte nicht identifiziert werden. Auf die Prä-Inkubation mit dem JAK-2 Hemmstoff AG490, welches in Dimethylsulfoxid gelöst wurde, reagierten die ARVM mit einer verringerten Kontraktilität, sodass die Messung nach IL-6 Inkubation zu einem falsch-positiven Ergebnis geführt hätte (Daten nicht gezeigt). Um diesen Messfehler zu vermeiden, wären weitere Optimierungsversuche erforderlich.

5.4 Interleukin-6 führt zu keiner Zellgrößenveränderung von Kardiomyozyten

Unserer Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass IL-1 β und IL-6 zu einer Induktion von *Trim63* (MuRF1) und *Fbxo32* (Atrogin1) und zu einer Atrophie der Herz- und Skelettmuskulatur führen (Huang et al. 2017; Busch et al. 2021; Zanders et al. 2021). Durch Verwendung von RT-DC Hochdurchsatzmessungen von HL-1 Kardiomyozyten sollte untersucht werden, ob eine 24 stündige Behandlung dieser Zellen mit IL-6/sIL-6R zu einer Größenveränderung dieser Zellen führt. Die RT-DC Messungen konnten keinen Effekt von IL-6/sIL-6R auf die Zellgröße und Deformation von HL-1 Kardiomyozyten nach 24 Stunden nachweisen (vgl. Abbildung 19). Diese Ergebnisse waren unerwartet, da aus zellulären Experimenten bekannt ist, dass die Aktivierung

des gp130 Rezeptors zu einer Hypertrophie von Kardiomyozyten führt (Hirota et al. 1995) und eine IL-6 Überproduktion im Myokard von Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt mit einer Hypertrophie assoziiert ist (Kaneko et al. 1997). Zudem zeigten neuere *in vivo* Untersuchungen dass eine 7-tägige IL-6 Infusion eine Hypertrophie und Versteifung von Ratten Kardiomyozyten bewirkt (Meléndez et al. 2010). Außerdem konnte gezeigt werden, dass IL-6 Knockout Mäuse vor einer durch TAC (*Transverse aortic constriction*) induzierten kardialen Hypertrophie geschützt sind (Zhao et al. 2016). In diesem Model wird der Aortenbogen durch eine Ligatur eingeeengt, wodurch es zu einem Anstieg der Nachlast kommt, was ein starker Stimulus für das Auftreten einer kardialen Hypertrophie ist (Rockman et al. 1991). Zusammengenommen ist die Studienlage dennoch nicht eindeutig. Kamiński et al. zeigten, dass sowohl Wildtyp als auch Mäuse mit einer IL-6 Keimbahndeletion nach moderatem körperlichen Training eine kardiale Hypertrophie entwickeln (Kamiński et al. 2007). Darüber hinaus konnte kein Unterschied bezüglich der linksventrikulären Hypertrophie zwischen Herzen von Wildtyp und IL-6 *knockout* Mäusen nach TAC Operation nachgewiesen werden (Lai et al. 2012). Unsere *in vitro* Daten unterstützen die bisherigen Ergebnisse, die besagen, dass eine 24-stündige IL-6 Behandlung keinen Einfluss auf die Größe von Kardiomyozyten hat. Ein Einfluss von verwandten Zytokinen der IL-6 Familie auf die Zellgröße wird in der Literatur ebenfalls diskutiert. So konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass CT-1 (Pennica et al. 1995) und LIF (Kodama et al. 1997) eine Hypertrophie von neonatalen Kardiomyozyten vermitteln. Es wäre also möglich, dass IL-6 selbst nicht zum Auftreten einer Hypertrophie führt. Bei RT-DC handelt es sich um ein neues Hochdurchsatzverfahren zur Bestimmung von zellmechanischen Eigenschaften. Mit dieser Prozedur wurden auch die Effekte von IL-1 β auf HL-1 Kardiomyozyten untersucht. Diese Analysen zeigten, dass IL-1 β zu einer Reduktion der Zellgröße und einer Abnahme der Deformation führt (Busch et al. 2021). Daraus lässt sich ableiten, dass die Methode des RT-DCs valide zellmechanische Daten von HL-1 Kardiomyozyten erbringen kann. Bei weiteren Untersuchungen wäre die Testung des Einflusses von CT-1 und LIF auf die Zellgröße und Deformation von HL-1 Kardiomyozyten sinnvoll und im Anschluss die Durchführung eines Zeitverlaufsexperimentes. Hierbei könnten CT-1 und LIF, nach erfolgreicher Hypertrophieauslösung, als Positiv-Kontrolle und IL-1 β als Negativ-Kontrolle verwendet werden. Die Verwendung von *gp130* siRNA könnte zum Verständnis des Einflusses des *gp130* Signalweges auf die Entstehung einer

Hypertrophie beitragen. Ebenso könnte der Behandlungszeitraum die Ergebnisse beeinflussen. Daher sollten zusätzlich zum 24 Stunden Behandlungszeitraum 48 und 72 Stunden in Betracht gezogen werden.

5.5 Die Rolle von Interleukin-6 in der Genexpression der Myosin-Isoformen *Myh6* und *Myh7*

Für die kontraktile Funktion des Herzens sind *Myosin heavy chain* (MyHC) Proteine zuständig. Die Gene *Myh6* und *Myh7* kodieren für die herzspezifischen Isoformen α -MyHC und β -MyHC, respektive. Die Inkubation von HL-1 Kardiomyozyten mit IL-6/sIL-6R führte zu einer signifikanten Verringerung der *Myh6* und *Myh7* mRNA Expression (vgl. Abbildung 15C/D). Diese Verringerung konnte durch Verwendung von *gp130* siRNA aufgehoben werden und lässt darauf schließen, dass die *Myh6* und *Myh7* Expression zum Teil *gp130*-abhängig ist (vgl. Abbildung 16). Diese Ergebnisse konnten durch den Tierversuch weiter bestätigt werden. Eine signifikante Verringerung der *Myh6* Genexpression war in den Herzen der septischen WT aber nicht der septischen cKO Mäuse messbar (vgl. Abbildung 23B). Im Kontrast dazu zeigten septische WT und cKO Mäuse keine Veränderung der *Myh7* Genexpression im Vergleich zur den Kontrollen 24 Stunden nach Induktion einer Sepsis (vgl. Abbildung 23C). Unsere *in vitro* und *in vivo* Daten zeigen, dass die Behandlung mit IL-6 und die Induktion einer Sepsis zu einer Veränderung der Genexpression der Myosinisoformen führt und diese Effekte vom *gp130* Rezeptor abhängig sind.

Der Stellenwert der differentiellen Regulation der Myosinisoformen unter verschiedenen physiologischen und pathologischen Stressreaktionen ist Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen.

Den zentralen Stellenwert des Proteins α -MyHC konnten Jones et al. 1996 nachweisen. Ein homozygoter *Myh6* Knockout in Mäuse führte zum einem intrauterinen Versterben zwischen den Embryonaltagen 10 bis 12. Die Ursache des intrauterinen Versterbens konnten sie auf Herzfehler zurückführen. Heterozygote *Myh6* KO Mäuse waren jedoch überlebensfähig. Durch histologische Aufarbeitungen der Herzen wiesen sie vermehrt Fibrose und in Elektronenmikroskopischen Darstellungen eine veränderte Sarkomerstruktur nach. Durch Langendorff Untersuchungen zeigten sie, dass die Herzen von heterozygote *Myh6* KO Mäusen eine Abnahme der Kontraktilität und eine verlängerte Relaxation aufwiesen (Jones et al. 1996). Anzumerken sei hier, dass sich die Zusammensetzung der Myosine im

Herzen von Maus und Mensch unterscheidet. Nach der Geburt kommt es im Herzen der Maus zu einer Umwandlung der MyHC-Isoformen hauptsächlich zum α -MyHC, wohingegen beim Menschen diese Umwandlung nicht erfolgt und β -MyHC die dominierende MyHC Isoform im Herzen ist (Weiss and La Leinwand 1996). In Herzen von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz konnte eine 15-fache Reduktion der *Myh6* Genexpression im Vergleich zu gesunden Herzen nachgewiesen werden (Nakao et al. 1997). Dieselbe Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass sich in Herzen von terminal herzinsuffizienten Patienten nahezu kein α -MyHC Protein mehr nachweisen lässt (Miyata et al. 2000). Zudem sind genetische Mutationen des *MYH6* Gens mit der Entwicklung einer dilatativen oder hypertrophen Kardiomyopathie assoziiert (Carniel et al. 2005). Die Verringerung der *Myh6* Genexpression in den HL-1 Kardiomyozyten, sowie in den Herzen der septischen WT Mäuse könnte Ausdruck einer Veränderung der Zusammensetzung der Myosinisoformen und somit ein Hinweis auf die Ausbildung einer kardialen Dysfunktion sein. Die Reduktion der *Myh6* Genexpression führt kompensatorisch zur vermehrten Expression des *Myh7* Gens und einem Anstieg der β -MyHC Proteine (Mercadier et al. 1981; Izumo et al. 1987). Den Einfluss eines Anstieges der β -MyHC Proteine haben Tardiff et al. durch Verwendung von transgenen β -MyHC Mäusen untersucht und festgestellt, dass ein β -MyHC Anstieg zu einer verminderten systolischen Funktion (-15 %) führt (Tardiff et al. 2000). Zudem führen Mutationen im *MYH7* Gen zu einer hypertrophen Kardiomyopathie beim Menschen (Geisterfer-Lowrance et al. 1990; Richard et al. 2003).

Dennoch war bei unserer Untersuchung in HL-1 Kardiomyozyten 24 Stunden nach IL-6 Behandlung eine Reduktion der *Myh7* Genexpression nachweisbar. Eine Verringerung der *Myh7* Genexpression wird in der Literatur jedoch selten beschrieben oder diskutiert. Die Auswirkungen der herabgesetzten Bildung bzw. Verfügbarkeit der Proteine α - und β -MyHC sind in Studien analysiert worden. Ein Knockdown von *Myh7* während der frühen Herzentwicklung von Hühnern führte zu einem vergrößerten Herz bei unauffälliger Herzstruktur (England and Loughna 2013). Zudem konnte gezeigt werden, dass der Knockdown von *Myh7* zu verringerten Ca^{2+} Transienten in Kardiomyozyten führt (Rutland et al. 2011). Außerdem wurde gezeigt, dass Veränderungen der Myosin Zusammensetzung zu einer dominierenden β -MyHC Form im Herzen von Mäusen zu einer verringerten myokardialen Kontraktion führen (Chandra et al. 2007).

Zur weiteren Untersuchung der reduzierten Expression der Myosinisoformen wären Western Blot Analysen der Myosine und eine histologische Darstellung und lichtmikroskopische bzw. elektronenmikroskopische Analyse der Herzmuskelfasern erforderlich.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass ein Zusammenhang zwischen der IL-6-Wirkung und der *Myh6* und *Myh7* Genexpression besteht und dass ein Kardiomyozyten-spezifischer *gp130* cKO in der Sepsis die Effekte einer kardialen Dysfunktion vermindert.

5.6 Die *in vitro* und *in vivo* Genexpression von *Nppb*

Das B-Typ natriuretische Peptid (BNP), welches vom *Nppb* Gen codiert wird, gehört zu den wichtigsten klinisch-kardiologischen Biomarkern. BNP wird zum einen als Biomarker in der Diagnostik einer Herzinsuffizienz verwendet (Gaggin and Januzzi 2013) und ist zum anderen mit der Schwere und Prognose eines Sepsis assoziiert (Charpentier et al. 2004; Klouche et al. 2014). Hierbei kann die *Nppb* Expression durch Dehnung des Herzgewebes, Endothelin-1 oder Angiotensin II gesteigert werden (Bruneau et al. 1997; Wiese et al. 2000). Tanaka et al. konnten zeigen, dass IL-6 die Expression von *Nppb* in ARVM induziert (Tanaka et al. 2004). Dies konnte von uns in HL-1 Kardiomyozyten bestätigt werden (vgl. Abbildung 15A). Weiterhin können wir zeigen, dass diese Effekte vom *gp130* Rezeptor vermittelt werden (Abbildung 17). Da eine Steigerung der *Nppb* Genexpression mit kardialem Stress assoziiert ist (Sergeeva et al. 2014), haben wir diese in den Herzen von septischen Tieren quantifiziert. Wir fanden eine signifikante Erhöhung der *Nppb* Expression in den Herzen der septischen WT, aber nicht der septischen cKO Mäuse (vgl. Abbildung 23A). In Zusammenschau mit unseren echokardiographischen Daten (vgl. Kapitel 5.7) kann dies als ein Hinweis auf eine verringerte Ausprägung einer septischen Kardiomyopathie in den septischen cKO Mäusen interpretiert werden. Unsere tierexperimentellen Daten bestätigen die Befunde von Matkovich et al., dessen Gruppe in septischen Herzen von verstorbenen Patienten einen Anstieg der *Nppb* Genexpression ermittelt hat (Matkovich et al. 2017). In septischen Patienten mit Kardiomyopathie wurden signifikant höhere BNP Serumspiegel als in septischen Patienten ohne kardiale Dysfunktion beobachtet (Klouche et al. 2014). In der hier vorliegenden Arbeit können wir erstmalig zeigen, dass die Sepsis-induzierte *Nppb* Genexpression vom *gp130* Rezeptor vermittelt wird.

5.7 Die Sepsis-induzierten Kardiomyopathie ist gp130 abhängig

Nach Parker et al. bilden vor allem funktionelle Veränderungen des Herzens die Definitionsgrundlage der Sepsis-induzierten Kardiomyopathie (Parker et al. 1984). IL-6 ist einer der Hauptfaktoren einer systemischen Entzündungsreaktion. In dieser Arbeit wurde vor Beginn des Tierversuchs und 24 Stunden nach Sham oder CLP-Operation die Herzfunktion der Versuchstiere mittels Echokardiographie untersucht. WT und cKO Tiere zeigten eine vergleichbare Herzfunktion, bezogen auf LVEF, Schlagvolumen und FS (Vollständige Daten im Anhang tabellarisch dargestellt). Allerdings war das Herzzeitvolumen in den cKO Mäusen vor Versuchsbeginn signifikant reduziert. Die zur Berechnung des Herzzeitvolumens führenden Faktoren, Herzfrequenz und Schlagvolumen, wiesen jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den WT und cKO Mäusen auf. Die Ursache des signifikanten Unterschiedes des Herzzeitvolumens lässt sich daher schwer erschließen und ist am ehesten als artifiziell zu betrachten. Ein Unterschied des Herzzeitvolumens konnte zwischen beiden Gruppen 24 Stunden nach der Sham-Operation nicht mehr festgestellt werden.

Diese Ergebnisse werden durch die Arbeit von Hirota et al. bestätigt, dessen Arbeitsgruppe 1999 eine normale Herzfunktion von Kardiomyozyten-spezifischen *gp130* cKO Mäusen nachweisen konnte (Hirota et al. 1999). In unserer Studie konnten wir nachweisen, dass das CLP-Model dazu geeignet ist eine septische Kardiomyopathie bzw. eine Sepsis-induzierte Reduktion der Herzfunktion zu induzieren. Im speziellen führte die CLP-Operation zu einer signifikanten Reduktion der LVEF, des Herzschlagvolumens (SV), des Herzzeitminutenvolumens (HMV) und der Verkürzungsfraktion (FS) der CLP-operierten WT Mäuse im Vergleich zu den Sham-operierten WT Mäusen (vgl. Abbildung 21). An diesem Phänotypen könnten die zirkulierenden, kardiodepressiven Zytokine, wie IL-1 β , TNF und IL-6 beteiligt sein, die in der Sepsis stark erhöht sind (Pathan et al. 2011; Parrillo et al. 1985; Kumar et al. 1996; Pathan et al. 2004). Die oben genannten echokardiographischen Parameter waren zwischen Sham- und CLP-operierten cKO Mäusen nicht unterschiedlich. Der Vergleich zwischen den WT Mäusen und den cKO Mäusen lässt somit Rückschlüsse auf eine teilweise durch den gp130 Rezeptor bedingte kardiale Dysfunktion innerhalb der ersten 24 Stunden zu. Landesberg et al. konnten jedoch in einer Studie von 2015 keine signifikante Korrelation zwischen den Serumspiegeln verschiedener Zytokine

und der kardialen Funktion septischer Patienten nachweisen (Landesberg et al. 2015). Daher wird vermutet, dass kardiodepressive Zytokine die Herzfunktion nur kurzzeitig hemmen (Lv and Wang 2016). Neben Kardiomyozyten besteht das Herzgewebe u.a. aus kardialen Fibroblasten und Endothelzellen. Tomita et al. erbrachten *in vitro* und *in vivo* den Nachweis, dass kardiale Fibroblasten an der Ausbildung einer kardialen Dysfunktion, die sie durch eine im CLP Sepsis Modell reduzierte LVEF und FS, sowie eine Zunahme der myokardialen Fibrose nachwiesen, beteiligt sind (Tomita et al. 2015). Außerdem konnte gezeigt werden, dass transgenetische Mäuse, die einen NF- κ B-Inhibitor selektiv im Endothel überexprimieren, vor einer CLP-induzierten Kardiomyopathie geschützt sind (Ye et al. 2008). Somit ist die Wirkung kardiodepressiver Zytokine auf Kardiomyozyten nicht allein für das Auftreten einer Sepsis-induzierten Kardiomyopathie verantwortlich. Die Aktivierung von kardialen Fibroblasten oder Endothelzellen kann ebenfalls zu einer kardialen Dysfunktion führen. Diese Arbeit zeigt, dass der gp130-Signalweg eine Rolle in der frühen Phase der Sepsis-induzierten Kardiomyopathie spielt. Dennoch gibt es Hinweise, dass andere, in dieser Arbeit nicht untersuchte Signalwege oder Zellen, die kardiale Dysfunktion unterhalten oder anregen. Die protektiven Effekte sind innerhalb der ersten 24 Stunden gp130-abhängig. Inwiefern die Verschlechterung der kardialen Funktion allein auf IL-6 zurückgeführt werden kann, oder ob andere Zytokine der IL-6 Zytokinfamilie wie CT-1, LIF etc. ebenfalls eine Rolle dabei spielen, lässt sich aus unseren Daten nicht schlussfolgern. Um den Stellenwert von IL-6 sicher beurteilen zu können, wäre ein Kardiomyozyten-spezifischer Knockout einzelner Komponenten des IL-6 Signalwegs, wie JAK2 oder STAT3 oder die Verwendung eines IL-6 Antikörpers, wie Tocilizumab notwendig.

Weiterhin ist eine Wiederholung der echokardiographischen Untersuchung mit einer erhöhten Versuchstieranzahl notwendig, da in der Sham-WT-Gruppe eines der Versuchstiere einen signifikanten Abfall der Ejektionsfraktion zeigte. Diesen Abfall der Ejektionsfraktion, führten wir auf eine mutmaßliche Infektion durch eine eventuelle Wundheilungsstörung oder akzidentelle Verletzung des Darmes während der Sham Operation zurück.

5.8 Die mitochondriale Dysfunktion der Kardiomyozyten ist in der Sepsis-induzierten Kardiomyopathie vom gp130 Rezeptor abhängig

Der Einfluss von IL-6 und einer Sepsis auf die Expression mitochondrialer Gene wurde *in vitro* in IL-6 bzw. Vehikel-behandelten HL-1 Kardiomyozyten und *in vivo* in Herzen von Sham- und CLP-operierten WT und *gp130* cKO Mäusen untersucht. Zur Quantifikation von funktionellen Einschränkungen der Atmungskette und insbesondere ob septische cKO Mäuse vor mitochondrialen Funktionseinschränkungen geschützt sind, wurden Herzmuskelfasern von Sham- und CLP-operierten WT und cKO Mäusen isoliert und die Funktion der Atmungskette mittels Oroboros Oxygraph -2K gemessen. Hierbei wurde der Sauerstoffverbrauch bzw. die Sauerstoffdurchflussrate quantifiziert.

Zwischen den Herzmuskelfasern der Sham-operierten WT und Sham-operierten cKO Mäusen zeigten sich signifikante Unterschiede der Sauerstoffdurchflussraten (vgl. Abbildung 24A). In den Herzmuskelfasern der septischen WT Mäusen konnte ein Abfall der Sauerstoffdurchflussrate auf den gleichen numerischen Zahlenbereich gemessen werden, wie er bei den Sham-operierten cKO Mäusen gemessen werden konnte. Die Ursache dieses zwischen beiden Sham Gruppe signifikant existierenden Unterschiedes der Sauerstoffdurchflussraten konnte nicht geklärt werden. In einer Literaturrecherche ließen sich diesbezüglich auch keine Oroboros Daten von *gp130* cKO Mäusen für einen Vergleich mit unseren Daten auffinden. Zur Durchführung einer Oroboros Messung wird in die Messkammer ein definiertes Gewicht an Herzmuskelfasern eingesetzt. Eine verringerte Anzahl von Mitochondrien in diesen Herzfasern könnte eine mögliche Ursache der unterschiedlichen Sauerstoffdurchflussraten darstellen. So könnten cKO Herzen weniger Mitochondrien aufweisen, die zu einem reduzierten Sauerstoffverbrauch und einer geringen Sauerstoffdurchflussrate führen könnten. Als Beweis dieser Hypothese müsste die Anzahl der Mitochondrien in WT und cKO Herzen quantifiziert werden. Dies ist im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgt. Durch Konfokal- oder Transelektronenmikroskopie könnte die Anzahl numerisch erfasst oder mittels Citratsynthase-Aktivität der mitochondriale Gehalt der jeweiligen Herzen bestimmt werden. Aufgrund der unterschiedlichen Sauerstoffdurchflussraten der Sham Tieren beider Genotypen ließ sich keine statistische Analyse zwischen den CLP-operierten Mäuse beider Gruppen, sondern nur innerhalb des jeweiligen Genotyps durchführen.

In den septischen WT Herzen zeigten sich nach Gabe von Octanoylcarnitin (F_p -Stadium) und additiv Malat, Pyruvat und Glutamat (FN_p -Stadium), Succinat (FNS_p -Stadium), Glycerolphosphat ($FNSGP_p$ -Stadium) eine jeweils signifikant verringerte Sauerstoffdurchflussrate verglichen mit denen der WT Sham Herzen (vgl. Abbildung 24C). Aufgrund der additiven Gabe der Substrate lässt sich schwer der einzelne Einfluss des Komplexes II und des Glycerolphosphat-Dehydrogenase Komplexes (CGpDH) ermitteln, sodass die Gabe von Rotenon zur Inhibition des Komplexes I erfolgte (SGp_E -Stadium). Hier zeigte sich ebenfalls eine signifikant verringerte Sauerstoffdurchflussrate.

Die Sauerstoffdurchflussrate wird durch den Komplex IV beeinflusst. Eine verringerte Sauerstoffdurchflussrate kann zum einen auf einen Defekt des Komplexes IV oder zum anderen auf ein verringertes Elektronenangebot zurückgeführt werden. Wir können hier nachweisen, dass kein Defekt des Komplexes IV vorliegt (vgl. Abbildung 24B). Die Sauerstoffdurchflussraten sind innerhalb der WT und cKO Tiere nicht signifikant verändert und damit von einer vergleichbaren Funktionsfähigkeit des Komplexes IV auszugehen.

Eine verringerte Sauerstoffdurchflussrate ist somit als Folge einer reduzierten Funktion der Komplexe I und II der Atmungskette zu interpretieren. Trotz einer optimalen, externen Substrat- und Sauerstoffzufuhr können die Komplexe der septischen WT Herzen dieses Angebot nicht ausreichend verstoffwechseln und Elektronen über Cytochrom C für die Funktion des Komplexes IV übertragen.

Unsere erhobenen Daten können somit in septische WT Herzen eine mitochondriale Dysfunktion der Kombination des elektronentransferierenden Flavoproteinkomplexes (F_p -Stadium), des Komplexes I (FN_p -Stadium), des Komplexes II (FNS_p -Stadium) und des Glycerolphosphat-Dehydrogenase Komplexes ($FNSGP_p$ -Stadium) aufzeigen.

Innerhalb der cKO Tiere konnten wir durch die Induktion einer Sepsis keinen signifikanten Unterschied der Stadien nachweisen. Diese Tiere wiesen keine mitochondriale Dysfunktion auf.

Die Hauptfunktion der Komplexe besteht in der Ausbildung eines elektrochemischen Gradienten, der durch den Komplex V zur Synthese von ATP verwendet wird. Eine reduzierte Funktion der Komplexe lässt somit indirekt auf eine verringerte ATP Produktion und ATP Menge schließen. Eine Verringerung der ATP Produktion im Rahmen einer mitochondrialen Dysfunktion wäre für das Herz fatal, da es im

Normalzustand 95 % des ATP über die oxidative Phosphorylierung bezieht, welches zu 60-90 % aus Fettsäuren bereitgestellt wird. Das ATP wird im Herzen für die Aufrechterhaltung der Kontraktilität, Transportprozessen und der Funktion von Kanälen, wie dem Sarkoplasmatischen Retikulum oder der Natrium-Kalium-Pumpe verwendet (Wasyluk et al. 2021). Eine verringerte ATP Bereitstellung stellt somit eine große Gefahr für die Aufrechterhaltung der Herzfunktion dar. Anhand unserer Daten lässt sich eine verringerte ATP Produktion anhand der verringerten Sauerstoffdurchflussrate nur vermuten. Eine Quantifizierung des in den Muskelfasern der Sham und CLP Gruppe gebildeten ATPs erfolgte in dieser Arbeit nicht.

Neben der verringerten ATP-Produktion als Folge einer septischen, mitochondrialen Dysfunktion, die wir mit unseren Daten indirekt belegen können, ändert sich auch die Bereitstellung der Energie während einer Sepsis. Der Anteil der Fettsäuren nimmt während der Sepsis massiv ab und wird durch Laktat ersetzt (Wasyluk et al. 2021). In unserem experimentellen Setting führten wir bei den Oroboros Messungen den extrahierten Herzmuskelfasern ausreichende Substrate (u.a Fettsäure) von extern zu. Eine Veränderung der Energiebereitstellung, welche eine zusätzliche Ursache einer verringerten ATP Produktion sein kann, können wir hiermit nicht belegen.

Mittels Oroboros lassen sich in unserem verwendeten *Suit 02* Protokoll nur Aussagen über die Funktion von Komplexkombinationen tätigen. Zur Beurteilung jeder einzelnen Funktion der Komplexe müssten weitere Analyse mittels spektrophotometrischen Untersuchungen angeschlossen werden.

Unsere Beobachtungen werden durch vorherige Studien bestätigt. Gellerich et al. führten Messungen der Atmungskettenfunktion in Herzen von Hasen, bei denen ein toxischer Schock durch LPS ausgelöst wurde, durch und fanden eine verringerte Aktivität von Komplex I und Komplex III. Eine Induktion von Sepsis durch *E.coli* in Pavianen konnte durch spektrophotometrische Messungen eine Dosis-abhängige Reduktion der Enzymaktivität von Komplex I und III gemeinsam, sowie II und III gemeinsam nachweisen (Gellerich et al. 2002). In permeabilisierten Herzmuskelfasern von Mäusen konnte 24 Stunden nach CLP-Operation eine signifikante Reduktion der Sauerstoffdurchflussrate von Komplex I und Komplex II gemessen werden (Doerrier et al. 2016). In einem Literatur-Review, dass *in vivo* Arbeiten, die zwischen 1964 und 2012 publiziert wurden und die mitochondriale Funktion während einer Sepsis zum Thema hatten, konnten Jeger et al. feststellen, dass im Herzmuskel eine verringerte

Komplex I-abhängige Atmung vorliegt. Weiterhin legten sie dar, dass High Resolution Respirometrie-Messungen nur in 21 % der Arbeiten und die Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs, bezogen auf das Gewicht des Gewebes nur in 16 % der Arbeiten als Methode verwendet wurden (Jeger et al. 2013). Die Vergleichbarkeit unserer Arbeit mit Daten aus der Literatur ist daher nur eingeschränkt möglich. Die verschiedenen Methoden und unterschiedlichen Protokolle von den verschiedenen Möglichkeiten einer Induktion einer Sepsis bis hin zur differierenden Bestimmung der mitochondrialen Funktion führen zu variablen Aussagen und erschweren die Interpretation von Ergebnissen (Kohoutová et al. 2018).

Zwischen den Sauerstoffdurchflussraten der Herzen von cKO Sham und cKO CLP Mäusen bestand kein signifikanter Unterschied. Daraus schlussfolgern wir, dass die durch eine Sepsis-induzierte mitochondriale Dysfunktion gp130-abhängig ist und somit zum Teil den Zytokinen der IL-6 Familie zugeschrieben werden kann.

Unserem Wissen nach ist diese Arbeit die Einzige, die einen Zusammenhang zwischen einer mitochondrialen Dysfunktion und dem IL-6 Rezeptor gp130 in der Sepsis zeigt.

Nachdem eine gp130-abhängige mitochondriale Dysfunktion in den Herzen der septische WT Mäuse nachgewiesen werden konnte, wurde die Expression von Genen der Biogenese, der Fusion, der Fission und der Mitophagie von Mitochondrien quantifiziert. Die zentrale Frage war, ob eine veränderte Genexpression einen Erklärungsansatz für die Entstehung einer mitochondrialen Dysfunktion liefern kann und ob diese Effekte gp130-abhängig sind.

Hierbei ist vorher anzumerken, dass vergleichende Studien, die im CLP Sepsis Modell die Herzen von WT und *gp130* KO Mäusen hinsichtlich der mitochondrialen Genexpression und Funktion untersuchen, zum Zeitpunkt dieser Arbeit -nach besten Gewissen- nicht existieren. Aufgrund dessen werden zum Teil die Daten dieser Arbeit mit Daten aus LPS-Modellen diskutiert. Das LPS-Modell wurde früher als Sepsis Modell betrachtet, ist jedoch nach neustem wissenschaftlichem Stand keine Sepsis im engeren Sinne, sondern Auslöser eines toxisches Schocksyndroms. Das toxische Schocksyndrom führt im Vergleich zum CLP Sepsis Modell zu einem früheren und stärkeren Anstieg der Zytokinspiegel (Lewis et al. 2016).

PGC-1 α spielt eine zentrale Bedeutung in der Steuerung des kardialen Stoffwechsels und der kardialen Funktion (Russell et al. 2004; Rowe et al. 2010; Schilling and Kelly 2011). So sterben *Ppargc1a* und *Ppargc1b* KO Mäuse innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt an Herzversagen (Lai et al. 2008). Arany et al. konnten zeigen, dass *Ppargc1a* KO Mäuse eine verringerte Herzfunktion aufwiesen und einen geringeren Anstieg der Herzfrequenz als Reaktion auf die Gabe von Dobutamin, einem synthetischen β 1-Rezeptor-selektiven Katecholamin aufwiesen (Arany et al. 2006; Arany et al. 2005). Ebenfalls wurde berichtet, dass die *Ppargc1a* Genexpression und das Auftreten kardialer Erkrankungen, wie Kardiomyopathien, miteinander assoziiert sind (Übersichtsarbeit Di et al. 2018). Schilling et al. konnten zeigen, dass es im LPS-induzierten toxischen Schock zu einer Verringerung der *Ppargc1a* und *Ppargc1b* Genexpression in Kardiomyozyten von Mäusen kommt. Interessanter Weise konnte die Überexpression von *Ppargc1b* vor einer LPS-induzierten Kardiomyopathie schützen (Schilling et al. 2011).

Unserer Daten zeigen, dass IL-6 *in vitro* (vgl. Abbildung 15B) oder eine CLP-induzierte Sepsis *in vivo* (vgl. Abbildung 17D) zu einer gp130-abhängigen Herunterregulierung der kardialen *Ppargc1a* Genexpression führt, die in der Literatur mit einer kardialen Dysfunktion in Zusammenhang gebracht wurde.

Neben der mitochondrialen Biogenese, die durch *Ppargc1a* vermittelt wird, spielen auch die Prozesse der mitochondrialen Fusion und Fission eine zentrale Rolle in der Ausbildung von kardialen Erkrankungen. Sabbah et al. wiesen im Tierversuch eine Veränderung der Dynamik zwischen Fusion- und Fissionsproteinen in Herzen von Hunden und in Herzen von Patienten mit einer chronischer Herzinsuffizienz nach (Sabbah et al. 2018).

Die mitochondriale Fusion wird von MFN1, MFN2 und OPA1 induziert und eine verringerte Genexpression ist mit einer mitochondrialen Fragmentierung verbunden (Zhang and Chan 2007). Die Expression von *Mfn1* und *Mfn2* wird durch PGC-1 α und PGC-1 β induziert (Chandhok et al. 2018; Martin et al. 2014). Wir konnten eine signifikante Reduktion von *Mfn1* und *Mfn2* in den Herzen der septischen WT Mäuse, jedoch nicht in den Herzen der septischen cKO Mäuse nachweisen. In der Literatur konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass die Genexpression von *Mfn1* und *Mfn2* mit kardialen Funktionsstörungen assoziiert sind. So führte die Deletion von *Mfn1*

und/oder *Mfn2* zu einer dilatativen Kardiomyopathie und einer frühen postnatalen Letalität in Mäusen (Chen et al. 2011; Papanicolaou et al. 2012). Auf mitochondrialer Ebene führte ein Kardiomyozyten-spezifischer KO von *Mfn2* zu einer Hypertrophie der Mitochondrien und verringerter mitochondrialer Funktion, die sich als Folge einer Dekondensation der mitochondrialen Matrix und einem Verlust der mitochondrialen Struktur präsentierte (Papanicolaou et al. 2011). Übereinstimmende Ergebnisse zu unserer Arbeit konnten durch Gonzalez et al. gezeigt werden. Die Arbeitsgruppe wies ebenfalls eine Reduktion der *Mfn2* Genexpression 12 bis 18 Stunden nach CLP-Operation nach und brachte diese weiterführend mit einer mitochondriale Fragmentierung in Verbindung (Gonzalez et al. 2014).

Unsere Daten zeigen eine vom gp130-Rezeptor abhängige Herunterregulierung von Fusion-steuernden Genen, hier *Mfn1* und *Mfn2*, die möglicherweise die Folge einer reduzierten *Ppargc1a* Expression ist und deren Herunterregulierung in der Literatur mit einer mitochondrialen und kardialen Dysfunktion assoziiert wurde.

Die Fission von Mitochondrien ist in Kardiomyozyten notwendig, um defekte Mitochondrien per Autophagie, sog. Mitophagie, abzubauen (Twig et al. 2008). Die *Drp1* Genexpression war in den Herzen der septischen WT, aber nicht in denen der cKO Mäuse reduziert. Bei einer Reduktion der mitochondrialen Fusionsgene, *Mfn1* und *Mfn2*, ist im Rahmen eines dynamischen Geschehens eine Hochregulierung, der für die Fission zuständigen Gene zu erwarten (Sabbah et al. 2018; Sabbah 2020). Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit keine kompensatorische Hochregulierung, sondern eine Herunterregulierung der *Drp1* Expression in den Herzen der septischen WT Mäuse nachgewiesen werden. *In vitro* Experimente in HeLa Zellen zeigten, dass eine Reduktion von *Drp1* durch *small hairpin RNA* (shRNA) einen Verlust von mitochondrialer DNA und eine Reduktion der mitochondrialen Respiration auslöst, was auf eine mitochondriale Dysfunktion hinweist. *In vivo* konnte in Herzen von Mäusen gezeigt werden, dass eine Keimbahndeletion von *Drp1* Mitophagie verhindert und zu einer mitochondrialen Dysfunktion führt, die aufgrund einer verringerten ATP Produktion als Folge einer verringerte Aktivität der Komplexe I-IV resultiert. Dieser Phänotyp war mit einer sich innerhalb von vier Wochen entwickelnden linksventrikulären Hypertrophie und linksventrikulären Dysfunktion assoziiert, die nach 13 Wochen zum Versterben aller Tiere führte. (Ikeda et al. 2015). Im TAC-Modell wurde nachgewiesen, dass die Haploinsuffizienz von *Drp1* Mitophagie hemmt und zu

einer verstärkten mitochondrialen Dysfunktion (verringerte ATP Produktion) mit verstärktem Herzversagen führt (Shirakabe et al. 2016). Die in unserer Arbeit nachgewiesene Herunterregulierung der *Drp1* Expression in den Herzen der septischen WT Mäuse könnte somit ein Anzeichen einer mitochondrialen Dysfunktion sein. Die unveränderte *Drp1* Genexpression in den Herzen der septischen cKO Mäuse impliziert, dass dessen Reduktion vom gp130-Rezeptor abhängig ist. Dies konnte von Fix et al. durch Verwendung von *gp130* siRNA in Skelettmuskelzellen bestätigt werden (Fix et al. 2019).

Die Daten in der hier vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass eine CLP-induzierte Sepsis zu einer vom gp130-Rezeptor abhängigen Störung der Fission von Mitochondrien im Herzen führt und diese infolge Ursache einer mitochondrialen Dysfunktion sein könnten.

Dysfunktionale Mitochondrien werden durch Mitophagie abgebaut (Twig et al. 2008). Mehrere Studien haben gezeigt, dass sich die kardiale Autophagie dynamisch mit der Schwere der Sepsis verändert. Sun et al. zeigten im LPS-Tiermodell, dass der Prozess der Autophagie mit steigender LPS-Dosis abnimmt (Sun et al. 2018). In Hepatozyten konnte in der frühen Phase einer CLP-induzierten Sepsis ein Anstieg der Autophagie gemessen werden, welche dann aber bei voranschreitendem Organversagen in der Endphase der Sepsis stagnierte (Chien et al. 2011; Takahashi et al. 2013). Weiterhin konnten Busch et al. zeigen, dass Autophagie Prozesse in Kardiomyozyten von septischen Mäusen induziert werden (Busch et al. 2021). Über das Gen *Beclin1* wird die Initiierung des Autophagieprozesses gesteuert (Liang et al. 1999). In kardialen Myozyten zeigten Zhu et al., dass hämodynamischer Stress zu Autophagie führt, die Haploinsuffizienz von *Beclin1* die Autophagieprozesse reduziert und eine Überexprimierung von *Beclin1* sie wiederum verstärkt (Zhu et al. 2007). Der Schutz von kardialen Mitochondrien und die Initiierung des Abbaus von defekten Mitochondrien wird unter anderem von *Beclin1* gesteuert (Sun et al. 2018; Sun et al. 2019). Wir fanden eine gesteigerte Expression von *Beclin1* in den Herzen von septischen WT Mäusen vor, was auf einen beginnenden Abbau von Mitochondrien hindeuten könnte. Die unveränderte *Beclin1* Genexpression in den Herzen der septischen cKO Mäuse kann als Hinweis auf die protektive Funktion des *gp130* cKO interpretiert werden.

Zusammenfassend können die diskutierten Daten zeigen, dass eine CLP-induzierte Sepsis eine gp130-abhängige mitochondriale Dysfunktion, die sich durch signifikant reduzierte Sauerstoffdurchflussraten präsentierte, in Kardiomyozyten induzierte. Auf Genexpressionsebene führte eine Sepsis zur Reduktion der Expression von zentralen Akteuren der mitochondrialen Funktion. Diese Reduktion konnte in septischen Mäusen durch einen *gp130* cKO verhindert werden.

Inwiefern diese Genexpressionen die zentrale Ursache der -mittels Oroboros Oxygraph -2K- festgestellten mitochondrialen Dysfunktion sind, kann hier nicht bewiesen werden. Die Signalkaskaden sind bis auf einen Zusammenhang zwischen *Mfn1* und *Mfn2* und *Ppargc1a* und *Ppargc1b* nicht ausführlich beschrieben. Vor dem Hintergrund der zuvor genannten und diskutierten Literatur ist eine Verbindung zwischen unseren Expressionsdaten und der nachgewiesenen mitochondrialen Dysfunktion als wahrscheinlich anzusehen.

Um diese Verbindung zu belegen, müssten zusätzlich Proteine, der zuvor besprochenen Gene mittels Western Blot quantifiziert und weitere Analysen von möglichen Signalkaskaden durchgeführt werden. Diese Analysen sollten auch an verschiedenen Zeitpunkten der Sepsis erfolgen. Eine Veränderung der Genexpression nach 24 Stunden könnte möglicherweise zu einem späteren Zeitpunkt zu einer relevanten und signifikanten Veränderung auf Proteinebene führen. Weiterhin sollten auch fraktionierte Western-Blots zur Lokalisation in subzellulären Kompartimenten durchgeführt werden.

Außerdem wurden strukturelle Veränderungen der Mitochondrien vermutet, die auch zum Teil in der zuvor aufgeführten Literatur beschrieben wurden. Die Feststellung von strukturellen, mitochondrialen Defekten erfordert elektronenmikroskopische Untersuchungen, die in dieser Arbeit nicht durchgeführt wurden.

5.9 Limitationen

Die Pathogenese der septischen Kardiomyopathie ist vielfältig und aufgrund der komplexen Interaktionen von Zytokinen und ihre Wirkung auf verschiedene Strukturen und Organe sind *in vitro* Daten nur als hinweisgebend zu betrachten. Zur weiteren Untersuchung des Einflusses, des durch IL-6 aktivierten gp130 Rezeptors wurde eine Sepsis in Versuchstieren induziert. Die Induktion einer Sepsis im Versuchstier ist auf drei Wegen möglich: Historisch verwendete LPS-Gabe, die heutzutage eher als

toxisches Schocksyndrom gesehen wird, Verabreichen von Bakterien oder Viren, sowie die operative Aufhebung von natürlichen Schutzbarrieren durch Verwendung einer zökalen Ligatur und Punktion oder einer Colon ascendens Stent Peritonitis (CASP). Die hier gezeigten *in vivo* Daten wurden durch Verwendung einer CLP-induzierten Sepsis erhoben. Die CLP-induzierte Sepsis wurde vor 40 Jahren etabliert (Wichterman et al. 1980) und gilt seitdem als Goldstandard für die Induktion einer Sepsis im Tiermodell, die am ehesten das septische Geschehen im Menschen widerspiegelt (Rittirsch et al. 2009a; Dejager et al. 2011). Trotzdem wird auch die CLP-induzierte Sepsis für ihre Unterschiede zur Sepsis des Menschen kritisiert. Das Mikrobiom des Versuchstiers -was bei der CLP über die Entwicklung einer Peritonitis als Auslöser der Sepsis gilt- ähnelt nicht dem Mikrobiom des Menschen und weist somit ein abweichendes Erregerspektrum auf. Zudem ist die Ernährung von Versuchstieren und Patienten auf der Intensivstation unterschiedlich und die bei einer Sepsis sofort eingeleitete medikamentöse, antibiotische Therapie der Patienten wird nicht auf die Versuchstiere übertragen (Alverdy et al. 2020; Dejager et al. 2011). Weiterhin sind auch das Alter der Versuchstiere und das Alter, der von einer Sepsis betroffenen Patienten unterschiedlich. Turnbull et al. zeigten, dass ältere Mäuse mit einem Alter von 2 Jahren einen signifikanten Mortalitätsunterschied zu 4 Monate alten Mäusen aufwiesen. Zudem wurde in älteren Mäusen ein höherer IL-6 Spiegel im Vergleich zu den jüngeren Mäusen gemessen (Turnbull et al. 2003). Neben dem Alter scheint auch das Geschlecht der eingesetzten Versuchstiere eine Rolle zu spielen. Weibliche Mäuse zeigten nach CLP-Operation ein signifikant höheres Überleben, außerdem konnte eine unterschiedliche Immunantwort nachgewiesen werden (Zellweger et al. 1997). Eine Diversität der Versuchstiere hinsichtlich Alter und Geschlecht, sowie eine Anpassung von Ernährung und Therapie nach CLP-induzierten Sepsis wären somit zukünftig zu beachten und könnten die Aussagekraft der Arbeit erhöhen.

In der *gp130* WT Sham Gruppe zeigte eine Maus 24 Stunden nach Sham-Operation einen Abfall der kardialen Funktion. Diese Verringerung der echokardiologischen Parameter wie der Ejektionsfraktion glich nach 24 Stunden den Veränderungen in den septischen Mäusen, sodass diese Maus nicht als ein Kontrolltier der Sham-Gruppe betrachtet werden kann. Bei der Durchführung der Sham-Operation könnte es zu einer Verletzung des Darms durch die Laparotomie oder durch die Naht gekommen sein, die zu einem infektiösen oder septischen Geschehen geführt haben könnte. Diese

Maus wurde daher aus der *gp130* WT Sham-Gruppe entfernt und somit nicht in die Darstellung und statistische Auswertung miteinbezogen. Dadurch reduziert sich die Anzahl der *gp130* WT Sham Mäuse von drei Mäusen auf zwei Mäuse.

Anhang

Tabelle 17: Echokardiographische Parameter vor der Operation (Baseline)

Parameter	<i>gp130</i> WT Sham n=3	<i>gp130</i> WT CLP n=9	<i>gp130</i> cKO Sham n=3	<i>gp130</i> cKO CLP n=12
HR [bpm]	492,9 ± 28,06	490,6 ± 16,43	495,7 ± 33,65	461,8 ± 14,95
Diameter s	3,55 ± 0,12	3,341 ± 0,04	2,98 ± 0,05	3,305 ± 0,07
Diameter d	4,88 ± 0,09	4,692 ± 0,04	4,241 ± 0,06	4,62 ± 0,08
LV-Volumen s	52,89 ± 4,15	45,67 ± 1,47	34,51 ± 1,43	44,72 ± 2,10
LV-Volumen d	112,00 ± 5,03	102,1 ± 2,40	80,55 ± 2,72	98,9 ± 4,05
SV [μl]	59,12 ± 1,32	56,46 ± 1,52	46,03 ± 3,62	54,19 ± 2,13
EF [%]	52,93 ± 1,32	55,3 ± 0,86	57 ± 2,76	54,89 ± 0,65
FS [%]	27,31 ± 1,11	28,79 ± 0,58	29,7 ± 1,86	28,47 ± 0,43
CO [ml/min]	29,21 ± 2,33	27,68 ± 1,13	22,62 ± 1,02	24,94 ± 1,17
LV Mass [mg]	101,1 ± 0,87	101,1 ± 0,64	95,62 ± 2,00	99,8 ± 0,54
LV Mass Cor [mg]	80,84 ± 0,70	80,87 ± 0,51	76,5 ± 1,60	79,84 ± 0,43
LVAW s [mm]	1,09 ± 0,04	0,9308 ± 0,04	1,147 ± 0,03	0,9275 ± 0,05
LVAW d [mm]	0,48 ± 0,03	0,5279 ± 0,02	0,605 ± 0,03	0,5331 ± 0,02
LVPW s [mm]	0,92 ± 0,03	0,9213 ± 0,03	0,9714 ± 0,03	0,9089 ± 0,03
LVPW d [mm]	0,6051 ± 0,01	0,6225 ± 0,02	0,6618 ± 0,05	0,6341 ± 0,02
A'	-18,91 ± 1,18	-23,5 ± 1,07	-16,28 ± 3,54	-21,72 ± 0,68
E'	-25,99 ± 1,96	-31,06 ± 2,14	-23,02 ± 1,93	-27,71 ± 2,08
MV A [mm/s]	406,4 ± 14,49	427 ± 25,46	415 ± 63,82	449,3 ± 16,05
MV E [mm/s]	622,4 ± 19,35	635,5 ± 24,53	636,6 ± 40,99	602,8 ± 26,8
A'/E'	0,74 ± 0,09	0,7721 ± 0,04	0,691 ± 0,10	0,8227 ± 0,05
E'/A'	1,394 ± 0,18	1,32 ± 0,06	1,52 ± 0,25	1,281 ± 0,09
MV E/A	1,533 ± 0,03	1,511 ± 0,06	1,573 ± 0,13	1,355 ± 0,06
MV E/E'	-24,35 ± 2,71	-20,99 ± 1,16	-28,07 ± 3,00	-22,49 ± 1,19

Tabelle 18: Echokardiographische Parameter 24 Stunden nach der Sham-/CLP-Operation

Parameter	<i>gp130</i> WT Sham n=2	<i>gp130</i> WT CLP n=9	<i>gp130</i> cKO Sham n=3	<i>gp130</i> cKo CLP n=12
HR [bpm]	527,62 ± 40,4	498,52 ± 19,74	504,34 ± 39,74	458,4 ± 14,9
Diameter s	3,57 ± 0,17	3,27 ± 0,08	3,11 ± 0,07	3,28 ± 0,1
Diameter d	4,68 ± 0,17	4,18 ± 0,1	4,29 ± 0,1	4,33 ± 0,1
LV Volumen s	54,23 ± 6,29	43,68 ± 2,62	38,46 ± 2,25	44,4 ± 3,55
LV Volumen d	102,09 ± 9,05	78,32 ± 4,28	83,21 ± 4,72	85,38 ± 4,91
SV [μl]	47,86 ± 6,68	34,63 ± 2	44,74 ± 2,98	40,98 ± 2,12
EF [%]	46,84 ± 4,81	44,28 ± 1,06	53,73 ± 1,36	48,3 ± 1,68
FS [%]	23,58 ± 2,84	21,72 ± 0,6	27,56 ± 0,92	24,23 ± 1,02
CO [ml/min]	24,15 ± 5,34	17,16 ± 1	22,33 ± 0,51	18,82 ± 1,25
LV Mass [mg]	102,83 ± 1,63	105,14 ± 0,91	100,83 ± 2,96	104,68 ± 1,18
LV Mass Cor [mg]	82,26 ± 1,31	84,11 ± 0,73	80,66 ± 2,36	83,74 ± 0,95
LVAW s [mm]	0,95 ± 0,14	0,99 ± 0,04	0,88 ± 0,1	0,95 ± 0,05
LVAW d [mm]	0,63 ± 0,02	0,61 ± 0,03	0,67 ± 0,05	0,67 ± 0,02
LVPW s [mm]	0,89 ± 0,06	0,9 ± 0,03	0,94 ± 0,05	0,85 ± 0,01
LVPW d [mm]	0,54 ± 0,05	0,77 ± 0,03	0,62 ± 0,02	0,65 ± 0,02
A'	-20,22 ± 3,42	-18,58 ± 0,94	-18,79 ± 2,3	-19,93 ± 1,24
E'	-22,88 ± 4,19	-25,19 ± 1,23	-26,5 ± 1,96	-24,2 ± 1,4
MV A [mm/s]	365,13 ± 46,69	416,31 ± 22,5	348,71 ± 36,52	416,12 ± 25,25
MV E [mm/s]	609,59 ± 37,5	559,33 ± 22,8	646,92 ± 40,92	499,53 ± 25,78
A'/E'	0,88 ± 0,01	0,74 ± 0,03	0,7 ± 0,04	0,83 ± 0,04
E'/A'	1,12 ± 0,01	1,37 ± 0,07	1,43 ± 0,08	1,23 ± 0,06
MV E/A	1,68 ± 0,11	1,35 ± 0,04	1,89 ± 0,21	1,21 ± 0,05
MV E/E'	-27,88 ± 6,75	-22,46 ± 1,07	-24,87 ± 3,23	-20,99 ± 1,26

Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Linker Ventrikel (LV), Herzfrequenz (*Heart rate*, HR); Schlagvolumen (*Stroke volume*, SV); Ejektion Fraktion (*Ejection fraction*, EF); Verkürzungsfraktion (*Fractional shortening*, FS); Herzzeitminutenvolumen (*Cardiac output*, CO), frühdiastolische linksventrikuläre Füllung (E) und spätdiastolische linksventrikuläre Füllung (A) sowie deren Verhältnis (E/A); Linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser (LVEDD); Linksventrikuläre endsystolischer Durchmesser (LVESD); Linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser der vorderen Wand bei Systole (LVAWs) und Diastole (LVAWd); Linksventrikuläre Durchmesser der hinteren Wand bei Systole (LVPWs) und Diastole (LVPWd); Linksventrikuläre endsystolische Durchmesser der hinteren Wand bei Systole (LVPWs) und Diastole (LVPWd);

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau eines Sarkomers	3
Abbildung 2: Kontraktionszyklus einer Herzmuskelzelle.	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Atmungskette.	7
Abbildung 4: Übersicht der dynamischen mitochondrialen Prozesse.....	9
Abbildung 5: Überblick über den SOFA- und qSOFA Score.	11
Abbildung 6: Interleukin-6 Produktion und Wirkung.	17
Abbildung 7: Klassischer IL-6 Signalweg im Vergleich zum Trans-Signalweg.	18
Abbildung 8: IL-6/JAK/STAT-Signalweg.	20
Abbildung 9: Aufbau des Video - Bild Detektionssystem der Firma IonOptix®	38
Abbildung 10: Schematische Darstellung der <i>Real-time deformability cytometry</i> (RT-DC).	39
Abbildung 11: Darstellung der mitochondrialen Atmungskette.....	41
Abbildung 12: Darstellung des Ablaufs der Oroboros Messungen.	48
Abbildung 13: Zökale Ligatur und Punktion (<i>cecal and ligature puncture, CLP</i>).	50
Abbildung 14: IL-6 induziert über den Trans-Signalweg die <i>Socs3</i> Genexpression in HL-1 Kardiomyozyten.	55
Abbildung 15: IL-6 induziert Stress-induzierte Genen nach 24-stündiger Inkubation.	56
Abbildung 16: Genexpression und Proteingehalts in mit <i>gp130</i> siRNA behandelten HL-1 Kardiomyozyten.....	58
Abbildung 17: Die IL-6 induzierte Genexpression wird durch Reduktion von <i>gp130</i> mittels siRNA abgeschwächt.	59
Abbildung 18: Rekombinantes IL-6 reduziert die Kontraktilität und den Geschwindigkeitsaufbau der Kontraktion in adulten Ratten Kardiomyozyten.....	61
Abbildung 19: Der Einfluss der Zellpassage und dem Zusatz von Norepinephrin auf die Deformation in der RT-DC Messung.	63
Abbildung 20: Messung von Zellgröße und Deformation mittels <i>Real-time deformability cytometry</i> (RT-DC).	64
Abbildung 21: <i>Gp130</i> cKO-Mäuse weisen eine verbesserte Herzfunktion im Vergleich zu WT-Mäusen nach Induktion einer Sepsis auf.	66
Abbildung 22: <i>Gp130</i> Mäuse sind vor einer Aktivierung des <i>gp130</i> Signalweges nach Induktion einer Sepsis geschützt.	68

Abbildung 23: Die Expression von mitochondrialen Genen ist in Herzen von *gp130* cKO-Mäusen nach CLP-Operation verringert.70

Abbildung 24: Die Funktionsfähigkeit der Atmungskette wird durch die Induktion einer Sepsis in Herzen von *gp130* cKO Mäusen aufrechterhalten.73

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht von echokardiographischen Parametern zur Diagnostik oder Prognose der Überlebenswahrscheinlichkeit einer Sepsis-induzierten Kardiomyopathie. Eigene tabellarische Darstellung nach (Ehrman et al. 2018) 14

Tabelle 2: Geräte und Labormaterialien24

Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien25

Tabelle 4: Antikörper und Oligonukleotide26

Tabelle 5: Puffer und Lösungen27

Tabelle 6: Nährmedien27

Tabelle 7: Primersequenzen.....28

Tabelle 8: Verwendete Software29

Tabelle 9: Ansatz des siRNA Mastermix.....31

Tabelle 10: Ansatz des cDNA-Mastermix33

Tabelle 11: Programmierung des ProFlex™ PCR System33

Tabelle 12: Ansatz des qRT-PCR Mastermix pro Probe.....34

Tabelle 13: Programmierung des QuantStudio™ 3 Real-Time PCR Systems34

Tabelle 14: Zusammensetzung der Proben für die Eichkurve.....36

Tabelle 15: Zusammensetzung des IonOptix® Versuchspuffers37

Tabelle 16: Applikationsreihenfolge der Substanzen im Oroboros System42

Tabelle 17: Echokardiographische Parameter vor der Operation (Baseline).....94

Tabelle 18: Echokardiographische Parameter 24 Stunden nach der Sham-/CLP-Operation95

Literaturverzeichnis

1. Alverdy, John C.; Keskey, Robert; Thewissen, Renee (2020): Can the Cecal Ligation and Puncture Model Be Repurposed To Better Inform Therapy in Human Sepsis? In *Infection and immunity* 88 (9). DOI: 10.1128/IAI.00942-19.
2. Andrey V Kuznetsov, Erich Gnaiger (2010): Oxygraph Assay of Cytochrome c Oxidase Activity: Chemical Background Correction. In *Mitochondrial Physiology Network* 06.06: 1-4 (2010). Available online at https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwj897HThaX1AhW1R_EDHZ35CaYQFnoECAkQAQ&url=http%3A%2F%2Fwiki.oroboros.at%2Fimages%2F0%2F0b%2FMiPNet06.06_ChemicalBackground.pdf&usq=A0vVaw0u-79WI0oIquso_rJ_7tZ5, checked on 1/9/2022.
3. Arany, Zoltan; He, Huamei; Lin, Jiandie; Hoyer, Kirsten; Handschin, Christoph; Toka, Okan et al. (2005): Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. In *Cell metabolism* 1 (4), pp. 259–271. DOI: 10.1016/j.cmet.2005.03.002.
4. Arany, Zoltan; Novikov, Mikhail; Chin, Sherry; Ma, Yanhong; Rosenzweig, Anthony; Spiegelman, Bruce M. (2006): Transverse aortic constriction leads to accelerated heart failure in mice lacking PPAR-gamma coactivator 1alpha. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (26), pp. 10086–10091. DOI: 10.1073/pnas.0603615103.
5. Barkhausen, Tanja; Tschernig, Thomas; Rosenstiel, Philip; van Griensven, Martijn; Vonberg, Ralf-Peter; Dorsch, Martina et al. (2011): Selective blockade of interleukin-6 trans-signaling improves survival in a murine polymicrobial sepsis model. In *Critical care medicine* 39 (6), pp. 1407–1413. DOI: 10.1097/CCM.0b013e318211ff56.
6. Barth, E. (1992): Ultrastructural quantitation of mitochondria and myofilaments in cardiac muscle from 10 different animal species including man. In *Journal of molecular and cellular cardiology* 24 (7), pp. 669–681. DOI: 10.1016/0022-2828(92)93381-S.
7. Beesley, Sarah J.; Weber, Gerhard; Sarge, Todd; Nikravan, Sara; Grissom, Colin K.; Lanspa, Michael J. et al. (2018): Septic Cardiomyopathy. In *Critical care medicine* 46 (4), pp. 625–634. DOI: 10.1097/CCM.0000000000002851.
8. Bessière, Francis; Khenifer, Safia; Dubourg, Julie; Durieu, Isabelle; Lega, Jean-Christophe (2013): Prognostic value of troponins in sepsis: a meta-analysis. In *Intensive Care Medicine* 39 (7), pp. 1181–1189. DOI: 10.1007/s00134-013-2902-3.
9. Bloch, Andreas; Berger, David; Takala, Jukka (2016): Understanding circulatory failure in sepsis. In *Intensive Care Medicine* 42 (12), pp. 2077–2079. DOI: 10.1007/s00134-016-4514-1.
10. Bode, Johannes G.; Nimmegern, Ariane; Schmitz, Jochen; Schaper, Fred; Schmitt, Marcus; Frisch, Wiltrud et al. (1999): LPS and TNF α induce SOCS3 mRNA

and inhibit IL-6-induced activation of STAT3 in macrophages. In *FEBS letters* 463 (3), pp. 365–370. DOI: 10.1016/s0014-5793(99)01662-2.

11. Brakenhoff, J. P.; Groot, E. R. de; Evers, R. F.; Pannekoek, H.; Aarden, L. A. (1987): Molecular cloning and expression of hybridoma growth factor in *Escherichia coli*. In *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 139 (12), pp. 4116–4121.

12. Brealey, David; Karyampudi, Sekhar; Jacques, Thomas S.; Novelli, Marco; Stidwill, Ray; Taylor, Val et al. (2004): Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. In *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 286 (3), R491-7. DOI: 10.1152/ajpregu.00432.2003.

13. Brown, David A.; Perry, Justin B.; Allen, Mitchell E.; Sabbah, Hani N.; Stauffer, Brian L.; Shaikh, Saame Raza et al. (2017): Expert consensus document: Mitochondrial function as a therapeutic target in heart failure. In *Nature reviews. Cardiology* 14 (4), pp. 238–250. DOI: 10.1038/nrcardio.2016.203.

14. Bruneau, B. G.; Piazza, L. A.; Bold, A. J. de (1997): BNP gene expression is specifically modulated by stretch and ET-1 in a new model of isolated rat atria. In *The American journal of physiology* 273 (6), H2678-86. DOI: 10.1152/ajpheart.1997.273.6.H2678.

15. Brunkhorst, F. M.; Weigand, M. A.; Pletz, M.; Gastmeier, P.; Lemmen, S. W.; Meier-Hellmann, A. et al. (2020): S3-Leitlinie Sepsis – Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge : Langfassung. In *Med Klin Intensivmed Notfmed* 115 (Suppl 2), pp. 37–109. DOI: 10.1007/s00063-020-00685-0.

16. Buras, Jon A.; Holzmann, Bernhard; Sitkovsky, Michail (2005): Animal models of sepsis: setting the stage. In *Nature reviews. Drug discovery* 4 (10), pp. 854–865. DOI: 10.1038/nrd1854.

17. Busch, Katharina; Kny, Melanie; Huang, Nora; Klassert, Tilman E.; Stock, Magdalena; Hahn, Alexander et al. (2021): Inhibition of the NLRP3/IL-1 β axis protects against sepsis-induced cardiomyopathy. In *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*. DOI: 10.1002/jcsm.12763.

18. Carniel, Elisa; Taylor, Matthew R. G.; Sinagra, Gianfranco; Di Lenarda, Andrea; Ku, Lisa; Fain, Pamela R. et al. (2005): Alpha-myosin heavy chain: a sarcomeric gene associated with dilated and hypertrophic phenotypes of cardiomyopathy. In *Circulation* 112 (1), pp. 54–59. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.507699.

19. Carow, Berit; Rottenberg, Martin E. (2014): SOCS3, a Major Regulator of Infection and Inflammation. In *Frontiers in immunology* 5, p. 58. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00058.

20. Celeste M Torio; Brian J Moore (2016): National Inpatient Hospital Costs: The Most Expensive Conditions by Payer, 2013. In Celeste M. Torio, Brian J. Moore (Eds.): Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs [Internet]: Agency for

Healthcare Research and Quality (US). Available online at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK368492/>.

21. Chandhok, Gursimran; Lazarou, Michael; Neumann, Brent (2018): Structure, function, and regulation of mitofusin-2 in health and disease. In *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 93 (2), pp. 933–949. DOI: 10.1111/brv.12378.
22. Chandra, Murali; Tschirgi, Matthew L.; Ford, Steven J.; Slinker, Bryan K.; Campbell, Kenneth B. (2007): Interaction between myosin heavy chain and troponin isoforms modulate cardiac myofiber contractile dynamics. In *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 293 (4), R1595-607. DOI: 10.1152/ajpregu.00157.2007.
23. Chang, Wei-Ting; Lee, Wen-Huang; Lee, Wei-Ting; Chen, Po-Sheng; Su, Yu-Ru; Liu, Ping-Yen et al. (2015): Left ventricular global longitudinal strain is independently associated with mortality in septic shock patients. In *Intensive Care Med* 41 (10), pp. 1791–1799. DOI: 10.1007/s00134-015-3970-3.
24. Charpentier, Julien; Luyt, Charles-Edouard; Fulla, Yvonne; Vinsonneau, Christophe; Cariou, Alain; Grabar, Sophie et al. (2004): Brain natriuretic peptide: A marker of myocardial dysfunction and prognosis during severe sepsis. In *Critical care medicine* 32 (3), pp. 660–665. DOI: 10.1097/01.ccm.0000114827.93410.d8.
25. Chen, Yun; Liu, Yingqiu; Dorn, Gerald W. (2011): Mitochondrial fusion is essential for organelle function and cardiac homeostasis. In *Circulation research* 109 (12), pp. 1327–1331. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.258723.
26. Chien, Wei-Shan; Chen, Yen-Hsu; Chiang, Pei-Chi; Hsiao, Hsiu-Wen; Chuang, Shu-Mien; Lue, Sheng-I; Hsu, Chin (2011): Suppression of autophagy in rat liver at late stage of polymicrobial sepsis. In *Shock* 35 (5), pp. 506–511. DOI: 10.1097/SHK.0b013e31820b2f05.
27. Cuzzocrea, S.; Sarro, G. de; Costantino, G.; Mazzon, E.; Laurà, R.; Ciriaco, E. et al. (1999): Role of interleukin-6 in a non-septic shock model induced by zymosan. In *European cytokine network* 10 (2), pp. 191–203.
28. Damas, P.; Ledoux, D.; Nys, M.; Vrindts, Y.; Groote, D. de; Franchimont, P.; Lamy, M. (1992): Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity. In *Annals of surgery* 215 (4), pp. 356–362. DOI: 10.1097/00000658-199204000-00009.
29. Danesh, John; Kaptoge, Stephen; Mann, Andrea G.; Sarwar, Nadeem; Wood, Angela; Angleman, Sara B. et al. (2008): Long-term interleukin-6 levels and subsequent risk of coronary heart disease: two new prospective studies and a systematic review. In *PLoS medicine* 5 (4), e78. DOI: 10.1371/journal.pmed.0050078.
30. DeJager, Lien; Pinheiro, Iris; Dejonckheere, Eline; Libert, Claude (2011): Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? In *Trends in microbiology* 19 (4), pp. 198–208. DOI: 10.1016/j.tim.2011.01.001.

31. Di, Wencheng; Lv, Jianjun; Jiang, Shuai; Lu, Chenxi; Yang, Zhi; Ma, Zhiqiang et al. (2018): PGC-1: The Energetic Regulator in Cardiac Metabolism. In *Current issues in molecular biology* 28, pp. 29–46. DOI: 10.21775/cimb.028.029.
32. Doerrier, Carolina; García, José A.; Volt, Huayqui; Díaz-Casado, María E.; Luna-Sánchez, Marta; Fernández-Gil, Beatriz et al. (2016): Permeabilized myocardial fibers as model to detect mitochondrial dysfunction during sepsis and melatonin effects without disruption of mitochondrial network. In *Mitochondrion* 27, pp. 56–63. DOI: 10.1016/j.mito.2015.12.010.
33. DRAPER, M. H.; HODGE, A. J. (1949): Sub-microscopic localization of minerals in skeletal muscle by internal micro-incineration within the electron microscope. In *Nature* 163 (4145), p. 576. DOI: 10.1038/163576a0.
34. Ebashi, S.; Kodama, A. (1965): A new protein factor promoting aggregation of tropomyosin. In *Journal of biochemistry* 58 (1), pp. 107–108. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a128157.
35. Ebelt, H.; Werdan, K. (2010): Sepsis und Herz. In *Internist* 51 (7), pp. 844–849. DOI: 10.1007/s00108-009-2560-2.
36. Ehrman, Robert R.; Sullivan, Ashley N.; Favot, Mark J.; Sherwin, Robert L.; Reynolds, Christian A.; Abidov, Aiden; Levy, Phillip D. (2018): Pathophysiology, echocardiographic evaluation, biomarker findings, and prognostic implications of septic cardiomyopathy: a review of the literature. In *Critical care (London, England)* 22 (1), p. 112. DOI: 10.1186/s13054-018-2043-8.
37. Ellrodt, A.Gray; Riedinger, Mary S.; Kimchi, Asher; Berman, Daniel S.; Maddahi, Jamshid; Swan, H.J.C.; Murata, Glen H. (1985): Left ventricular performance in septic shock: Reversible segmental and global abnormalities. In *American Heart Journal* 110 (2), pp. 402–409. DOI: 10.1016/0002-8703(85)90163-2.
38. Endo, T. A.; Masuhara, M.; Yokouchi, M.; Suzuki, R.; Sakamoto, H.; Mitsui, K. et al. (1997): A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. In *Nature* 387 (6636), pp. 921–924. DOI: 10.1038/43213.
39. England, Jennifer; Loughna, Siobhan (2013): Heavy and light roles: myosin in the morphogenesis of the heart. In *Cellular and Molecular Life Sciences* 70 (7), pp. 1221–1239. DOI: 10.1007/s00018-012-1131-1.
40. Faix, James D. (2013): Biomarkers of sepsis. In *Critical reviews in clinical laboratory sciences* 50 (1), pp. 23–36. DOI: 10.3109/10408363.2013.764490.
41. Fernandes, C. J.; Akamine, N.; Knobel, E. (1999): Cardiac troponin: a new serum marker of myocardial injury in sepsis. In *Intensive Care Medicine* 25 (10), pp. 1165–1168.
42. Finkel, M. S.; Oddis, C. V.; Jacob, T. D.; Watkins, S. C.; Hattler, B. G.; Simmons, R. L. (1992): Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. In *Science (New York, N.Y.)* 257 (5068), pp. 387–389. DOI: 10.1126/science.1631560.

43. Fix, Dennis K.; VanderVeen, Brandon N.; Counts, Brittany R.; Carson, James A. (2019): Regulation of Skeletal Muscle DRP-1 and FIS-1 Protein Expression by IL-6 Signaling. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019, p. 8908457. DOI: 10.1155/2019/8908457.
44. Fleischmann, Carolin; Thomas-Rueddel, Daniel O.; Hartmann, Michael; Hartog, Christiane S.; Welte, Tobias; Heublein, Steffen et al. (2016): Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis. In *Deutsches Arzteblatt international* 113 (10), pp. 159–166. DOI: 10.3238/arztebl.2016.0159.
45. Flierl, Michael A.; Rittirsch, Daniel; Huber-Lang, Markus S.; Sarma, J. Vidya; Ward, Peter A. (2008): Molecular events in the cardiomyopathy of sepsis. In *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 14 (5-6), pp. 327–336. DOI: 10.2119/2007-00130.Flierl.
46. Gaggin, Hanna K.; Januzzi, James L. (2013): Biomarkers and diagnostics in heart failure. In *Biochimica et biophysica acta* 1832 (12), pp. 2442–2450. DOI: 10.1016/j.bbadis.2012.12.014.
47. Gao, Yu; Zhao, Honglei; Wang, Peng; Wang, Jun; Zou, Lili (2018): The roles of SOCS3 and STAT3 in bacterial infection and inflammatory diseases. In *Scandinavian Journal of Immunology* 88 (6), e12727. DOI: 10.1111/sji.12727.
48. Garbers, Christoph; Heink, Sylvia; Korn, Thomas; Rose-John, Stefan (2018): Interleukin-6: designing specific therapeutics for a complex cytokine. In *Nat Rev Drug Discov* 17 (6), pp. 395–412. DOI: 10.1038/nrd.2018.45.
49. Garg, Pankaj; Morris, Paul; Fazlanie, Asma Lina; Vijayan, Sethumadhavan; Dancso, Balazs; Dastidar, Amardeep Ghosh et al. (2017): Cardiac biomarkers of acute coronary syndrome: from history to high-sensitivity cardiac troponin. In *Intern Emerg Med* 12 (2), pp. 147–155. DOI: 10.1007/s11739-017-1612-1.
50. Gauldie, J.; Richards, C.; Harnish, D.; Lansdorp, P.; Baumann, H. (1987): Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (20), pp. 7251–7255. DOI: 10.1073/pnas.84.20.7251.
51. Geer, Lina de; Engvall, Jan; Oscarsson, Anna (2015): Strain echocardiography in septic shock - a comparison with systolic and diastolic function parameters, cardiac biomarkers and outcome. In *Critical Care* 19 (1), p. 122. DOI: 10.1186/s13054-015-0857-1.
52. Geisterfer-Lowrance, Anja A.T.; Kass, Susan; Tanigawa, Gary; Vosberg, Hans-Peter; McKenna, William; Seidman, Christine E.; Seidman, J. G. (1990): A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: A β cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. In *Cell* 62 (5), pp. 999–1006. DOI: 10.1016/0092-8674(90)90274-I.
53. Gellerich, Frank Norbert; Trumbeckaite, Sonata; Opalka, Jens Rüdiger; Gellerich, Johannes Frank; Chen, Ying; Neuhof, Christiane et al. (2002): Mitochondrial

dysfunction in sepsis: evidence from bacteraemic baboons and endotoxaemic rabbits. In *Biosci Rep* 22 (1), pp. 99–113. DOI: 10.1023/A:1016017224003.

54. Gnaiger, Erich (2020): Mitochondrial Pathways and Respiratory Control. In *Bioenerg Commun* 2020, p. 2. DOI: 10.26124/bec:2020-0002.

55. Gonzalez, A. S.; Elguero, M. E.; Finocchietto, P.; Holod, S.; Romorini, L.; Miriuka, S. G. et al. (2014): Abnormal mitochondrial fusion-fission balance contributes to the progression of experimental sepsis. In *Free radical research* 48 (7), pp. 769–783. DOI: 10.3109/10715762.2014.906592.

56. Gottlieb, Roberta A.; Bernstein, Daniel (2016): Mitochondrial remodeling: Rearranging, recycling, and reprogramming. In *Cell calcium* 60 (2), pp. 88–101. DOI: 10.1016/j.ceca.2016.04.006.

57. Guschin, D.; Rogers, N.; Briscoe, J.; Witthuhn, B.; Watling, D.; Horn, F. et al. (1995): A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6. In *The EMBO Journal* 14 (7), pp. 1421–1429. Available online at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7537214/>.

58. Hack, C. E.; Groot, E. R. de; Felt-Bersma, R. J.; Nuijens, J. H.; van Strack Schijndel, R. J.; Eerenberg-Belmer, A. J. et al. (1989): Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. In *Blood* 74 (5), pp. 1704–1710.

59. Haegeman, G.; Content, J.; Volckaert, G.; Derynck, R.; Tavernier, J.; Fiers, W. (1986): Structural analysis of the sequence coding for an inducible 26-kDa protein in human fibroblasts. In *European journal of biochemistry* 159 (3), pp. 625–632. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1986.tb09931.x.

60. Heinrich, P. C.; Castell, J. V.; Andus, T. (1990): Interleukin-6 and the acute phase response. In *The Biochemical journal* 265 (3), pp. 621–636. DOI: 10.1042/bj2650621.

61. Heinz, Sabrina; Freyberger, Alexius; Lawrenz, Bettina; Schladt, Ludwig; Schmuck, Gabriele; Ellinger-Ziegelbauer, Heidrun (2017): Mechanistic Investigations of the Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone in the Context of Pharmacological and Safety Evaluation. In *Sci Rep* 7 (1), p. 45465. DOI: 10.1038/srep45465.

62. Hill, Joseph A.; Olson, Eric N. (2008): Cardiac plasticity. In *The New England journal of medicine* 358 (13), pp. 1370–1380. DOI: 10.1056/NEJMra072139.

63. Hirano, T.; Yasukawa, K.; Harada, H.; Taga, T.; Watanabe, Y.; Matsuda, T. et al. (1986): Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. In *Nature* 324 (6092), pp. 73–76. DOI: 10.1038/324073a0.

64. Hirota, H.; Yoshida, K.; Kishimoto, T.; Taga, T. (1995): Continuous activation of gp130, a signal-transducing receptor component for interleukin 6-related cytokines, causes myocardial hypertrophy in mice. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (11), pp. 4862–4866. DOI: 10.1073/pnas.92.11.4862.

65. Hirota, Hisao; Chen, Ju; Betz, Ulrich A.K; Rajewsky, Klaus; Gu, Yusu; Ross, John et al. (1999): Loss of a gp130 Cardiac Muscle Cell Survival Pathway Is a Critical Event in the Onset of Heart Failure during Biomechanical Stress. In *Cell* 97 (2), pp. 189–198. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80729-1.
66. Huang, Nora; Kny, Melanie; Riediger, Fabian; Busch, Katharina; Schmidt, Sibylle; Luft, Friedrich C. et al. (2017): Deletion of Nlrp3 protects from inflammation-induced skeletal muscle atrophy. In *Intensive care medicine experimental* 5 (1), p. 3. DOI: 10.1186/s40635-016-0115-0.
67. Huang, Stephen J.; Nalos, Marek; McLean, Anthony S. (2013): Is early ventricular dysfunction or dilatation associated with lower mortality rate in adult severe sepsis and septic shock? A meta-analysis. In *Critical Care* 17 (3), R96. DOI: 10.1186/cc12741.
68. Ikeda, Yoshiyuki; Shirakabe, Akihiro; Maejima, Yasuhiro; Zhai, Peiyong; Sciarretta, Sebastiano; Toli, Jessica et al. (2015): Endogenous Drp1 mediates mitochondrial autophagy and protects the heart against energy stress. In *Circulation research* 116 (2), pp. 264–278. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303356.
69. Izumo, S.; Lompré, A. M.; Matsuoka, R.; Koren, G.; Schwartz, K.; Nadal-Ginard, B.; Mahdavi, V. (1987): Myosin heavy chain messenger RNA and protein isoform transitions during cardiac hypertrophy. Interaction between hemodynamic and thyroid hormone-induced signals. In *J. Clin. Invest.* 79 (3), pp. 970–977. DOI: 10.1172/JCI112908.
70. Jardin, F.; Fourme, T.; Page, B.; Loubières, Y.; Vieillard-Baron, A.; Beauchet, A.; Bourdarias, J. P. (1999): Persistent preload defect in severe sepsis despite fluid loading: A longitudinal echocardiographic study in patients with septic shock. In *Chest* 116 (5), pp. 1354–1359. DOI: 10.1378/chest.116.5.1354.
71. Jarkovska, Dagmar; Markova, Michaela; Horak, Jan; Nalos, Lukas; Benes, Jan; Al-Obeidallah, Mahmoud et al. (2018): Cellular Mechanisms of Myocardial Depression in Porcine Septic Shock. In *Frontiers in physiology* 9, p. 726. DOI: 10.3389/fphys.2018.00726.
72. Jeger, Victor; Djafarzadeh, Siamak; Jakob, Stephan M.; Takala, Jukka (2013): Mitochondrial function in sepsis. In *European Journal of Clinical Investigation* 43 (5), pp. 532–542. DOI: 10.1111/eci.12069.
73. Kamiński, K. A.; Oledzka, E.; Białobrzewska, K.; Kozuch, M.; Musiał, W. J.; Winnicka, M. M. (2007): The effects of moderate physical exercise on cardiac hypertrophy in interleukin 6 deficient mice. In *Advances in medical sciences* 52, pp. 164–168. Available online at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18217411/>.
74. Kaneko, K.; Kanda, T.; Yokoyama, T.; Nakazato, Y.; Iwasaki, T.; Kobayashi, I.; Nagai, R. (1997): Expression of interleukin-6 in the ventricles and coronary arteries of patients with myocardial infarction. In *Research communications in molecular pathology and pharmacology* 97 (1), pp. 3–12. Available online at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9507563/>.

75. Kinugawa, K.; Takahashi, T.; Kohmoto, O.; Yao, A.; Aoyagi, T.; Momomura, S. et al. (1994): Nitric oxide-mediated effects of interleukin-6 on Ca^{2+} and cell contraction in cultured chick ventricular myocytes. In *Circulation research* 75 (2), pp. 285–295.
76. Klouche, Kada; Pommet, Stephane; Amigues, Laurent; Bargnoux, Anne Sophie; Dupuy, Anne Marie; Machado, Sonia et al. (2014): Plasma brain natriuretic peptide and troponin levels in severe sepsis and septic shock: relationships with systolic myocardial dysfunction and intensive care unit mortality. In *Journal of intensive care medicine* 29 (4), pp. 229–237. DOI: 10.1177/0885066612471621.
77. Kodama, H.; Fukuda, K.; Pan, J.; Makino, S.; Baba, A.; Hori, S.; Ogawa, S. (1997): Leukemia inhibitory factor, a potent cardiac hypertrophic cytokine, activates the JAK/STAT pathway in rat cardiomyocytes. In *Circulation research* 81 (5), pp. 656–663. DOI: 10.1161/01.res.81.5.656.
78. Kohoutová, M.; Dejmek, J.; Tůma, Z.; Kuncová, J. (2018): Variability of mitochondrial respiration in relation to sepsis-induced multiple organ dysfunction. In *Physiological research* 67 (Suppl 4), S577-S592. DOI: 10.33549/physiolres.934050.
79. Kumar, A.; Thota, V.; Dee, L.; Olson, J.; Uretz, E.; Parrillo, J. E. (1996): Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. In *The Journal of experimental medicine* 183 (3), pp. 949–958. DOI: 10.1084/jem.183.3.949.
80. Kurdi, Mazen; Booz, George W. (2007): Can the protective actions of JAK-STAT in the heart be exploited therapeutically? Parsing the regulation of interleukin-6-type cytokine signaling. In *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 50 (2), pp. 126–141. DOI: 10.1097/FJC.0b013e318068dd49.
81. Lai, Ling; Leone, Teresa C.; Zechner, Christoph; Schaeffer, Paul J.; Kelly, Sean M.; Flanagan, Daniel P. et al. (2008): Transcriptional coactivators PGC-1alpha and PGC-1beta control overlapping programs required for perinatal maturation of the heart. In *Genes & development* 22 (14), pp. 1948–1961. DOI: 10.1101/gad.1661708.
82. Lai, N. Chin; Gao, Mei Hua; Tang, Eric; Tang, Ruoying; Guo, Tracy; Dalton, Nancy D. et al. (2012): Pressure overload-induced cardiac remodeling and dysfunction in the absence of interleukin 6 in mice. In *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 92 (11), pp. 1518–1526. DOI: 10.1038/labinvest.2012.97.
83. Landesberg, Giora; Gilon, Dan; Meroz, Yuval; Georgieva, Milena; Levin, Phillip D.; Goodman, Sergey et al. (2012): Diastolic dysfunction and mortality in severe sepsis and septic shock. In *European heart journal* 33 (7), pp. 895–903. DOI: 10.1093/eurheartj/ehr351.
84. Landesberg, Giora; Jaffe, Allan S.; Gilon, Dan; Levin, Phillip D.; Goodman, Sergey; Abu-Baih, Abed et al. (2014): Troponin elevation in severe sepsis and septic shock: the role of left ventricular diastolic dysfunction and right ventricular dilatation*. In *Critical care medicine* 42 (4), pp. 790–800. DOI: 10.1097/CCM.000000000000107.

85. Landesberg, Giora; Levin, Phillip D.; Gilon, Dan; Goodman, Sergey; Georgieva, Milena; Weissman, Charles et al. (2015): Myocardial Dysfunction in Severe Sepsis and Septic Shock: No Correlation With Inflammatory Cytokines in Real-life Clinical Setting. In *Chest* 148 (1), pp. 93–102. DOI: 10.1378/chest.14-2259.
86. Levy, Richard J.; Vijayasathy, C.; Raj, Nichelle R.; Avadhani, Narayan G.; Deutschman, Clifford S. (2004): Competitive and noncompetitive inhibition of myocardial cytochrome C oxidase in sepsis. In *Shock* 21 (2), pp. 110–114. DOI: 10.1097/01.shk.0000108400.56565.ab.
87. Lew, W. Y.; Yasuda, S.; Yuan, T.; Hammond, H. K. (1996): Endotoxin-induced cardiac depression is associated with decreased cardiac dihydropyridine receptors in rabbits. In *Journal of molecular and cellular cardiology* 28 (6), pp. 1367–1371. DOI: 10.1006/jmcc.1996.0127.
88. Lewis, Anthony J.; Seymour, Christopher W.; Rosengart, Matthew R. (2016): Current Murine Models of Sepsis. In *Surgical infections* 17 (4), pp. 385–393. DOI: 10.1089/sur.2016.021.
89. L'Heureux, Michael; Sternberg, Michael; Brath, Lisa; Turlington, Jeremy; Kashiouris, Markos G. (2020): Sepsis-Induced Cardiomyopathy: a Comprehensive Review. In *Current Cardiology Reports* 22 (5), p. 35. DOI: 10.1007/s11886-020-01277-2.
90. Liang, X. H.; Jackson, S.; Seaman, M.; Brown, K.; Kempkes, B.; Hibshoosh, H.; Levine, B. (1999): Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. In *Nature* 402 (6762), pp. 672–676. DOI: 10.1038/45257.
91. Lu, Yang; Fukuyama, Satoru; Yoshida, Ryoko; Kobayashi, Takashi; Saeki, Kazuko; Shiraishi, Hiroshi et al. (2006): Loss of SOCS3 gene expression converts STAT3 function from anti-apoptotic to pro-apoptotic. In *The Journal of biological chemistry* 281 (48), pp. 36683–36690. DOI: 10.1074/jbc.M607374200.
92. Lüllmann-Rauch, Renate; Asan, Esther (2015): Taschenbuch Histologie. 5., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
93. Lust, John A.; Donovan, Kathleen A.; Kline, Michael P.; Greipp, Philip R.; Kyle, Robert A.; Maihle, Nita J. (1992): Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. In *Cytokine* 4 (2), pp. 96–100. DOI: 10.1016/1043-4666(92)90043-q.
94. Lv, Xiuxiu; Wang, Huadong (2016): Pathophysiology of sepsis-induced myocardial dysfunction. In *Military Medical Research* 3, p. 30. DOI: 10.1186/s40779-016-0099-9.
95. Maalouf, Rita; Bailey, Steven (2016): A review on B-type natriuretic peptide monitoring: assays and biosensors. In *Heart Fail Rev* 21 (5), pp. 567–578. DOI: 10.1007/s10741-016-9544-9.
96. Martin, Ola J.; Lai, Ling; Soundarapandian, Mangala M.; Leone, Teresa C.; Zorzano, Antonio; Keller, Mark P. et al. (2014): A role for peroxisome proliferator-

activated receptor γ coactivator-1 in the control of mitochondrial dynamics during postnatal cardiac growth. In *Circulation research* 114 (4), pp. 626–636. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302562.

97. Matkovich, Scot J.; Al Khiami, Belal; Efimov, Igor R.; Evans, Sarah; Vader, Justin; Jain, Ashwin et al. (2017): Widespread Down-Regulation of Cardiac Mitochondrial and Sarcomeric Genes in Patients With Sepsis. In *Critical care medicine* 45 (3), pp. 407–414. DOI: 10.1097/CCM.0000000000002207.

98. Matthews, Vance; Schuster, Björn; Schütze, Stefan; Bussmeyer, Ingo; Ludwig, Andreas; Hundhausen, Christian et al. (2003): Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). In *The Journal of biological chemistry* 278 (40), pp. 38829–38839. DOI: 10.1074/jbc.M210584200.

99. Meléndez, Giselle C.; McLarty, Jennifer L.; Levick, Scott P.; Du, Yan; Janicki, Joseph S.; Brower, Gregory L. (2010): Interleukin 6 mediates myocardial fibrosis, concentric hypertrophy, and diastolic dysfunction in rats. In *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 56 (2), pp. 225–231. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.148635.

100. Mercadier, J. J.; Lompré, A. M.; Wisnewsky, C.; Samuel, J. L.; Bercovici, J.; Swynghedauw, B.; Schwartz, K. (1981): Myosin isoenzyme changes in several models of rat cardiac hypertrophy. In *Circulation research* 49 (2), pp. 525–532. DOI: 10.1161/01.res.49.2.525.

101. Mitchel, P. (1961): Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. In *Nature* 191 (4784), pp. 144–148. DOI: 10.1038/191144a0.

102. Miyata, S.; Minobe, W.; Bristow, M. R.; Leinwand, L. A. (2000): Myosin heavy chain isoform expression in the failing and nonfailing human heart. In *Circulation research* 86 (4), pp. 386–390.

103. Müllberg, J.; Schooltink, H.; Stoyan, T.; Günther, M.; Graeve, L.; Buse, G. et al. (1993): The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. In *European journal of immunology* 23 (2), pp. 473–480. DOI: 10.1002/eji.1830230226.

104. Murphy, Elizabeth; Ardehali, Hossein; Balaban, Robert S.; DiLisa, Fabio; Dorn, Gerald W.; Kitsis, Richard N. et al. (2016): Mitochondrial Function, Biology, and Role in Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. In *Circulation research* 118 (12), pp. 1960–1991. DOI: 10.1161/RES.000000000000104.

105. Naka, Tetsuji; Nishimoto, Norihiro; Kishimoto, Tadimitsu (2002): The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. In *Arthritis research* 4 Suppl 3, S233-42. DOI: 10.1186/ar565.

106. Nakao, K.; Minobe, W.; Roden, R.; Bristow, M. R.; Leinwand, L. A. (1997): Myosin heavy chain gene expression in human heart failure. In *J. Clin. Invest.* 100 (9), pp. 2362–2370. DOI: 10.1172/JCI119776.

107. Narazaki, Masashi; Tanaka, Toshio; Kishimoto, Tadimitsu (2017): The role and therapeutic targeting of IL-6 in rheumatoid arthritis. In *Expert review of clinical immunology* 13 (6), pp. 535–551. DOI: 10.1080/1744666X.2017.1295850.
108. Natanson, C.; Danner, R. L.; Elin, R. J.; Hosseini, J. M.; Peart, K. W.; Banks, S. M. et al. (1989): Role of endotoxemia in cardiovascular dysfunction and mortality. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* challenges in a canine model of human septic shock. In *J. Clin. Invest.* 83 (1), pp. 243–251. DOI: 10.1172/JCI113866.
109. Niederbichler, Andreas D.; Hoesel, Laszlo M.; Westfall, Margaret V.; Gao, Hongwei; Ipaktchi, Kyros R.; Sun, Lei et al. (2006): An essential role for complement C5a in the pathogenesis of septic cardiac dysfunction. In *The Journal of experimental medicine* 203 (1), pp. 53–61. DOI: 10.1084/jem.20051207.
110. Oroboros (2021): Suit 002 - Protokoll, updated on 10/25/2021, checked on 10/25/2021.
111. Otto, Oliver; Rosendahl, Philipp; Mietke, Alexander; Golfier, Stefan; Herold, Christoph; Klaue, Daniel et al. (2015): Real-time deformability cytometry: on-the-fly cell mechanical phenotyping. In *Nature methods* 12 (3), 199-202, 4 p following 202. DOI: 10.1038/nmeth.3281.
112. Palmer, G.; Horgan, D. J.; Tisdale, H.; Singer, T. P.; Beinert, H. (1968): Studies on the respiratory chain-linked reduced nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase. XIV. Location of the sites of inhibition of rotenone, barbiturates, and piericidin by means of electron paramagnetic resonance spectroscopy. In *Journal of Biological Chemistry* 243 (4), pp. 844–847. Available online at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4295607/>.
113. Papanicolaou, Kyriakos N.; Khairallah, Ramzi J.; Ngoh, Gladys A.; Chikando, Aristide; Luptak, Ivan; O'Shea, Karen M. et al. (2011): Mitofusin-2 maintains mitochondrial structure and contributes to stress-induced permeability transition in cardiac myocytes. In *Molecular and cellular biology* 31 (6), pp. 1309–1328. DOI: 10.1128/MCB.00911-10.
114. Papanicolaou, Kyriakos N.; Kikuchi, Ryosuke; Ngoh, Gladys A.; Coughlan, Kimberly A.; Dominguez, Isabel; Stanley, William C.; Walsh, Kenneth (2012): Mitofusins 1 and 2 are essential for postnatal metabolic remodeling in heart. In *Circulation research* 111 (8), pp. 1012–1026. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.112.274142.
115. Pape, Hans-Christian (Ed.) (2014): Physiologie. 7., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme.
116. Parker, M. M.; McCarthy, K. E.; Ognibene, F. P.; Parrillo, J. E. (1990): Right ventricular dysfunction and dilatation, similar to left ventricular changes, characterize the cardiac depression of septic shock in humans. In *Chest* 97 (1), pp. 126–131. DOI: 10.1378/chest.97.1.126.

117. Parker, M. M.; Shelhamer, J. H.; Bacharach, S. L.; Green, M. V.; Natanson, C.; Frederick, T. M. et al. (1984): Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. In *Annals of internal medicine* 100 (4), pp. 483–490.
118. Parrillo, J. E.; Burch, C.; Shelhamer, J. H.; Parker, M. M.; Natanson, C.; Schuette, W. (1985): A circulating myocardial depressant substance in humans with septic shock. Septic shock patients with a reduced ejection fraction have a circulating factor that depresses in vitro myocardial cell performance. In *J. Clin. Invest.* 76 (4), pp. 1539–1553. DOI: 10.1172/JCI112135.
119. Pathan, Nazima; Franklin, Joanne L.; Eleftherohorinou, Hariklia; Wright, Victoria J.; Hemingway, Cheryl A.; Waddell, Simon J. et al. (2011): Myocardial depressant effects of interleukin 6 in meningococcal sepsis are regulated by p38 mitogen-activated protein kinase. In *Critical care medicine* 39 (7), pp. 1692–1711. DOI: 10.1097/CCM.0b013e3182186d27.
120. Pathan, Nazima; Hemingway, Cheryl A.; Alizadeh, Ash A.; Stephens, Alick C.; Boldrick, Jennifer C.; Oragui, Emmanuelle E. et al. (2004): Role of interleukin 6 in myocardial dysfunction of meningococcal septic shock. In *The Lancet* 363 (9404), pp. 203–209. DOI: 10.1016/S0140-6736(03)15326-3.
121. Patten, Ian S.; Arany, Zolt (2012): PGC-1 coactivators in the cardiovascular system. In *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 23 (2), pp. 90–97. DOI: 10.1016/j.tem.2011.09.007.
122. Pennica, D.; King, K. L.; Shaw, K. J.; Luis, E.; Rullamas, J.; Luoh, S. M. et al. (1995): Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (4), pp. 1142–1146. DOI: 10.1073/pnas.92.4.1142.
123. Pinsky, M. R.; Vincent, J. L.; Deviere, J.; Alegre, M.; Kahn, R. J.; Dupont, E. (1993): Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. In *Chest* 103 (2), pp. 565–575. DOI: 10.1378/chest.103.2.565.
124. Raymond, Steven L.; Holden, David C.; Mira, Juan C.; Stortz, Julie A.; Loftus, Tyler J.; Mohr, Alicia M. et al. (2017): Microbial recognition and danger signals in sepsis and trauma. In *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease* 1863 (10 Pt B), pp. 2564–2573. DOI: 10.1016/j.bbadis.2017.01.013.
125. Remick, Daniel G.; Bolgos, Gerald; Copeland, Shannon; Siddiqui, Javed (2005): Role of interleukin-6 in mortality from and physiologic response to sepsis. In *Infection and immunity* 73 (5), pp. 2751–2757. DOI: 10.1128/IAI.73.5.2751-2757.2005.
126. Renz-Polster, Herbert; Krautzig, Steffen (Eds.) (2013): Basislehrbuch innere Medizin. Kompakt - greifbar - verständlich. With assistance of Boris Bätge. 5. Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer (Mediscript).
127. Richard, Pascale; Charron, Philippe; Carrier, Lucie; Ledeuil, Céline; Cheav, Theary; Pichereau, Claire et al. (2003): Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of

- disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. In *Circulation* 107 (17), pp. 2227–2232. DOI: 10.1161/01.CIR.0000066323.15244.54.
128. Riedemann, Niels C.; Neff, Thomas A.; Guo, Ren-Feng; Bernacki, Kurt D.; Laudes, Ines J.; Sarma, J. Vidya et al. (2003): Protective effects of IL-6 blockade in sepsis are linked to reduced C5a receptor expression. In *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 170 (1), pp. 503–507. DOI: 10.4049/jimmunol.170.1.503.
129. Rittirsch, Daniel; Huber-Lang, Markus S.; Flierl, Michael A.; Ward, Peter A. (2009a): Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. In *Nature protocols* 4 (1), pp. 31–36. DOI: 10.1038/nprot.2008.214.
130. Rittirsch, Daniel; Huber-Lang, Markus S.; Flierl, Michael A.; Ward, Peter A. (2009b): Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. In *Nature protocols* 4 (1), pp. 31–36. DOI: 10.1038/nprot.2008.214.
131. Robinson, Gertraud W.; Pacher-Zavisin, Margit; Zhu, Bing Mei; Yoshimura, Akihiko; Hennighausen, Lothar (2007): Socs 3 modulates the activity of the transcription factor Stat3 in mammary tissue and controls alveolar homeostasis. In *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 236 (3), pp. 654–661. DOI: 10.1002/dvdy.21058.
132. Roch, Antoine; Allardet-Servent, Jérôme; Michelet, Pierre; Oddoze, Christiane; Forel, Jean-Marie; Barrau, Karine et al. (2005): NH2 terminal pro-brain natriuretic peptide plasma level as an early marker of prognosis and cardiac dysfunction in septic shock patients. In *Critical care medicine* 33 (5), pp. 1001–1007. DOI: 10.1097/01.ccm.0000162561.82012.e9.
133. Rockman, H. A.; Ross, R. S.; Harris, A. N.; Knowlton, K. U.; Steinhilber, M. E.; Field, L. J. et al. (1991): Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (18), pp. 8277–8281. DOI: 10.1073/pnas.88.18.8277.
134. Rose-John, Stefan (2018): Interleukin-6 Family Cytokines. In *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10 (2). DOI: 10.1101/cshperspect.a028415.
135. Rowe, Glenn C.; Jiang, Aihua; Arany, Zolt (2010): PGC-1 coactivators in cardiac development and disease. In *Circulation research* 107 (7), pp. 825–838. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.223818.
136. Rudd, Kristina E.; Johnson, Sarah Charlotte; Agesa, Kareha M.; Shackelford, Katya Anne; Tsoi, Derrick; Kievlan, Daniel Rhodes et al. (2020): Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. In *The Lancet* 395 (10219), pp. 200–211. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)32989-7.
137. Rudiger, Alain; Gasser, Stefan; Fischler, Manuel; Hornemann, Thorsten; Eckardstein, Arnold von; Maggiorini, Marco (2006): Comparable increase of B-type

natriuretic peptide and amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide levels in patients with severe sepsis, septic shock, and acute heart failure. In *Critical care medicine* 34 (8), pp. 2140–2144. DOI: 10.1097/01.CCM.0000229144.97624.90.

138. Rui, Liangyou; Yuan, Minsheng; Frantz, Daniel; Shoelson, Steven; White, Morris F. (2002): SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. In *Journal of Biological Chemistry* 277 (44), pp. 42394–42398. DOI: 10.1074/jbc.C200444200.

139. Russell, Laurie K.; Mansfield, Carolyn M.; Lehman, John J.; Kovacs, Attila; Courtois, Michael; Saffitz, Jeffrey E. et al. (2004): Cardiac-specific induction of the transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha promotes mitochondrial biogenesis and reversible cardiomyopathy in a developmental stage-dependent manner. In *Circulation research* 94 (4), pp. 525–533. DOI: 10.1161/01.RES.0000117088.36577.EB.

140. Rutland, Catrin Sian; Polo-Parada, Luis; Ehler, Elisabeth; Alibhai, Aziza; Thorpe, Aaran; Suren, Suganthi et al. (2011): Knockdown of embryonic myosin heavy chain reveals an essential role in the morphology and function of the developing heart. In *Development (Cambridge, England)* 138 (18), pp. 3955–3966. DOI: 10.1242/dev.059063.

141. Sabbah, Hani N. (2020): Targeting the Mitochondria in Heart Failure: A Translational Perspective. In *JACC. Basic to translational science* 5 (1), pp. 88–106. DOI: 10.1016/j.jacbts.2019.07.009.

142. Sabbah, Hani N.; Gupta, Ramesh C.; Singh-Gupta, Vinita; Zhang, Kefei; Lanfear, David E. (2018): Abnormalities of Mitochondrial Dynamics in the Failing Heart: Normalization Following Long-Term Therapy with Elamipretide. In *Cardiovasc Drugs Ther* 32 (4), pp. 319–328. DOI: 10.1007/s10557-018-6805-y.

143. Samak, Mostafa; Fatullayev, Javid; Sabashnikov, Anton; Zeriouh, Mohamed; Schmack, Bastian; Farag, Mina et al. (2016): Cardiac Hypertrophy: An Introduction to Molecular and Cellular Basis. In *Medical Science Monitor Basic Research* 22, pp. 75–79. DOI: 10.12659/MSMBR.900437.

144. Sanfilippo, Filippo; Corredor, Carlos; Fletcher, Nick; Landesberg, Giora; Benedetto, Umberto; Foex, Pierre; Cecconi, Maurizio (2015): Diastolic dysfunction and mortality in septic patients: a systematic review and meta-analysis. In *Intensive Care Med* 41 (6), pp. 1004–1013. DOI: 10.1007/s00134-015-3748-7.

145. Sato, Ryota; Kuriyama, Akira; Takada, Tadaaki; Nasu, Michitaka; Luthe, Sarah Kyuragi (2016): Prevalence and risk factors of sepsis-induced cardiomyopathy: A retrospective cohort study. In *Medicine* 95 (39), e5031. DOI: 10.1097/MD.00000000000005031.

146. Sato, Ryota; Nasu, Michitaka (2015): A review of sepsis-induced cardiomyopathy. In *JOURNAL OF INTENSIVE CARE* 3. DOI: 10.1186/s40560-015-0112-5.

147. Scambia, G.; Testa, U.; Panici, P. B.; Martucci, R.; Foti, E.; Petrini, M. et al. (1994): Interleukin-6 serum levels in patients with gynecological tumors. In *International journal of cancer* 57 (3), pp. 318–323. DOI: 10.1002/ijc.2910570305.
148. Schaper, Fred; Rose-John, Stefan (2015): Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. In *Cytokine & growth factor reviews* 26 (5), pp. 475–487. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2015.07.004.
149. Schilling, Joel; Kelly, Daniel P. (2011): The PGC-1 cascade as a therapeutic target for heart failure. In *Journal of molecular and cellular cardiology* 51 (4), pp. 578–583. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2010.09.021.
150. Schilling, Joel; Lai, Ling; Sambandam, Nandakumar; Dey, Courtney E.; Leone, Teresa C.; Kelly, Daniel P. (2011): Toll-like receptor-mediated inflammatory signaling reprograms cardiac energy metabolism by repressing peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 signaling. In *Circulation. Heart failure* 4 (4), pp. 474–482. DOI: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.110.959833.
151. Schmitz, J.; Weissenbach, M.; Haan, S.; Heinrich, P. C.; Schaper, F. (2000): SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. In *The Journal of biological chemistry* 275 (17), pp. 12848–12856. DOI: 10.1074/jbc.275.17.12848.
152. Sebba, Anthony (2008): Tocilizumab: the first interleukin-6-receptor inhibitor. In *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists* 65 (15), pp. 1413–1418. DOI: 10.2146/ajhp070449.
153. Sehgal, P. B.; Helfgott, D. C.; Santhanam, U.; Tatter, S. B.; Clarick, R. H.; Ghrayeb, J.; May, L. T. (1988): Regulation of the acute phase and immune responses in viral disease. Enhanced expression of the beta 2-interferon/hepatocyte-stimulating factor/interleukin 6 gene in virus-infected human fibroblasts. In *The Journal of experimental medicine* 167 (6), pp. 1951–1956. DOI: 10.1084/jem.167.6.1951.
154. Sehgal, Pravinkumar B.; Grieninger, Gerd; Tosato, Giovanna (Eds.) (1989): *Annals of the New York Academy of Sciences. Interleukin-6. Regulation of the Acute Phase and Immune Responses: A New Cytokine.* New York: New York Academy of Sciences (Annals of the New York Academy of Sciences, 557).
155. Sergeeva, Irina A.; Hooijkaas, Ingeborg B.; van der Made, Ingeborg; Jong, Willeke M. C.; Creemers, Esther E.; Christoffels, Vincent M. (2014): A transgenic mouse model for the simultaneous monitoring of ANF and BNP gene activity during heart development and disease. In *Cardiovasc Res* 101 (1), pp. 78–86. DOI: 10.1093/cvr/cvt228.
156. Shankar-Hari, Manu; Vale, Claire L.; Godolphin, Peter J.; Fisher, David; Higgins, Julian P. T.; Spiga, Francesca et al. (2021): Association Between Administration of IL-6 Antagonists and Mortality Among Patients Hospitalized for COVID-19: A Meta-analysis. In *JAMA* 326 (6), pp. 499–518. DOI: 10.1001/jama.2021.11330.

157. Sheng, Fen; Han, Minghui; Huang, Zongxuan; Zhang, Lingling (2016): Interleukin 6 receptor inhibitor tocilizumab suppresses cytokine expression, inflammasome activation and phagocytosis in a cell model of sepsis. In *Die Pharmazie* 71 (11), pp. 636–639. DOI: 10.1691/ph.2016.6713.
158. Shirakabe, Akihiro; Zhai, Peiyong; Ikeda, Yoshiyuki; Saito, Toshiro; Maejima, Yasuhiro; Hsu, Chiao-Po et al. (2016): Drp1-Dependent Mitochondrial Autophagy Plays a Protective Role Against Pressure Overload-Induced Mitochondrial Dysfunction and Heart Failure. In *Circulation* 133 (13), pp. 1249–1263. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020502.
159. Singer, Mervyn; Deutschman, Clifford S.; Seymour, Christopher Warren; Shankar-Hari, Manu; Annane, Djillali; Bauer, Michael et al. (2016): The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). In *JAMA* 315 (8), pp. 801–810. DOI: 10.1001/jama.2016.0287.
160. Stahl, N.; Boulton, T. G.; Farruggella, T.; Ip, N. Y.; Davis, S.; Witthuhn, B. A. et al. (1994): Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. In *Science (New York, N.Y.)* 263 (5143), pp. 92–95. DOI: 10.1126/science.8272873.
161. Starr, R.; Willson, T. A.; Viney, E. M.; Murray, L. J.; Rayner, J. R.; Jenkins, B. J. et al. (1997): A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. In *Nature* 387 (6636), pp. 917–921. DOI: 10.1038/43206.
162. Stone, John H.; Tuckwell, Katie; Dimonaco, Sophie; Klearman, Micki; Aringer, Martin; Blockmans, Daniel et al. (2017): Trial of Tocilizumab in Giant-Cell Arteritis. In *The New England journal of medicine* 377 (4), pp. 317–328. DOI: 10.1056/NEJMoa1613849.
163. Suffredini, A. F.; Fromm, R. E.; Parker, M. M.; Brenner, M.; Kovacs, J. A.; Wesley, R. A.; Parrillo, J. E. (1989): The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. In *The New England journal of medicine* 321 (5), pp. 280–287. DOI: 10.1056/NEJM198908033210503.
164. SUIT-002 O2 pfi D006 - Bioblast (2021). Available online at https://www.bioblast.at/index.php/SUIT-002_O2_pfi_D006, updated on 4/15/2021, checked on 4/15/2021.
165. Sun, Fei; Zhou, Qiangjun; Pang, Xiaoyun; Xu, Yingzhi; Rao, Zihe (2013): Revealing various coupling of electron transfer and proton pumping in mitochondrial respiratory chain. In *Current Opinion in Structural Biology* 23 (4), pp. 526–538. DOI: 10.1016/j.sbi.2013.06.013.
166. Sun, Yuxiao; Cai, Ying; Zang, Qun S. (2019): Cardiac Autophagy in Sepsis. In *Cells* 8 (2), p. 141. DOI: 10.3390/cells8020141.
167. Sun, Yuxiao; Yao, Xiao; Zhang, Qing-Jun; Zhu, Min; Liu, Zhi-Ping; Ci, Bo et al. (2018): Beclin-1-Dependent Autophagy Protects the Heart During Sepsis. In *Circulation* 138 (20), pp. 2247–2262. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.032821.

168. Szabo-Fresnais, Nicolas; Lefebvre, Florence; Germain, Aurore; Fischmeister, Rodolphe; Pomérance, Martine (2010): A new regulation of IL-6 production in adult cardiomyocytes by beta-adrenergic and IL-1 beta receptors and induction of cellular hypertrophy by IL-6 trans-signalling. In *CELLULAR SIGNALLING* 22 (7), pp. 1143–1152. DOI: 10.1016/j.cellsig.2010.03.009.
169. Takahashi, Waka; Watanabe, Eizo; Fujimura, Lisa; Watanabe-Takano, Haruko; Yoshidome, Hiroyuki; Swanson, Paul E. et al. (2013): Kinetics and protective role of autophagy in a mouse cecal ligation and puncture-induced sepsis. In *Critical Care* 17 (4), R160. DOI: 10.1186/cc12839.
170. Takeuchi, Osamu; Akira, Shizuo (2010): Pattern recognition receptors and inflammation. In *Cell* 140 (6), pp. 805–820. DOI: 10.1016/j.cell.2010.01.022.
171. Tanaka, T.; Kanda, T.; Takahashi, T.; Saegusa, S.; Moriya, J.; Kurabayashi, M. (2004): Interleukin-6-induced reciprocal expression of SERCA and natriuretic peptides mRNA in cultured rat ventricular myocytes. In *The Journal of international medical research* 32 (1), pp. 57–61. DOI: 10.1177/147323000403200109.
172. Tardiff, J. C.; Hewett, T. E.; Factor, S. M.; Vikstrom, K. L.; Robbins, J.; Leinwand, L. A. (2000): Expression of the beta (slow)-isoform of MHC in the adult mouse heart causes dominant-negative functional effects. In *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 278 (2), H412-9. DOI: 10.1152/ajpheart.2000.278.2.H412.
173. Tavernier, B. (1998): Myofilament calcium sensitivity is decreased in skinned cardiac fibres of endotoxin-treated rabbits. In *Cardiovasc Res* 38 (2), pp. 472–479. DOI: 10.1016/S0008-6363(98)00028-5.
174. Terrell, Andrew M.; Crisostomo, Paul R.; Wairiuko, George M.; Wang, Meijing; Morrell, Eric D.; Meldrum, Daniel R. (2006): Jak/STAT/SOCS signaling circuits and associated cytokine-mediated inflammation and hypertrophy in the heart. In *Shock* 26 (3), pp. 226–234. DOI: 10.1097/01.shk.0000226341.32786.b9.
175. Tomita, Kengo; Takashina, Mitchinori; Mizuno, Natsumi; Sakata, Kimimasa; Hattori, Kohshi; Imura, Joji et al. (2015): Cardiac fibroblasts: contributory role in septic cardiac dysfunction. In *The Journal of surgical research* 193 (2), pp. 874–887. DOI: 10.1016/j.jss.2014.09.012.
176. Turnbull, Isaiah R.; Wlzonek, Joseph J.; Osborne, Dale; Hotchkiss, Richard S.; Coopersmith, Craig M.; Buchman, Timothy G. (2003): Effects of age on mortality and antibiotic efficacy in cecal ligation and puncture. In *Shock* 19 (4), pp. 310–313. DOI: 10.1097/00024382-200304000-00003.
177. Twig, Gilad; Elorza, Alvaro; Molina, Anthony J. A.; Mohamed, Hibo; Wikstrom, Jakob D.; Walzer, Gil et al. (2008): Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. In *The EMBO Journal* 27 (2), pp. 433–446. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601963.
178. van der Poll, T.; Levi, M.; Hack, C. E.; Cate, H. ten; van Deventer, S. J.; Eerenberg, A. J. et al. (1994): Elimination of interleukin 6 attenuates coagulation

activation in experimental endotoxemia in chimpanzees. In *The Journal of experimental medicine* 179 (4), pp. 1253–1259. DOI: 10.1084/jem.179.4.1253.

179. Vieillard-Baron, Antoine; Caille, Vincent; Charron, Cyril; Belliard, Guillaume; Page, Bernard; Jardin, François (2008): Actual incidence of global left ventricular hypokinesia in adult septic shock. In *Critical care medicine* 36 (6), pp. 1701–1706. DOI: 10.1097/CCM.0b013e318174db05.

180. Waage, A.; Brandtzaeg, P.; Halstensen, A.; Kierulf, P.; Espevik, T. (1989): The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome. In *The Journal of experimental medicine* 169 (1), pp. 333–338. DOI: 10.1084/jem.169.1.333.

181. Wang, Zhongliang; Yang, Bohan; Li, Qianwen; Wen, Lu; Zhang, Ruiguang (2020): Clinical Features of 69 Cases With Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. In *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 71 (15), pp. 769–777. DOI: 10.1093/cid/ciaa272.

182. Wasyluk, Weronika; Nowicka-Stążka, Patrycja; Zwolak, Agnieszka (2021): Heart Metabolism in Sepsis-Induced Cardiomyopathy-Unusual Metabolic Dysfunction of the Heart. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18 (14). DOI: 10.3390/ijerph18147598.

183. Watts, J. A.; Kline, J. A.; Thornton, L. R.; Grattan, R. M.; Brar, S. S. (2004): Metabolic dysfunction and depletion of mitochondria in hearts of septic rats. In *Journal of molecular and cellular cardiology* 36 (1), pp. 141–150. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2003.10.015.

184. Weiss, A.; La Leinwand (1996): The mammalian myosin heavy chain gene family. In *ANNUAL REVIEW OF CELL AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY* 12, pp. 417–439.

185. WHO, 06.07.2021 (2021): WHO recommends life-saving interleukin-6 receptor blockers for COVID-19 and urges producers to join efforts to rapidly increase access. Available online at <https://www.who.int/news/item/06-07-2021-who-recommends-life-saving-interleukin-6-receptor-blockers-for-covid-19-and-urges-producers-to-join-efforts-to-rapidly-increase-access>, updated on 12/29/2021, checked on 12/30/2021.

186. Wichterman, Keith A.; Baue, Arthur E.; Chaudry, Irshad H. (1980): Sepsis and septic shock—A review of laboratory models and a proposal. In *Journal of Surgical Research* 29 (2), pp. 189–201. DOI: 10.1016/0022-4804(80)90037-2.

187. Wiese, S.; Breyer, T.; Dragu, A.; Wakili, R.; Burkard, T.; Schmidt-Schweda, S. et al. (2000): Gene expression of brain natriuretic peptide in isolated atrial and ventricular human myocardium: influence of angiotensin II and diastolic fiber length. In *Circulation* 102 (25), pp. 3074–3079. DOI: 10.1161/01.cir.102.25.3074.

188. Wilhelm, Joachim; Hettwer, Stefan; Schuermann, Markus; Bagger, Silke; Gerhardt, Franziska; Mundt, Sandra et al. (2013): Severity of cardiac impairment in the early stage of community-acquired sepsis determines worse prognosis. In *Clinical*

research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society 102 (10), pp. 735–744. DOI: 10.1007/s00392-013-0584-z.

189. Xing, Z.; Gaudie, J.; Cox, G.; Baumann, H.; Jordana, M.; Lei, X. F.; Achong, M. K. (1998): IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. In *J. Clin. Invest.* 101 (2), pp. 311–320. DOI: 10.1172/JCI1368.

190. Yang, Xiaoxiao; Lin, Aiwu; Jiang, Na; Yan, Hao; Ni, Zhaohui; Qian, Jiaqi; Fang, Wei (2017): Interleukin-6 trans-signalling induces vascular endothelial growth factor synthesis partly via Janus kinases-STAT3 pathway in human mesothelial cells. In *Nephrology (Carlton, Vic.)* 22 (2), pp. 150–158. DOI: 10.1111/nep.12746.

191. Ye, Xiaobing; Ding, Jianqiang; Zhou, Xiaozhou; Chen, Guoqian; Liu, Shu Fang (2008): Divergent roles of endothelial NF-kappaB in multiple organ injury and bacterial clearance in mouse models of sepsis. In *The Journal of experimental medicine* 205 (6), pp. 1303–1315. DOI: 10.1084/jem.20071393.

192. Yoshikawa, Tomoki; Hill, Terence; Li, Kui; Peters, Clarence J.; Tseng, Chien-Te K. (2009): Severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus-induced lung epithelial cytokines exacerbate SARS pathogenesis by modulating intrinsic functions of monocyte-derived macrophages and dendritic cells. In *Journal of virology* 83 (7), pp. 3039–3048. DOI: 10.1128/JVI.01792-08.

193. Youle, Richard J.; van der Blik, Alexander M. (2012): Mitochondrial fission, fusion, and stress. In *Science (New York, N.Y.)* 337 (6098), pp. 1062–1065. DOI: 10.1126/science.1219855.

194. Zanders, Lukas; Kny, Melanie; Hahn, Alexander; Schmidt, Sibylle; Wundersitz, Sebastian; Todiras, Mihail et al. (2021): Sepsis induces interleukin 6, gp130/JAK2/STAT3, and muscle wasting. In *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*. DOI: 10.1002/jcsm.12867.

195. Zellweger, R.; Wichmann, M. W.; Ayala, A.; Stein, S.; DeMaso, C. M.; Chaudry, I. H. (1997): Females in proestrus state maintain splenic immune functions and tolerate sepsis better than males. In *Critical care medicine* 25 (1), pp. 106–110. DOI: 10.1097/00003246-199701000-00021.

196. Zhang, Yan; Chan, David C. (2007): New insights into mitochondrial fusion. In *FEBS letters* 581 (11), pp. 2168–2173. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.01.095.

197. Zhao, Lin; Cheng, Guangming; Jin, Runming; Afzal, Muhammad R.; Samanta, Anweshan; Xuan, Yu-Ting et al. (2016): Deletion of Interleukin-6 Attenuates Pressure Overload-Induced Left Ventricular Hypertrophy and Dysfunction. In *Circulation research* 118 (12), pp. 1918–1929. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308688.

198. Zhong, J.; Hwang, T. C.; Adams, H. R.; Rubin, L. J. (1997): Reduced L-type calcium current in ventricular myocytes from endotoxemic guinea pigs. In *The American journal of physiology* 273 (5), H2312-24. DOI: 10.1152/ajpheart.1997.273.5.H2312.

199. Zhou, Xingdi; Xia, Ni; Lv, Bingjie; Tang, Tingting; Nie, Shaofang; Zhang, Min et al. (2020): Interleukin 35 ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury by activating the gp130-STAT3 axis. In *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 34 (2), pp. 3224–3238. DOI: 10.1096/fj.201901718RR.
200. Zhu, Hongxin; Tannous, Paul; Johnstone, Janet L.; Kong, Yongli; Shelton, John M.; Richardson, James A. et al. (2007): Cardiac autophagy is a maladaptive response to hemodynamic stress. In *J. Clin. Invest.* 117 (7), pp. 1782–1793. DOI: 10.1172/JCI27523.
201. Zilberstein, A.; Ruggieri, R.; Korn, J. H.; Revel, M. (1986): Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta-2, a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines. In *The EMBO Journal* 5 (10), pp. 2529–2537.

Abstracts und Anteilserklärung an folgender Publikation

Sebastian Graeger hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation: Katharina Busch, Melanie Kny, Nora Huang, Tilman E Klassert, Magdalena Stock, Alexander Hahn, **Sebastian Graeger**, Mihail Todiras, Sibylle Schmidt, Bishwas Chamling, Michael Willenbrock, Stefan Groß, Doreen Biedenweg, Arnd Heuser, Claus Scheidereit, Christian Butter, Stephan B Felix, Oliver Otto, Friedrich C Luft, Hortense Slevogt, Jens Fielitz. (2021) Inhibition of the NLRP3/IL-1 β axis protects against sepsis-induced cardiomyopathy, *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 12, 1653– 1668, <https://doi.org/10.1002/jcsm.12763>

Planung und Durchführung der *Real-time deformability cytometry* Messungen, Auswertung und Interpretation, Präsentation der Ergebnisse sowie Erstellung des Manuskripts unter Anleitung.

Die Ergebnisse dieser vorliegenden Arbeit wurden in Teilen als Vortrag präsentiert und als Abstract veröffentlicht:

Sebastian Graeger, Bishwas Chamling, Doreen Biedenweg, Brita Püschel, Stefan Gross, Stephan B. Felix, Oliver Otto, Jens Fielitz: *The interleukin 6 / glycoprotein 130 axis on cardiomyocytes contributes to the pathogenesis of sepsis-induced cardiomyopathy*. 7th DZHK Retreat vom 12-14 September 2019 in Potsdam.

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde von April 2018 bis Dezember 2022 in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Jens Fielitz in der Klinik für Innere Medizin B, Kardiologie der Universitätsmedizin Greifswald unter der Leitung von Prof. Dr. Stephan Felix angefertigt. An dieser Stelle möchte ich gerne all jenen Personen danken, die mich bei den experimentellen Versuchen und der Verfassung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jens Fielitz für die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Arbeit, für die herausragende, allzeitige Betreuung und für die ausführlichen Gespräche und Diskussionen, die diese Arbeit und meinen zukünftigen Lebensweg bereichert haben.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern der AG Fielitz danke ich für die Hilfe ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Insbesondere möchte ich mich dabei bei Herrn Niklas Dörmann und Frau Katrin Darm für die Weitergabe ihres wissenschaftlichen und laborbiologischen Wissens sowie ihrer Geduld bedanken ohne deren Ausbildung diese Arbeit unmöglich gewesen wäre. Ich danke allen Kooperationspartnern des Forschungsclusters III. Für die Durchführung der IonOptix® Messungen danke ich Frau Brita Püschel und Herrn Dr. Bishwas Chamling. Frau Dr. rer. nat. Julia Rüdebusch gilt mein Dank für die Durchführung der Echokardiographien. Weiterhin gilt mein Dank der Arbeitsgruppe Biomechanics des ZIK-HIKE der Universität Greifswald. Namentlich möchte ich mich bei Frau Doreen Biedenweg und Herrn Prof. Dr. Oliver Otto für die Einführung und Unterstützung in der Methodik des RT-DC bedanken.

Ganz besonders danke ich meiner Freundin May-Johanne Meyer für ihre immerwährende Unterstützung, ihre Geduld und ihr offenes Ohr für alle die Probleme, die eine Arbeit in der Forschung mit sich bringt. Außerdem danke ich ihr für die Korrektur von Orthografie und Semantik.

An letzter Stelle danke ich meinen Eltern Andreas und Bettina Graeger für ihre bedingungslose Unterstützung und den stetigen Zuspruch, der mir den Weg in die Medizin eröffnete und mich soweit kommen ließ. Ich kann euch nie genug dafür danken.