

Aus dem Bereich Innere Medizin III – Klinische und Experimentelle Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg (Saar)  
Univ.-Prof. Dr. med. Michael Böhm

**Die Auswirkungen spezifischer Mitofusin-2-Mutationen  
auf die mitochondriale Energetik  
und die Entwicklung von Herzinsuffizienz**

Dissertation zur Erlangung des Grades des Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2018

vorgelegt von:

Christian Dekeyser

geboren am 08.12.1992

in Soest



# Meinen Eltern

Marta & Paul Dekeyser

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Widmung</b>	<b>I</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>II</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>Abkürzungs- und Symbolverzeichnis</b>	<b>VIII</b>
<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
1.1 Die Auswirkungen spezifischer Mitofusin-2-Mutationen auf die mitochondriale Energetik und Entwicklung der Herzinsuffizienz	1
1.2 The impact of specific Mitofusin-2-mutations on mitochondrial energetics and the development of heart failure	2
<b>2 Einleitung</b>	<b>4</b>
2.1 Herzinsuffizienz	4
2.1.1 Definition	4
2.1.2 Ätiologie	4
2.1.3 Epidemiologie	4
2.1.4 Formen der Herzinsuffizienz und klinische Einteilung	5
2.2 Physiologie des Herzens	7
2.2.1 Elektromechanische Kopplung in Herzmuskelzellen	7
2.2.2 Mitochondriale Energetik	8
2.2.3 Mitochondriale Bildung reaktiver Sauerstoffspezies	11
2.2.4 Calcium-Mikrodomänen und Mitofusine	12
2.2.4.1 Konzept der Calcium-Mikrodomänen	12
2.2.4.2 Aufbau und Funktion der Mitofusine-1 und -2	13
2.2.4.3 Rolle von Mitofusin-2	15
2.3 Pathophysiologie der Herzinsuffizienz	17
2.4 Fragestellung der Arbeit	18

<b>3</b>	<b>Material</b>	<b>19</b>
<b>3.1</b>	<b>Versuchstiere</b>	<b>19</b>
<b>3.2</b>	<b>Verwendete Substanzen</b>	<b>20</b>
3.2.1	Chemikalien	20
3.2.2	Farbstoffe	21
3.2.3	Weitere Substanzen	22
<b>3.3</b>	<b>Geräte und Material</b>	<b>23</b>
3.3.1	Geräte zur Datenerhebung	23
3.3.2	Vereinfachter Aufbau des IonOptix-Systems, verwendete Spiegel und Filter	24
3.3.3	Software	26
3.3.4	Instrumentarium	26
3.3.5	Narkosesystem	27
3.3.6	Sonstige Geräte	28
3.3.7	Verbrauchsmaterial	29
<b>4</b>	<b>Methodik</b>	<b>30</b>
<b>4.1</b>	<b>Isolation der Kardiomyozyten</b>	<b>30</b>
4.1.1	Vorgehensweise und verwendete Lösungen	30
4.1.2	Herzexplantation	31
4.1.3	Ablauf der Isolation	32
4.1.4	Calciumaufbau	35
<b>4.2</b>	<b>Vorbereitende Maßnahmen im Rahmen der Messung</b>	<b>36</b>
4.2.1	Vorbereitung der Lösungen	36
4.2.2	Vorbereitung der Messung	37
4.2.3	Vorbereitung des Messplatzes	39
<b>4.3</b>	<b>Ablauf der Messung</b>	<b>41</b>
4.3.1	Positionierung einer Kardiomyozyte	41
4.3.2	Messprotokoll	41
4.3.3	Messung der Zellkontraktilität	45
4.3.4	Messung der Fluoreszenzen	47
4.3.4.1	NAD(P)H und FADH <sub>2</sub>	47
4.3.4.2	DCF	48
<b>4.4</b>	<b>Statistische Auswertung und graphische Darstellung</b>	<b>49</b>

<b>5 Ergebnisse</b>	<b>50</b>
<b>5.1 Grundlegende Voraussetzungen für die Erhebung der verschiedenen Teilergebnisse</b>	<b>50</b>
5.1.1 Zellkontraktilität	50
5.1.2 Reduktions- und Oxidationsstatus	50
5.1.3 DCF-Farbstoffmessung	51
<b>5.2 Versuchsreihe nTG- vs. TG-WT-Kardiomyozyten</b>	<b>52</b>
5.2.1 Vergleich der Zellkontraktilität	52
5.2.2 Vergleich des Reduktions- und Oxidationsstatus	54
5.2.3 Vergleich der DCF-Farbstoffmessung	56
<b>5.3 Versuchsreihe nTG- vs. TG-R400Q-Kardiomyozyten</b>	<b>58</b>
5.3.1 Vergleich der Zellkontraktilität	58
5.3.2 Vergleich des Reduktions- und Oxidationsstatus	60
5.3.3 Vergleich der DCF-Farbstoffmessung	62
<b>5.4 Vergleich der TG-WT- vs. TG-R400Q-Kardiomyozyten</b>	<b>64</b>
5.4.1 Vergleich der Zellkontraktilität	64
5.4.2 Vergleich des Reduktions- und Oxidationsstatus	66
5.4.3 Vergleich der DCF-Farbstoffmessung	68
<b>6 Diskussion</b>	<b>70</b>
<b>6.1 Die Ergebnisse im Kontext des aktuellen Wissenstands</b>	<b>70</b>
<b>6.2 Schlussfolgerung und Ausblick</b>	<b>77</b>
<b>7 Quellenverzeichnis</b>	<b>79</b>
<b>8 Danksagung</b>	<b>88</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Überblick der Vorgänge während der elektromechanischen Kopplung.	8
Abbildung 2:	ATP-Zyklus der Zelle.	9
Abbildung 3:	Schematischer Überblick über die Prozesse innerhalb der kardialen Mitochondrien.	10
Abbildung 4:	Schematische Darstellung der Funktion von Mitofusin-2 für die inter- und transmitochondriale Fusion.	15
Abbildung 5:	Vereinfachter schematischer Aufbau des IonOptix-Systems.	24
Abbildung 6:	Aufbau der modifizierten Langendorff-Perfusionsanlage.	33
Abbildung 7:	Schematische Darstellung des Ablaufs der Zusammenführung.	34
Abbildung 8:	Aufbau der Messkammer.	38
Abbildung 9:	Aufbau des Zu- und Ablaufsystems.	39
Abbildung 10:	Beispielhafter Ablauf der Messphase anhand der Zelle 151021 Z1.	42
Abbildung 11:	Beispielhafter Ablauf der Kalibrierungsphase anhand der Zelle 151021 Z9.	43
Abbildung 12:	Auswertung der Kontraktionsparameter in der Phase „NT - vor ISO“ am Beispiel der Zelle 151006 Z9.	46
Abbildung 13:	Sarkomerlänge (oben) und fraktionelle Sarkomerverkürzung (unten) zu den Messpunkten I-IV im Vergleich zwischen nTG- (n = 25) und TG-WT-Kardiomyozyten (n = 29).	53
Abbildung 14:	Redoxstatus in Prozent im Vergleich zwischen nTG- (n = 23) und TG-WT-Kardiomyozyten (n = 34).	55
Abbildung 15:	Intensitäten [mV] des DCF-Signals im Vergleich zwischen nTG- (n = 28) und TG-WT-Kardiomyozyten (n = 29).	56
Abbildung 16:	Verlauf des DCF-Signals im Vergleich zwischen nTG- (n = 28) und TG-WT-Kardiomyozyten (n = 29).	57
Abbildung 17:	Sarkomerlänge (oben) und fraktionelle Sarkomerverkürzung (unten) zu den Messpunkten I-IV im Vergleich zwischen nTG- (n = 20) und TG-R400Q-Kardiomyozyten (n = 21).	59

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 18:	Redoxstatus in Prozent im Vergleich zwischen nTG- (n = 27) und TG-R400Q-Kardiomyozyten (n = 34).	61
Abbildung 19:	Intensitäten [mV] des DCF-Signals im Vergleich zwischen nTG- (n = 22) und TG-R400Q-Kardiomyozyten (n = 31).	62
Abbildung 20:	Verlauf des DCF-Signals im Vergleich zwischen nTG- (n = 22) und TG-R400Q-Kardiomyozyten (n = 31).	63
Abbildung 21:	Sarkomerlänge (oben) und fraktionelle Sarkomerverkürzung (unten) zu den Messpunkten I-IV im Vergleich zwischen TG-R400Q- (n = 21) und TG-WT-Kardiomyozyten (n = 29).	65
Abbildung 22:	Redoxstatus in Prozent im Vergleich zwischen TG-R400Q- (n = 23) und TG-WT-Kardiomyozyten (n = 34).	67
Abbildung 23:	Intensitäten [mV] des DCF-Signals im Vergleich zwischen TG-R400Q- (n = 31) und TG-WT-Kardiomyozyten (n = 29).	68
Abbildung 24:	Verlauf des DCF-Signals im Vergleich zwischen TG-R400Q- (n = 31) und TG-WT-Kardiomyozyten (n = 29).	69



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	NYHA-Klassifikation.	6
Tabelle 2:	Verwendete Chemikalien.	21
Tabelle 3:	Verwendete Farbstoffe.	21
Tabelle 4:	Verwendete weitere Substanzen.	22
Tabelle 5:	Verwendete Geräte zur Datenerhebung.	23
Tabelle 6:	Verwendete Software.	26
Tabelle 7:	Verwendetes Instrumentarium.	26
Tabelle 8:	Teile des verwendeten Narkosesystems.	27
Tabelle 9:	Verwendete sonstige Geräte.	28
Tabelle 10:	Verwendetes Verbrauchsmaterial.	29
Tabelle 11:	Zusammensetzungen der Lösungen für die Isolation.	31
Tabelle 12:	Zeitpunkte der zugeführten Calciumlösungen.	35
Tabelle 13:	Zusammensetzungen der NT-1 und NT-2.	36
Tabelle 14:	Zusammensetzung der Einspüllösungen.	37
Tabelle 15:	Ablauf der Messphase.	41
Tabelle 16:	Ablauf der Kalibrierungsphase.	42
Tabelle 17:	Messpunkte zur Auswertung der Kontraktionsparameter.	45
Tabelle 18:	Übersicht der Anregungs- und Emissionsmaxima der Redoxäquivalente.	47

## Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

[Ca <sup>2+</sup> ]	Calciumkonzentration
°	Grad
ADP	Adenosindiphosphat
AfCS	<i>engl.: Alliance for Cellular Signaling</i>
AP	Aktionspotenzial
ATP	Adenosintriphosphat
C	Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Calciumionen
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CICR	Calcium-induzierte Calciumfreisetzung ( <i>engl.: Calcium-Induced Calcium Release</i> )
d.h.	das heißt
Drp1	<i>engl.: dynamin-related protein 1</i>
ECC	Elektromechanische Kopplung ( <i>engl.: Excitation-Contraction Coupling</i> )
EF	Ejektionsfraktion
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ETC	Atmungskette ( <i>engl.: Electron Transport Chain</i> )
FADH <sub>2</sub>	Flavinadenindinukleotid
Fis1	<i>engl.: mitochondrial fission 1 protein</i>
FS	fraktionelle Sarkomerverkürzung
H <sup>+</sup>	Proton

## Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

---

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HFmEF	<i>engl.: Heart Failure with mid-range Ejection Fraction</i>
HFpEF	<i>engl.: Heart Failure with preserved Ejection Fraction</i>
HFrEF	<i>engl.: Heart Failure with reduced Ejection Fraction</i>
HO <sup>•</sup>	Hydroxylradikal
HR	Heptad-Wiederholung
I <sub>Ca</sub>	Calcium-Einwärtsstrom
IE	Internationale Einheiten
IMM	innere Mitochondrienmembran ( <i>engl.: Inner Mitochondrial Membrane</i> )
I <sub>Na</sub>	Natrium-Einwärtsstrom
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-Triphosphat
IP <sub>3</sub> R	Inositol-1,4,5-Triphosphat-Rezeptor
jSR	junktionales SR
KHK	Koronare Herzkrankheit
l	Liter
LTCC	L-Typ-Calciumkanäle
LV	linksventrikulär
m	Milli
M	Mol
max.	maximal
MCU	mitochondrialer Calcium-Uniporter
Mfn1	Mitofusin-1
Mfn2	Mitofusin-2

## Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

---

min	Minute
mind.	mindestens
MPTP	mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore ( <i>engl.: Mitochondrial Permeability Transition Pore</i> )
mRyR1	mitochondrialer Ryanodinrezeptor Typ 1
MW	Mittelwert
Na <sup>+</sup>	Natriumionen
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NCX	Natrium/Calcium-Austauscher
NO	Stickstoffmonoxid
NT	Normaltyrode
nTG	Non-Transgen-Zellreihe
NYHA	New York Heart Association
O <sup>-</sup>	Superoxidanion
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OMM	äußere Mitochondrienmembran ( <i>engl.: Outer Mitochondrial Membrane</i> )
OPA1	<i>engl.: Optic atrophy 1</i>
P <sub>i</sub>	freie Phosphatgruppe
PMCA	plasmalemmale Calcium-ATPase
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROO <sup>-</sup>	Lipidradikal
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies ( <i>engl.: Reactive Oxygen Species</i> )
RT	Relaxationszeit
RyR	Ryanodinrezeptoren
X	

## Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

---

SEM	Standardfehler ( <i>engl.: Standard Error of the Mean</i> )
SERCA	Sarkoplasmatische Retikulum Ca <sup>2+</sup> ATPase
siRNA	<i>engl.: small interfering RNA</i>
SNS	sympathisches Nervensystem
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
T-Tubulus	Transversaltubulus
TG-R400Q	Transgen-R400Q-Zellreihe
TG-WT	Transgen-Wildtyp-Zellreihe
TTP	<i>engl.: Time To Peak</i>
U	<i>engl.: Units</i>
u.a.	unter anderem
u.U.	unter Umständen
VDAC	hochspannungsabhängige Anionenkanäle ( <i>engl.: Voltage-Dependent Anion Channel</i> )
vgl.	vergleiche
vs.	versus
WO	Auswaschen ( <i>engl.: Washout</i> )
z.B.	zum Beispiel
$\Delta\text{pH}$	Protonengradient
$\Delta\mu_{\text{H}}$	elektrische Triebkraft
$\Delta\Psi_{\text{m}}$	elektrischer Gradient
$\lambda$	Wellenlänge
$\mu$	Mikro

# 1 Zusammenfassung

## 1.1 Die Auswirkungen spezifischer Mitofusin-2-Mutationen auf die mitochondriale Energetik und Entwicklung der Herzinsuffizienz

Die mitochondriale Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) -Aufnahme stimuliert die Schlüsselenzyme des Citratzyklus, infolgedessen NADH und  $\text{FADH}_2$  für die Produktion des Energieträgers ATP sowie NAD(P)H zum Schutz der Zelle vor reaktiven Sauerstoffspezies (*engl.: Reactive Oxygen Species*, ROS) bereitgestellt werden. Im Sinne einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Mikrodomäne wird eine enge räumliche Beziehung zwischen sarkoplasmatischem Retikulum (SR) und Mitochondrien hergestellt, welche die effiziente  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in die mitochondriale Matrix trotz der geringen Affinität des mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter (MCU) erklären könnte. Das Fusionsprotein Mitofusin-2 (Mfn2) stellt eine wichtige Strukturkomponente dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Mikrodomäne dar, Defekte durch spezifische Mfn2-Mutationen könnten die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kommunikation zwischen SR und Mitochondrien beeinträchtigen und zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz beitragen. Um die Folge solcher Mfn2-Mutationen auf die mitochondriale Energetik und die Entwicklung der Herzinsuffizienz zu untersuchen, haben wir Herzmuskeln von Mäusen mit kardiomyozytenspezifischer Expression entweder des Wildtyp Mfn2 (TG-WT) bzw. einer mutierten Variante des Mfn2 (TG-R400Q) isoliert und mit ihren jeweiligen nicht-transgenen Geschwistertieren (nTG) verglichen. Die Mutation R400Q trat in Vorarbeiten unseres Kooperationspartners, Gerald W. Dorn II., gehäuft bei Patienten mit kardialer Hypertrophie auf. Wir verfolgten also das Ziel, zu untersuchen, ob diese Mutation des Mfn2 einen Einfluss auf die mitochondriale Energetik in Herzmuskelzellen hat. In einem elektrischen Feld wurden die isolierten Kardiomyozyten zunächst mit einer Frequenz von 0,5 Hz stimuliert, ehe eine Arbeitslasterhöhung für 180 s bei 5 Hz Stimulation mit Exposition an den  $\beta$ -adrenergen Agonisten Isoprenalin simuliert wurde. Beim anschließenden Auswaschen (*engl.: Washout*, WO) wurde Isoprenalin ausgespült und die Stimulationsfrequenz wieder auf 0,5 Hz reduziert. Mithilfe des IonOptix-Systems wurde die Sarkomerverkürzung der Kardiomyozyten aufgenommen, parallel ermöglichte die Anregung der Redoxäquivalente bei spezifischen Wellenlängen ( $\lambda$ ) die Erfassung der Autofluoreszenzen von NADH bzw. NADPH sowie FAD. Separate Messungen mit dem oxidationssensitiven Farbstoff DCF ermöglichten die Detektion von ROS. Die Untersuchungen der kontraktile Parameter für die Zellen von Mäusen, die das WT Mfn2

überexprimierten (TG-WT), ergaben keinen Unterschied zu den nicht-transgenen Kontrolltieren. Da in den Untersuchungen der Zellverkürzung keine signifikanten Unterschiede der TG-R400Q-Kardiomyozyten zu ihren nTG-Geschwistertieren als auch zur TG-WT-Gruppe auftraten (mit der Ausnahme eines signifikanten Unterschiedes in der fraktionellen Sarkomerverkürzung (FS) zwischen TG-R400Q- und nTG-Zellreihe), schlussfolgern wir, dass weder die Überexpression noch die Mutation des Mfn2 einen Einfluss auf die Kontraktilität haben. In den simultan durchgeführten Redoxmessungen weisen weder TG-R400Q- noch TG-WT- Kardiomyozyten einen Unterschied zu ihren Kontrolltieren auf. Im Vergleich der TG-R400Q- und TG-WT-Zellen miteinander zeigen TG-WT-Kardiomyozyten eine signifikant verminderte Bereitstellung des Reduktionsäquivalents  $\text{FADH}_2$ , weshalb wir eine eingeschränkte bioenergetische Adaptation als auch mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme für diese Zellreihe schlussfolgern. In den Farbstoffmessungen zeigen sich zwischen TG-WT- und TG-R400Q-Zellen als auch zu ihren jeweiligen nTG-Geschwistertieren keine signifikanten Unterschiede, weshalb wir eine Mehrbelastung der Kardiomyozyten durch ROS ausschließen können.

### **1.2 The impact of specific Mitofusin-2-mutations on mitochondrial energetics and the development of heart failure**

Mitochondrial calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) uptake stimulates the key enzymes of the Krebs cycle, thus providing NADH and  $\text{FADH}_2$  for the production of the energy carrier ATP as well as NAD(P)H for the protection of the cell from reactive oxygen species (ROS). In the sense of a  $\text{Ca}^{2+}$  microdomain, a close spatial relationship is established between sarcoplasmic reticulum (SR) and mitochondria, which might explain efficient  $\text{Ca}^{2+}$  uptake into the mitochondrial matrix, despite the low affinity of the mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uniporter (MCU). The fusion protein mitofusin-2 (Mfn2) is an important structural component of this  $\text{Ca}^{2+}$  microdomain, and defects caused by specific Mfn2 mutations could interfere with  $\text{Ca}^{2+}$  communication between SR and mitochondria and contribute to the development of heart failure. To investigate the consequences of such Mfn2 mutations on mitochondrial energetics and the development of heart failure, we have isolated cardiac myocytes from mice with cardiomyocyte-specific expression of either wild type Mfn2 (TG-WT) or a mutated variant of Mfn2 (TG-R400Q) and compared with their respective non-transgenic sibling animals (nTG). The R400Q mutation was frequently found in patients with cardiac hypertrophy in

preliminary work by our cooperation partner, Gerald W. Dorn II. Thus, we aimed to investigate whether this mutation of Mfn2 has an effect on mitochondrial energetics in cardiomyocytes. In an electric field, the isolated cardiomyocytes were first stimulated at a frequency of 0.5 Hz before a load increase for 180 s at 5 Hz stimulation with exposure to the  $\beta$ -adrenergic agonist isoprenaline was simulated. In the subsequent washout (WO), isoprenaline was rinsed out and the stimulation frequency was reduced again to 0.5 Hz. With the help of the IonOptix system, the shortening of the cardiomyocytes was recorded. In parallel, excitation of the redox equivalents at specific wavelengths ( $\lambda$ ) enabled the detection of autofluorescence of NADH or NADPH as well as FAD. Separate measurements with the oxidation-sensitive dye DCF enabled the detection of ROS. Investigations of contractile parameters for the cells of mice overexpressing WT Mfn2 (TG-WT) revealed no difference to non-transgenic control animals. Since there were no significant differences between the TG-R400Q cardiomyocytes and their nTG siblings as well as the TG-WT group in the cell shortening studies (except for a significant difference in fractional sarcomere shortening (FS) between TG-R400Q- and nTG-cells), we conclude that neither overexpression nor mutation of Mfn2 has any influence on contractility. In the redox measurements performed simultaneously, neither TG-R400Q nor TG-WT cardiomyocytes differed from their control animals. In comparison of the TG-R400Q and TG-WT cells, TG-WT cardiomyocytes show a significantly reduced provision of the reduction equivalent  $\text{FADH}_2$ , which is why we conclude a limited bioenergetic adaptation as well as mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake for this cell line. In the dye measurements, there are no significant differences between TG-WT and TG-R400Q cells as well as their respective nTG sibling animals, which is why we can exclude an additional burden of cardiomyocytes by ROS.



## **2 Einleitung**

### **2.1 Herzinsuffizienz**

#### **2.1.1 Definition**

Pathophysiologisch ist die Herzinsuffizienz definiert als Zustand, bei der das Herz nicht mehr in der Lage ist, den Organismus mit einer hinreichenden Menge Blut und damit angemessenen Menge Sauerstoff zu versorgen.

Klinisch äußert sich eine Herzinsuffizienz durch den Symptomkomplex Dyspnoe, rasche Ermüdbarkeit, reduzierte Belastbarkeit sowie Wasserretention [33, 46, 49, 76].

#### **2.1.2 Ätiologie**

Die Ursachen einer Herzinsuffizienz sind vielfältig. In Betracht kommen u.a. Kardiomyopathien, Klappenvitien, angeborene Defekte, Myokarditiden oder kardiotoxische Substanzen wie Alkohol oder Medikamente [49].

In bis zu 50 % der Fälle ist die arterielle Hypertonie die Hauptursache der Herzinsuffizienz. Die atherosklerotischen Umbauprozesse des Gefäßendothels begünstigen dabei die Entstehung einer koronaren Herzkrankheit (KHK), in dessen Folge ein akuter Myokardinfarkt zu einem Ischämie-bedingtem irreversiblen Untergang des Herzmuskelgewebes führt. Dieser manifestiert sich im klinischen Bild einer Herzinsuffizienz [33, 46, 49, 76, 77].

Neben der arteriellen Hypertonie zählen zu den Risikofaktoren einer Herzinsuffizienz Tabakkonsum, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, Adipositas sowie ein Mangel an Bewegung [33, 46, 49, 76, 77].

#### **2.1.3 Epidemiologie**

In den westlichen Industrienationen ist die Herzinsuffizienz die häufigste Ursache für eine Krankenhauseinweisung [39] und stellt einen der Hauptgründe für Morbidität und Mortalität dar. Eine in Zukunft steigende Prävalenz der Herzinsuffizienz ist zum einem dem demographischen Wandel und dem damit verbundenen Älterwerden der Gesellschaft

geschuldet, zum anderen auf die verbesserten therapeutischen Behandlungsmöglichkeiten und das verlängerte Überleben von Patienten mit kardialen Erkrankungen zurückzuführen [49, 50, 76].

Inzidenz und Prävalenz der Herzinsuffizienz steigen mit dem Alter des Patienten: Während in der Altersgruppe der 45– bis 54-Jährigen nur 0,7 % an einer Herzinsuffizienz leiden, sind in Patientengruppen  $\geq 75$  Jahren bereits 8,7 % betroffen [60]. Schätzungsweise liegt die Gesamtprävalenz der Herzinsuffizienz für die adulte Population in der westlichen Welt bei bis zu 4,2 % [77], wobei Männer insgesamt häufiger als Frauen erkranken [46, 77].

### **2.1.4 Formen der Herzinsuffizienz und klinische Einteilung**

Man unterscheidet eine systolische von einer diastolischen Herzinsuffizienz:

Die systolische Herzinsuffizienz, auch als HF<sub>r</sub>EF (*engl.: Heart Failure with reduced Ejection Fraction*) beschrieben, ist durch eine verminderte Auswurfleistung des Herzens gekennzeichnet. Neben den typischen Symptomen einer Herzinsuffizienz gilt eine echokardiographisch bestimmte linksventrikuläre (LV) Ejektionsfraktion (EF) von  $< 40$  % als pathologisch [57, 77].

Die diastolische Herzinsuffizienz, auch als HF<sub>p</sub>EF (*engl.: Heart Failure with preserved Ejection Fraction*) bezeichnet, ist durch eine Abnormalität der Füllungseigenschaften und / oder des Saugvermögens des Herzens gekennzeichnet. Höhere Füllungsdrücke sind nötig, um ein normales enddiastolisches Volumen zu erreichen. Zusätzlich zu den Symptomen einer Herzinsuffizienz und einer LV-EF von  $\geq 50$  % sind ein erhöhter Spiegel natriuretischer Peptide (BNP 35 pg/ml und/oder NT-proBNP 125 pg/mL) sowie eine funktionelle und strukturelle Herzveränderung (linkventrikuläre Hypertrophie und / oder ein vergrößerter linker Vorhof) zur Diagnose einer HF<sub>p</sub>EF obligat [49, 57, 77].

Die HF<sub>mr</sub>EF (*engl.: Heart Failure With mid-range Ejection Fraction*) deckt den Graubereich bei einer LV-EF zwischen 40 – 49 % ab. Bei Diagnosestellung müssen nebst typischer Symptome auch hier die Kriterien eines erhöhten Spiegels natriuretischer Peptide sowie der funktionellen und strukturellen Herzveränderung vorliegen [57].

Die mediane Prävalenz einer HF<sub>p</sub>EF liegt mit 4,9 % etwas höher als die der HF<sub>r</sub>EF mit 3,3 %. Frauen sind öfter von einer HF<sub>p</sub>EF betroffen, Männer leiden eher an einer HF<sub>r</sub>EF [77].

Mischformen einer diastolischen und systolischen Herzinsuffizienz sind klinisch möglich [33].

Im klinischen Alltag ist die Klassifikation der New York Heart Association (NYHA) eine gängige Methode, die Symptomatik des Patienten, ungeachtet einer systolischen, diastolischen oder kombinierten Dysfunktion, einzuordnen. Die symptomatischen Einschränkungen des Patienten werden anhand seiner Leistungsfähigkeit bzw. körperlichen Aktivität in vier Klassen eingestuft:

<b>NYHA-Klasse</b>	<b>Körperliche Aktivität und Symptomatik</b>
Klasse I	Keine Einschränkung der körperlichen Aktivität. Normale körperliche Aktivität führt nicht zu Luftnot, Müdigkeit oder Palpitationen.
Klasse II	Leichte Einschränkung der körperlichen Aktivität. Beschwerdefreiheit unter Ruhebedingungen; aber bei normaler körperlicher Aktivität kommt es zu Luftnot, Müdigkeit oder Palpitationen.
Klasse III	Deutliche Einschränkung der körperlichen Aktivität. Beschwerdefreiheit unter Ruhebedingungen; aber bereits bei geringer physischer körperlicher Aktivität Auftreten von Luftnot, Müdigkeit oder Palpitationen.
Klasse IV	Unfähigkeit, körperliche Aktivität ohne Beschwerden auszuüben. Symptome unter Ruhebedingungen können vorhanden sein. Jegliche körperliche Aktivität führt zur Zunahme der Beschwerden.

**Tabelle 1: NYHA-Klassifikation.**

Die Tabelle wurde aus den ESC Pocket Guidelines (Update 2012) der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie ([www.dgk.org](http://www.dgk.org)) übernommen.

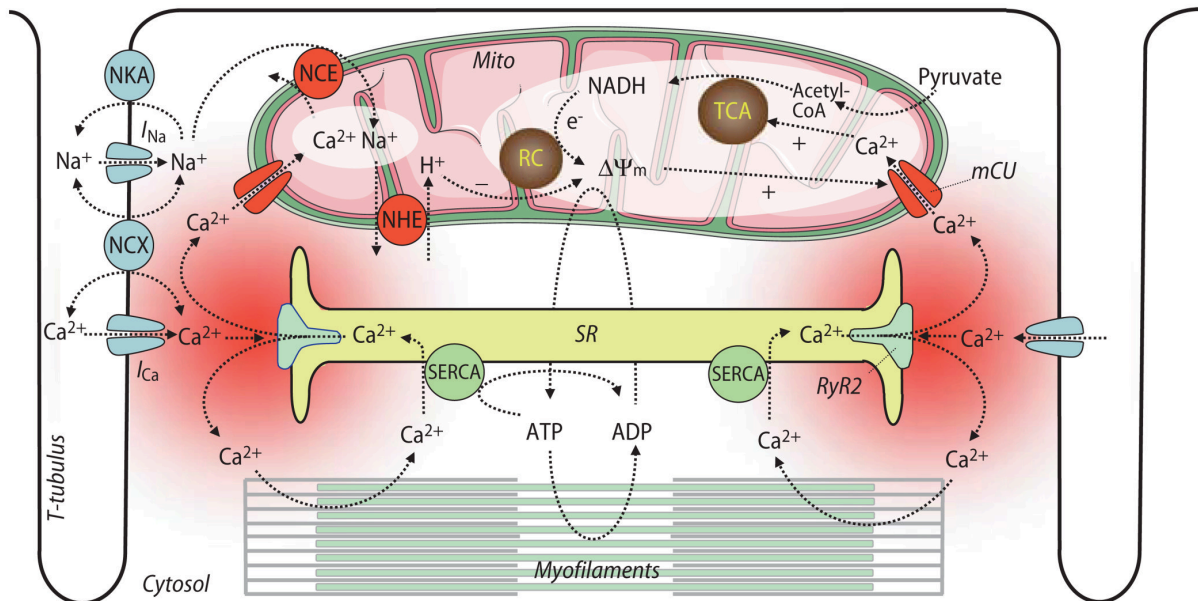
## 2.2 Physiologie des Herzens

### 2.2.1 Elektromechanische Kopplung in Herzmuskelzellen

Der Vorgang, bei der eine elektrische Erregung der Oberflächenmembran in Form eines Aktionspotenzials (AP) in eine mechanische Bewegung umgesetzt wird, wird als „elektromechanische Kopplung“ (*engl.: Excitation-Contraction Coupling, ECC*) bezeichnet [6, 44, 82].

In der Kontraktionsphase der Herzmuskelzellen werden während eines APs spannungsgesteuerte Natrium-Kanäle aktiviert, die eine rasche Depolarisation der Zelle infolge eines Einwärtsstroms von Natriumionen ( $\text{Na}^+$ ;  $I_{\text{Na}}$ ) ermöglichen. Die Depolarisation der Zelle wiederum öffnet die im Transversaltubulus (T-Tubulus) befindlichen spannungsabhängigen L-Typ-Calciumkanäle (*engl.: L-Type Calcium Channels, LTCC*), die den Einstrom von Calciumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ;  $I_{\text{Ca}}$ ) in das Zellinnere bedingen. Durch die enge räumliche Beziehung zu Ryanodinrezeptoren (RyR) des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) bewirkt die verhältnismäßig geringe intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationserhöhung durch  $I_{\text{Ca}}$  eine Aktivierung der RyR, infolgedessen im Sinne einer „Calcium-induzierten Calciumfreisetzung“ (*engl.: Calcium-induced calcium release, CICR*)  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR freigesetzt werden. Binnen weniger Millisekunden wird so die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]$ ) von ca. 100 nmol/l auf etwa 1  $\mu\text{mol/l}$  angehoben. Die Bindung des  $\text{Ca}^{2+}$  an Troponin C der Myofilamente ermöglicht die Kontraktion der Herzmuskelzelle [6-8, 38, 39, 44, 79, 82].

Während der Diastole diffundiert das  $\text{Ca}^{2+}$  von den Myofilamenten zurück in das Zytosol. Über mehrere aktive Mechanismen, wobei zu den wichtigsten die Sarkoplasmatische Retikulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (SERCA), der sarkolemmale  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) und die plasmalemmale  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PMCA) zählen, wird die zytosolische  $[\text{Ca}^{2+}]$  auf den prästolischen Ausgangswert reduziert. Siehe auch **Abbildung 1** [6, 7, 38, 39, 44, 82].



**Abbildung 1: Überblick der Vorgänge während der elektromechanischen Kopplung.**

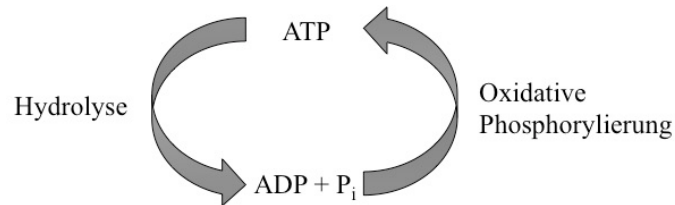
Während der Systole werden spannungsgesteuerte Na<sup>+</sup>-Kanäle durch ein eintreffendes AP aktiviert, infolgedessen ein Einwärtstrom von Na<sup>+</sup> (I<sub>Na</sub>) die Zelle depolarisiert. Dies wiederum ermöglicht den Einwärtstrom von Ca<sup>2+</sup> (I<sub>Ca</sub>) über LTCC. Im Sinne einer Calcium-induzierten Calciumfreisetzung wird Ca<sup>2+</sup> aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) freigesetzt. Die Bindung des Ca<sup>2+</sup> an die Myofilamente (*engl.: Myofilaments*) ermöglicht die Kontraktion der Herzmuskelzelle. In der Diastole setzen u.a. die Sarkoplasmatische Retikulum Ca<sup>2+</sup> ATPase (SERCA) und der sarkolemmale Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher (NCX) die zytosolische [Ca<sup>2+</sup>] auf das präsystemische Ausgangsniveau zurück.

Die Abbildung wurde übernommen aus *Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics*, Maack C. et al.

## 2.2.2 Mitochondriale Energetik

Die Vielzahl der aktiven Prozesse (vgl. **Abbildung 1**), die im Zuge der ECC innerhalb der Kardiomyozyten ablaufen, verbrauchen enorme Mengen Energie. Mitochondrien nehmen daher im Herzmuskelgewebe eine Schlüsselrolle ein, indem sie durch oxidative Phosphorylierung den zentralen Energieträger Adenosintriphosphat (ATP) bereitstellen [38, 39, 44]. ATP setzt die benötigte Energie wiederum frei, indem eine Anhydridbindung einer

Triphosphatgruppe hydrolysiert wird, wobei aus einem ATP ein Adenosindiphosphat (ADP) und eine freie Phosphatgruppe ( $P_i$ ) entstehen (vgl. **Abbildung 2**) [59].



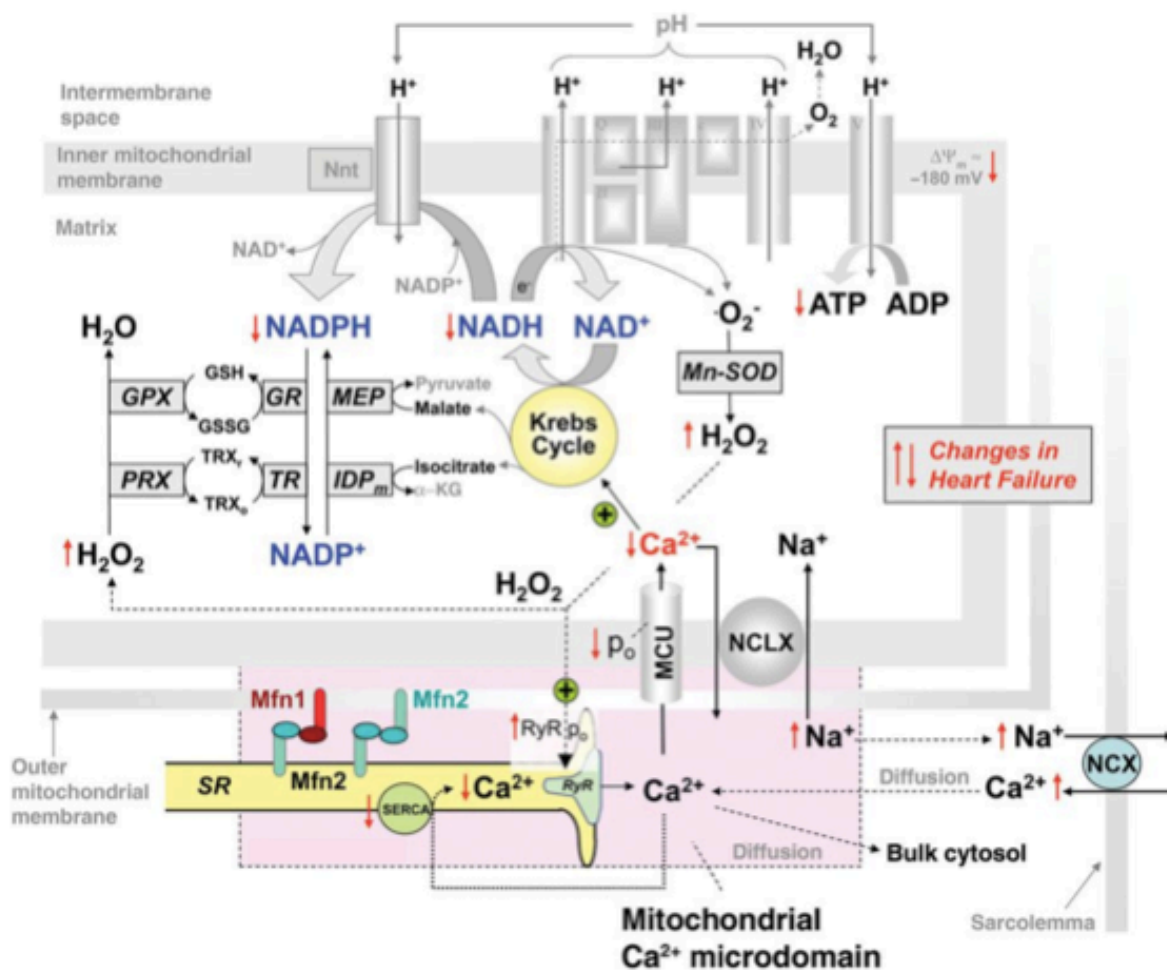
**Abbildung 2:** ATP-Zyklus der Zelle.

Durch hydrolytische Spaltung einer Anhydridbindung wird Energie freigesetzt, wobei aus einem ATP ein ADP und ein  $P_i$  entstehen. Innerhalb der Mitochondrienmatrix wird ATP durch oxidative Phosphorylierung regeneriert.

Ein einzelner Herzschlag benötigt etwa 2 % des intrazellulär verfügbaren ATPs. Binnen einer Minute wäre die gesamte ATP-Reserve der Kardiomyozyte aufgebraucht [38, 50]. Um eine konstante Verfügbarkeit des ATPs zu gewährleisten, geben die im Citratzyklus entstehenden Reduktionsäquivalente Nicotinamidadeninindinukleotid (NADH) und Flavinadeninindinukleotid ( $FADH_2$ ) ihre Elektronen an den Komplexen I und II der Atmungskette (*engl.: Electron Transport Chain, ETC*) ab, wodurch diese zu  $NAD^+$  und  $FAD$  oxidiert werden. Die nachfolgenden Reaktionen entlang der ETC bewirken die Translokation der Protonen ( $H^+$ ) über die innere Mitochondrienmembran (*engl.: Inner Mitochondrial Membrane, IMM*), wodurch ein Protonengradient ( $\Delta pH$ ) und ein elektrischer Gradient ( $\Delta \Psi_m$ ) entstehen. Diese elektrische Triebkraft ( $\Delta \mu_H$ ) wird dann genutzt, um an der  $F_1F_0$ -ATP-Synthase ATP durch oxidative Phosphorylierung aus ADP und  $P_i$  wiederherzustellen [38, 50, 59]. Siehe auch **Abbildung 3**.

Die kardiale Auswurfsleistung kann, insbesondere unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation, um ein vielfaches gesteigert werden. Dabei besteht nicht nur an den Myofilamenten, sondern auch aufgrund der Veränderung der Amplituden und der Dauer zytosolischer  $Ca^{2+}$ -Transienten ein gesteigerter Bedarf an ATP an den  $Ca^{2+}$ -austauschenden Strukturen (u.a. SERCA, NCX, PMCA). Um dem stärkeren Energiekonsum der Kardiomyozyte gleichzukommen, nehmen  $Ca^{2+}$  und ADP eine Schlüsselposition in der Regulation der oxidativen Phosphorylierung ein und sichern so ein stets konstantes Verhältnis von ATP/ADP und eine konstante oder sogar gesteigerte Ratio von  $NADH/NAD^+$  während physiologischer Veränderungen der kardialen

Arbeitslast (vgl. **Abbildung 1** und **Abbildung 3**). ADP, welches bei der Hydrolyse von ATP entsteht, wirkt stimulierend auf die  $F_1F_0$ -ATP-Synthase. Diese wiederum nutzt  $\Delta\mu_H$ , welcher durch Oxidation von NADH und  $FADH_2$  zu  $NAD^+$  bzw. FAD aufrechterhalten wird. Die erhöhten Amplituden und Frequenzen der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Transienten führen zu einer Akkumulation von  $Ca^{2+}$  innerhalb der mitochondrialen Matrix. Dort wirkt  $Ca^{2+}$  stimulierend auf Schlüsselenzyme des Citratzyklus, in deren Zuge eine beschleunigte Regeneration von oxidiertem  $NAD^+$  und FAD zu reduziertem NADH und  $FADH_2$  ermöglicht wird [5, 38, 50].



**Abbildung 3:** Schematischer Überblick über die Prozesse innerhalb der kardialen Mitochondrien.

NADH (und  $FADH_2$ ) werden an den Komplexen I und II der Atmungskette zu  $NAD^+$  (und FAD) oxidiert, wobei  $H^+$  über die IMM befördert werden  $\Delta\Psi_m$  entsteht. Diese wird genutzt, um an der  $F_1F_0$ -ATP-Synthase (hier mit „V“ bezeichnet) ATP durch oxidative Phosphorylierung aus ADP (und  $P_i$ ) wiederherzustellen. Im Rahmen der Oxidation von NADH

(und  $\text{FADH}_2$ ) entsteht Superoxid ( $\text{O}_2^-$ ), vornehmlich an den Komplexen I und III der Atmungskette, Dieses wird dabei zunächst durch die Superoxid-Dismutase (Mn-SOD) zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  umgewandelt, dieses wiederum u.a. durch die Glutathion-Peroxidase und Peroxiredoxin (GPX; PRX) zu  $\text{H}_2\text{O}$  entgiftet. Da die Prozesse NADPH-abhängig sind, findet hier parallel die Oxidation zu  $\text{NADP}^+$  statt.  $\text{Ca}^{2+}$  (und ADP) wirken stimulierend auf Schlüsselenzyme des Citratzyklus (Krebs Cycle) und regulieren somit die Regeneration von NADH und NADPH (als auch  $\text{FADH}_2$ ).

Die Abbildung wurde aus *Calcium release microdomains and mitochondria*, Kohlhaas et al. übernommen und nach eigenen Vorstellungen modifiziert.

### 2.2.3 Mitochondriale Bildung reaktiver Sauerstoffspezies

Wie in **Abbildung 3** dargestellt sind eine Vielzahl von Strukturen und Vorgängen innerhalb des Zellmetabolismus sind für die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (*engl.: Reactive Oxygen Species*, ROS) verantwortlich, zu denen u.a. die NADPH-Oxidase, die Xanthin-Oxidase, die entkoppelte Stickoxidsynthase, Cytochrom-P450-Enzyme oder der Fettstoffwechsel zählen [4, 38, 50, 75]. Allen voran sind Mitochondrien mit etwa 90 % des Gesamtanteils die Hauptverursacher der ROS-Bildung, indem bei der Oxidation von NADH und  $\text{FADH}_2$  (im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung von ATP) freie Elektronen mit Sauerstoff und anderen Elektronenakzeptoren reagieren können [4], wobei reaktive Spezies wie Superoxidanionen ( $\text{O}^-$ ), Stickstoffmonooxide (NO), Hydroxyl- ( $\text{HO}^-$ ) und Lipidradikale ( $\text{ROO}^-$ ), Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) u.v.m. anfallen können [48]. Schätzungsweise 0,2 % des Sauerstoffverbrauchs münden in die Entstehung freier Radikale, vornehmlich an den Komplexen I und III der ETC [4, 38].

Freie Sauerstoffmoleküle dienen als Teil physiologischer Signalwege, indem sie u.a. als sekundärer Botenstoff an spezifischen Liganden binden oder sie die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren beeinflussen [30, 73]. Um mögliche Schäden einer inadäquaten Bildung oxidativer Radikale zu limitieren, stehen der Zelle sowohl enzymatische (Superoxid-Dismutase, Katalase, Peroxiredoxin, Glutathion-Peroxidase und Thioredoxin) als auch nicht-enzymatische Antioxidantien (Glutathion, Vitamin C und E, Bilirubin, Harnsäure und  $\beta$ -Carotin) zur Verfügung [50]. Der Zustand, in der die ROS-Produktion die Kapazitäten des antioxidativen Abwehrsystems übersteigt und eine suffiziente Entgiftung der Myozyte nicht mehr gewährleistet werden kann, ist als „oxidativer Stress“ definiert. Durch Protein- und



Lipid-Peroxidation sowie Schäden an der DNA kann oxidativer Stress einen irreversiblen Zellschaden sowie den Zelltod verursachen, was die funktionelle und strukturelle Integrität des Gewebes beeinträchtigt [75]. Speziell im Herzen bedingt dies nicht nur das myokardiale Remodelling, sondern auch die kontraktile Dysfunktion sowie die strukturelle Veränderung des Herzens. Letztendlich kann die beschriebene pathologische Kaskade in das Krankheitsbild einer Herzinsuffizienz münden [48, 50, 67, 75]. Siehe auch **Abbildung 3**.

### 2.2.4 Calcium-Mikrodomänen und Mitofusine

#### 2.2.4.1 Konzept der Calcium-Mikrodomänen

Die mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme ist für die Anpassung des Zellstoffwechsels an die kardiale Arbeitslast von zentraler Bedeutung, da  $\text{Ca}^{2+}$  stimulierend auf die Schlüsselenzyme des Citratzyklus wirkt (vgl. **Kapitel 2.2.2** sowie **Abbildung 3**). Der transiente Anstieg der zytosolischen  $[\text{Ca}^{2+}]$  mit jedem Herzschlag, der bei gesteigertem Energiebedarf häufiger und größer ist (z.B. bei erhöhter Herzfrequenz oder Kontraktilität), wird durch das komplexe Puffersystem der Mitochondrien erfasst und gemittelt. Dabei wird der kardiale Stoffwechsel dem gesteigerten Energiebedarf angepasst, indem vermehrt  $\text{Ca}^{2+}$  in die mitochondriale Matrix aufgenommen wird [40, 62].

$\text{Ca}^{2+}$  kann zum einen über unselektive spannungsabhängige Anionenkanäle (*engl.: Voltage-Dependent Anion Channel*, VDAC), befindlich in der äußeren Mitochondrien-Membran (*engl.: Outer Mitochondrial Membrane*, OMM), in den Intermembranraum gelangen, von wo es über den mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter (MCU), welcher sich in der IMM befindet, in die mitochondriale Matrix gelangen kann. Allerdings ist der MCU relativ unempfindlich gegenüber der durchschnittlichen zytosolischen  $[\text{Ca}^{2+}]$  und schützt dadurch die Kardiomyozyte mutmaßlich vor einem potenziell toxischen Schaden durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung. Das Konzept der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mikrodomäne beruht auf einer engen räumlichen Beziehung zwischen endoplasmatischem Retikulum (ER) und Mitochondrien, wodurch es dem MCU ermöglicht wird, trotz seiner geringen  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$  in die mitochondriale Matrix einzuschleusen [40, 61, 63].

Das Konzept der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mikrodomänen ist in Nicht-Kardiomyozyten weithin akzeptiert. [64] Jedoch blieb der genaue molekulare Mechanismus, der die Interaktion zwischen ER und Mitochondrienmatrix ermöglicht, zunächst unbekannt. In ihrer Grundlagenstudie an embryonalen Mäuse-Fibroblasten gelang es de Brito et al. den ersten Beweis einer physischen

Brücke zwischen ER und Mitochondrien zu liefern. Dabei konnten sie das mitochondriale Fusionsprotein Mitofusin-2 (Mfn2) identifizieren, welches die Morphologie des ER reguliert und dieses über homotypische (Mfn2 mit Mfn2) oder heterotypische (Mfn2 mit Mitofusin-1, Mfn1) Verbindungen an die Mitochondrienmatrix koppelt und damit die mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme erleichtert [15, 18].

Neuere Studien unterstützen die Hypothese, dass mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Mikrodomänen auch im Herzen existieren [18]. In Versuchen an Ratten-Herzen wurde ein nicht-identifiziertes Verbindungsprotein (Linkerprotein) beobachtet, welches nach Applikation von Koffein den interorganellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transfer von an Mitochondrien gebundenen SR-Fragmenten ermöglicht, ohne dabei das  $\text{Ca}^{2+}$  im extramitochondrialen Medium zu erhöhen [27]. In ähnlicher Weise konnte eine schnelle  $\text{Ca}^{2+}$ -Pufferung mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Komplexbildnern weder in permeabilisierten Ratten-Kardiomyozyten [69] noch in H9c2-Kardiomyoblasten [72] den Koffein-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transfer vom SR zu den Mitochondrien abschwächen. Weitere Versuche an nicht-kardialen HeLa-Zellen beweisen, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung aus dem ER in kleinen Regionen entlang der mitochondrialen Membran 5- bis 10-fach höhere Konzentrationen erreicht im Vergleich zum Zytosol [29]. Ebenso konnten in elektronenmikroskopischen Untersuchungen Linkerproteine zwischen junktionalem SR (jSR) und Mitochondrien bzw. zwischen T-Tubuli und Mitochondrien identifiziert werden [27, 32].

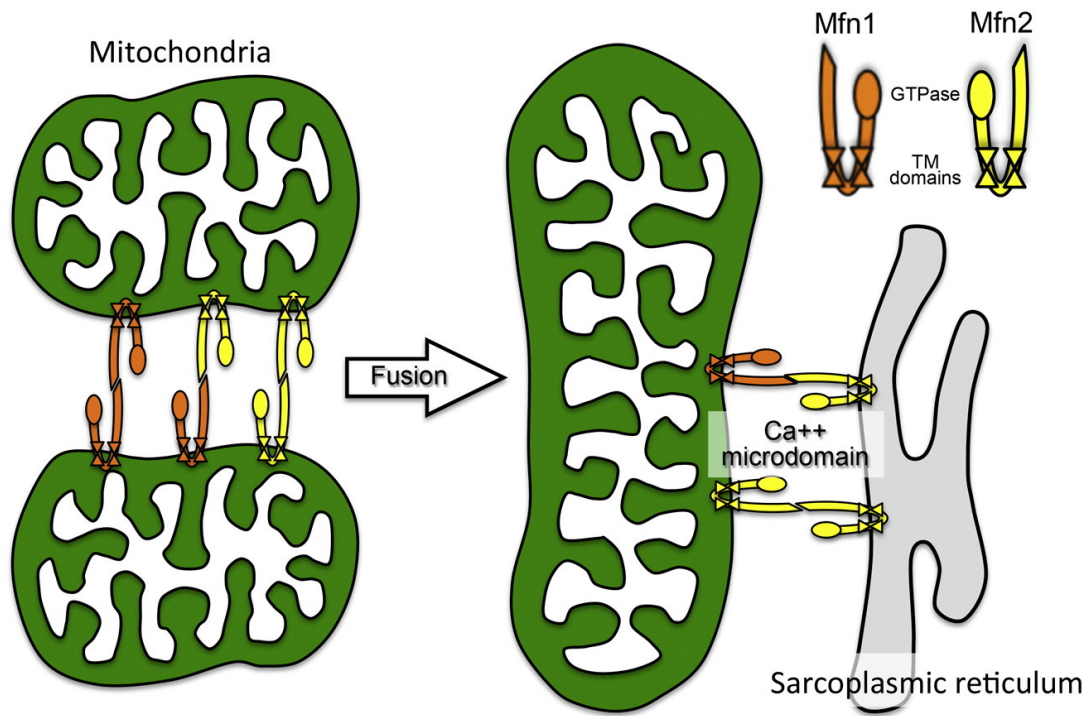
Nichtsdestotrotz konnte die genaue molekulare Identität des Linkerproteins vorerst nicht genau bestimmt werden [18]. Erst die Beobachtung von Garcia-Perez et. al, dass das jSR bevorzugt mit denjenigen mitochondrialen Oberflächensegmenten verknüpft ist, die einen Kontaktpunkt zwischen OMM und IMM vorweisen, und dass diese Kontaktpunkte Mfn2 (und VDAC) anreichern [28], legen die Vermutung nahe, auch in Zusammenhang mit den Ergebnissen von de Brito und Scorrano [15], dass das Linkerprotein zwischen SR und Mitochondrienmatrix Mfn2 ist [18].

### **2.2.4.2 Aufbau und Funktion der Mitofusine-1 und -2**

Mitochondrien bilden ein hochdynamisches und retikuläres Netzwerk, dessen Morphologie durch konstante Spaltungs- und Fusionsprozesse bestimmt wird [11, 24]. Während die Fusion der IMM durch OPA1 (*engl.: Optic atrophy 1*), eine Dynamin-verwandte Guanosin-Triphosphatase (GTPase), erzielt wird [14, 71], nehmen die membrangebundenen, ebenfalls Dynamin-verwandten Proteine Mfn1 und Mfn2 eine Schlüsselrolle in der Bindung benachbarter Mitochondrien sowie der Fusion der OMM ein [14, 24, 31, 66].

Die Mitofusin-vermittelte interorganelle (zwischen den Mitochondrien) oder transorganelle (zwischen Mitochondrien und SR bzw. ER) Anheftung werden durch die physikalische Struktur des Proteins bestimmt: Mitofusine bestehen aus einer N-terminalen GTPase-Domäne, einer alpha-helikalen ersten Heptad-Wiederholung (HR1), zwei benachbarten lipophilen Transmembrandomänen und einer eher C-terminal gelegenen zweiten alpha-helikalen Heptad-Wiederholung (HR2). Das C- und N-terminale Ende liegen zytosolisch, die benachbarten lipophilen Transmembrandomänen erzeugen eine Haarnadelkurve durch die OMM [41], womit HR1 und HR2 auf jeweils einem zytosolischen Arm des eng gefalteten Moleküls zum Liegen kommen [19]. Für die mitochondriale Anbindung ist diese Konfiguration elementar, da sie über die jeweiligen HR2-Domänen eine antiparallele Bindung zwischen zwei Mitofusin-Molekülen schafft [19]. Dabei können die Proteine sowohl homotypische, d.h. Mfn1 mit Mfn1 oder Mfn2 mit Mfn2, oder heterotypische, d.h. Mfn1 mit Mfn2, Komplexe eingehen [41].

Da etwa 10 % der Mfn2 auf den Membranen des SR lokalisiert sind, ist Mfn2 ebenfalls das molekulare Bindeglied zwischen Mitochondrien und SR. Aus diesem Grund wird angenommen, dass kardiales Mfn2 beeinflussend auf die molekularen  $\text{Ca}^{2+}$ -Wechselwirkungen zwischen Mitochondrien und SR wirkt und damit Vorgänge reguliert, die mit der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme im Zusammenhang stehen, wie etwa dem Zellstoffwechsel, der Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (*engl.: Mitochondrial Permeability Transition Pore*, MTPT) und dem programmiertem Zelltod (Apoptose) [19, 42].



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Funktion von Mitofusin-2 für die inter- und transmitochondriale Fusion.**

Schematischer Aufbau von Mfn1 (braun) und Mfn2 (gelb) oben rechts. Durch homo- und heterotypische Bindungen der Mitofusine (links) wird die mitochondriale Fusion (Mitte) und die Anlagerung zwischen SR und Mitochondrien im Sinne einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Mikrodomäne (rechts) vermittelt. Man beachte, dass ausschließlich Mfn2 in der Membran des SRs lokalisiert ist.

Die Abbildung wurde übernommen aus *Functional implications of mitofusin 2-mediated mitochondrial-SR tethering*, Dorn et. al.

### 2.2.4.3 Rolle von Mitofusin-2

Um speziell die Rolle von Mfn2 im  $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch zwischen SR und Mitochondrien zu bestimmen, erzeugte das Labor um Gerald W. Dorn, II (vgl. **Kapitel 3.1**) Mäuse mit kardiomyozytenspezifischer postnataler Deletion von Mfn1 und Mfn2 [18]. Während die individuelle Deletion von Mfn2 (oder Mfn1) alleine phänotypisch normale Mäuse bis in das Erwachsenenalter zeigt, resultiert die kombinierte Deletion von Mfn1 und Mfn2 in einer rasch fortschreitenden letal-endenden dilatativen Kardiomyopathie [14, 18].

Transmissionselektromikroskopische Untersuchungen ergeben, dass nur Mfn2-, nicht Mfn1-defiziente Mäuse zur Entstehung größerer Lücken zwischen SR und Mitochondrien tendieren, welche die Kontaktlänge zwischen den beiden Organellen um ca. 30 % reduziert. In ähnlicher Weise sind in biochemischen Messungen des SR-mitochondrialen Kontakts die RyR-haltigen Mitochondrien-assoziierten Membranen bei Mfn2-Null-Mäusen auffällig verringert [12, 18]. Die verminderte Anbindung zwischen SR und Mitochondrien führt in Mfn2-defizienten (nicht aber Mfn1-defizienten) Kardiomyozyten zu erhöhten zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten, gleichzeitig ist die mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme bei fehlender Mfn2-Expression geringer. Folglich wird in Mfn2-Null-Mäusen die bioenergetische Regeneration von NADH und  $\text{FADH}_2$  (innerhalb des Citratzyklus) bei Veränderung der Arbeitslast (hervorgerufen durch Änderung der Stimulationsfrequenz und  $\beta$ -adrenerge Stimulation) beeinträchtigt. Diese vorübergehenden Oxidationen von NAD(P)H sind mit einem leichten Anstieg der mitochondrialen ROS-Bildung assoziiert, was das Konzept stützt, dass die mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme die antioxidative Kapazität der mitochondrialen Matrix steuert [18, 43].

Zusammenfassend nimmt Mfn2 innerhalb der Kardiomyozyte eine Schlüsselrolle ein, indem es Mitochondrien und SR im Sinne einer mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Mikrodomäne miteinander verknüpft. Der daraus resultierende  $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch zwischen SR und Mitochondrien gewährleistet eine sichere Energieversorgung der Kardiomyozyte und hemmt die Entstehung freier Radikale [18].

### 2.3 Pathophysiologie der Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz ist ein progressives Krankheitsbild, welches typischerweise durch ein „Indexereignis“ initiiert wird. Dieses Ereignis kann abrupt (z.B. Myokardinfarkt) oder schleichend (z.B. hämodynamische Druck- und Volumenüberlastung) auftreten, oder auf eine genetische Ursache (z.B. idiopathische dilatative Kardiomyopathie) zurückzuführen sein [25, 45]. Ungeachtet, ob die auslösende Ursache den irreversiblen Verlust von Kardiomyozyten oder die reduzierte Kontraktilität des Herzmuskelgewebes verantwortet, ist das gemeinsame Merkmal aller Ursachen, dass sie in gewisser Weise die Pumpfunktion des Herzens beeinträchtigen [45].

Die Kompensationsmechanismen, die nach der anfänglichen Abnahme der Pumpkapazität aktiviert werden, sind in der Lage die LV-Funktion innerhalb eines physiologischen Bereichs so zu modulieren, dass die funktionelle Kapazität des Patienten gar nicht oder nur minimal vermindert wird [45]. Hierzu zählen eine Reihe vasodilatatorisch wirkender Moleküle, einschließlich natriuretischer Peptide, Prostaglandine und NO [20, 21], die der vasokonstriktorischen Komponente des aktivierten sympathischen Nervensystems (SNS) und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) entgegentreten [22, 23]. Insbesondere die Aktivierung des SNS und RAAS sind verantwortlich für maladaptive Umbauprozesse, da sie mit einer gesteigerten Bildung von ROS innerhalb des Herzmuskelgewebes assoziiert sind und in Form von oxidativem Stress Schäden an Proteinen, Lipiden und der DNA verursachen (vgl. **Kapitel 2.2.3**) [50].

Obwohl Patienten mit verminderter Pumpfunktion über Jahre hinweg asymptomatisch oder minimal symptomatisch bleiben können, werden die Patienten ab einem gewissen Zeitpunkt symptomatisch, was zu einem deutlichen Anstieg der Morbidität und Mortalität führt. Der Übergang zu einer symptomatischen Herzinsuffizienz ist verknüpft mit einer weiteren Aktivierung des neurohormonalen Systems (SNS und RAAS) sowie einer Reihe adaptiver Veränderungen im Myokard [45], zu denen u.a. eine progressive LV-Dilatation, exzentrische Hypertrophie und Veränderung der LV-Geometrie von einer gestreckten Ellipse zu einem kugelförmigen Globus zählen [26]. Die Gesamtheit der Prozesse, die die Progression einer Herzinsuffizienz beinhalten, werden auch als „LV-Remodelling“ bezeichnet [26, 45].

## 2.4 Fragestellung der Arbeit

Ein gut funktionierendes Zusammenspiel zwischen den Myofilamenten als Motor der kontraktiven Funktion, den Mitochondrien, die das ATP sowohl für die Kontraktion als auch für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Wiederaufnahme in das SR bereitstellen sowie dem SR selbst, welches das für den gesamten Prozess benötigte  $\text{Ca}^{2+}$  bereithält, ist für eine physiologische Herzfunktion unverzichtbar [18]. Störungen innerhalb dieses fein abgestimmten Equilibriums [39] können die Entwicklung oder das Voranschreiten einer Herzinsuffizienz begünstigen.

Das Konzept, dass Mfn2 im Sinne einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Mikrodomäne zwischen ER und Mitochondrien agiert, ist in nicht-kardialen Zellen bereits gut etabliert [15]. Jüngste Ergebnisse zeigen [18], dass Mfn2 als Linkerprotein auch in kardialen Zellen im Sinne einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Mikrodomäne fungiert und somit die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transmission zwischen SR und Mitochondrien beeinflusst. Damit hat es einen Effekt auf die mitochondriale Bereitstellung von Energie, hemmt die Entstehung freier Sauerstoffradikale und ist möglicherweise mit der kontraktiven Funktion der Zelle verknüpft.

Die vorliegende Arbeit untersucht, inwiefern sich verschiedene Mfn2-Mutationen auf die mitochondriale Energetik und die Entwicklung einer Herzinsuffizienz auswirken. Dabei sollten folgende Fragen genauer beantwortet werden:

- Wie wirken sich spezifische Mfn2-Mutationen auf die Kontraktilität der Kardiomyozyte aus?
- Wie wirken sich spezifische Mfn2-Mutationen auf die mitochondriale Energetik aus?
- Wie wirken sich spezifische Mfn2-Mutationen auf die Entstehung freier Sauerstoffradikale aus?

### **3 Material**

#### **3.1 Versuchstiere**

In Kooperation mit dem Labor um Gerald W. Dorn, II (Washington University, Division of Biology and Biomedical Sciences, St. Louis, MO, USA) wurden uns die Versuchstiere bereitgestellt. Hierbei handelt es sich um verschiedene Zellreihen von Mäusen, die eine kardiomyozytenspezifische Expression entweder des Wildtyp Mfn2 (TG-WT) oder von Mfn2 mit einer Mutation, wie sie bei Patienten mit linksventrikulärer Hypertrophie vermehrt auftrat (TG-R400Q), aufweisen. Als Kontrollegruppen dienten jeweils nicht-transgene Mäuse (nTG). Die transgene Expression des WT oder R400Q Mfn2 wurde jeweils durch Western Blot Analysen verifiziert.

Die Tierhaltung erfolgte in Abstimmung mit der Tierschutzbeauftragten der Universität des Saarlandes (Dr. med. vet. Monika Frings) und gemäß den Vorgaben des Deutschen Tierschutzgesetzes.



## 3.2 Verwendete Substanzen

### 3.2.1 Chemikalien

Hersteller	Substanz	Chemische Formel	MM [g/mol]
Carl Roth GmbH, Karlsruhe	Natriumchlorid	NaCl	58
Merck, Darmstadt	Dinatriumhydrogenphosphat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	142
	Kaliumhydrogenphosphat	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136
	Magnesiumchlorid-Hexahydrat	MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	203
	Natriumdihydrogenphosphat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	138
Merck Schuchardt OHG, Hohen- brunn	Wasserstoffperoxid 30 %	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	34
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	2,3-Butandion-Monoxim	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	101
	D-(+)-Glukose	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	180
	FCCP	C <sub>10</sub> H <sub>5</sub> F <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O	254
	HEPES-Natriumsalz	C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> NaO <sub>4</sub> S	238
	Isoprenalin	C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>3</sub> · HCl	248
	Kaliumchlorid	KCl	75
	Kaliumhydrogencarbonat	KHCO <sub>3</sub>	101
	Calciumchlorid	CaCl <sub>2</sub>	110
	L-Ascorbinsäure	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	176
	Magnesiumsulfatheptahydrat	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	246
	Natriumcyanid	NaCN	49
	Natriumhydroxid	NaOH	40
	Natriumpyruvat	C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub>	110

## Material

	Phenolrot	$C_{19}H_{13}NaO_5S$	376
	Salzsäure	HCl	36
	Taurin	$NH_2CH_2CH_2SO_3H$	125
VWR, Leuven, Belgien	Natriumhydrogencarbonat	$NaHCO_3$	84
	Destilliertes Wasser	$H_2O$	18

**Tabelle 2:      Verwendete Chemikalien.**

### 3.2.2 Farbstoffe

Hersteller	Produkt	MM [g/mol]
Life Technologies, Carlsbad, CA, USA	2',7'-Dichlorfluorescein (DCF)	578

**Tabelle 3:      Verwendete Farbstoffe.**

### 3.2.3 Weitere Substanzen

Hersteller	Produkt
B. Braun Melsungen AG, Melsungen	Heparin-Natrium (5000 I.E./ml) Softasept N Hautdesinfektionsmittel
Life Technologies, Carlsbad, CA, USA	HEPES Pufferlösung (1M) Medium 199 + GlutaMAX Newborn Calf Serum (NCBS) Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	Trypsin (aus Schweinepankreas)
Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA	Liberase Blendzyme
Zoetis Deutschland GmbH, Berlin	Rimadyl (1 ml $\hat{=}$ 50 mg Carprofen)

**Tabelle 4: Verwendete weitere Substanzen.**

### 3.3 Geräte und Material

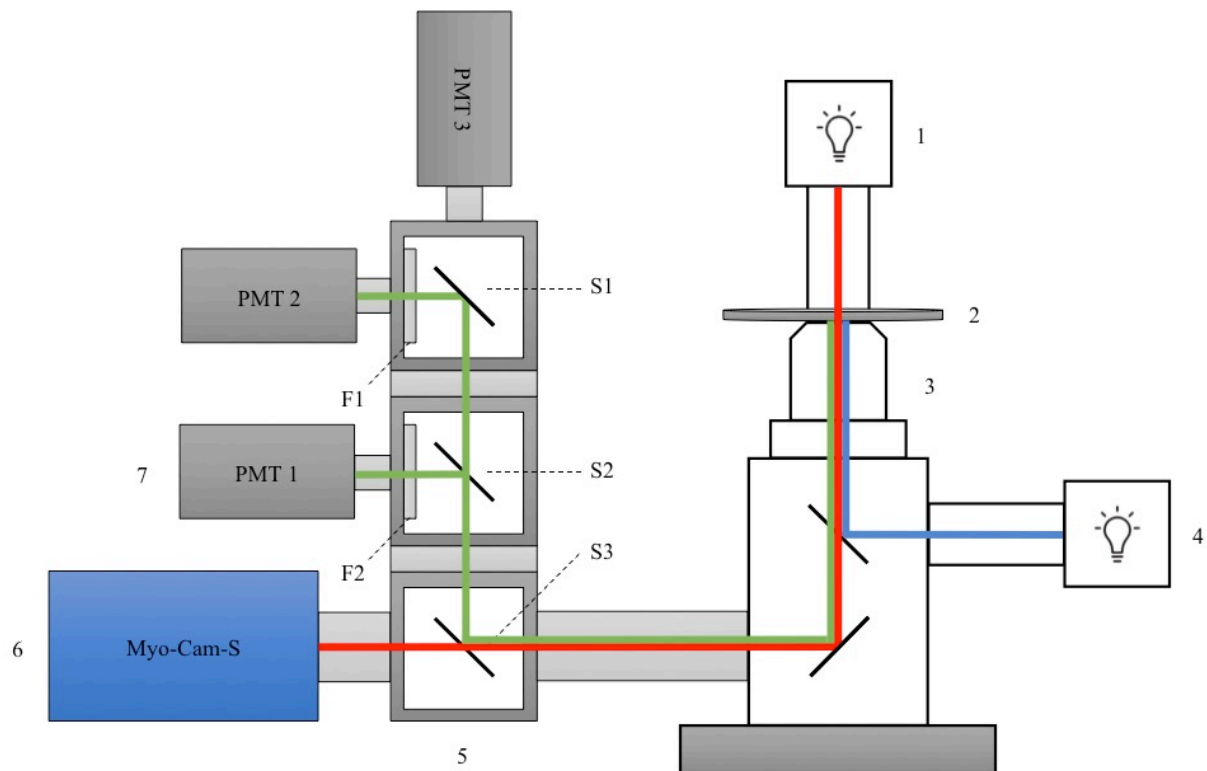
#### 3.3.1 Geräte zur Datenerhebung

Hersteller	Produkt
Dell GmbH, Frankfurt am Main	Computer und Monitor
IonOptix, Milton, MA, USA	CFA Option D: Dual Emission Option for CFA300 FSI700 Fluorescence System Interface CFA300 Cell Framing Adapter MCS100 Myo-Cam-S Digital Variable field rate CCD MUS200 $\mu$ Step Stand-Alone Filter Wheel and Controller PMT400 Photomultiplier Sub-System PTV100 PMT to Voltage Adapter Model TC-324B Heater Controller, Single Channel IONWZ IonWizard Core + Analysis (Software) SARCACQ SarcLen Messeinheit für Sarkomerlänge (Software)
Nikon GmbH, Düsseldorf	Mikroskop Nikon Ti-S/L100
Ushio Inc., Tokyo, Japan	Xenon Short Arc Lamp -75XE (75 W)
Warner Instruments, Hamden, CT, USA	Constant Current / Voltage Isolated Stimulators (DS2A / DS3) SIU-102 Stimulus Isolation Unit

**Tabelle 5: Verwendete Geräte zur Datenerhebung.**

### 3.3.2 Vereinfachter Aufbau des IonOptix-Systems, verwendete Spiegel und Filter

Alle Filter und Spiegel, die im Rahmen der Messungen genutzt wurden, sind Produkte der Firma Chroma Technology GmbH, Fürstentfeldbruck bzw. Chroma Technology Corp., VT, USA.



**Abbildung 5: Vereinfachter schematischer Aufbau des IonOptix-Systems.**

- 1 Lichtquelle 1 zur Durchlicht-Mikroskopie
- 2 Zellkammer, fixiert auf dem Mikroskoptisch
- 3 Mikroskop Nikon Ti-S/L100
- 4 Lichtquelle 2 (Xenon short arc lamp -75XE) und Filtrerrad zur Erzeugung gewünschter Exzitationswellenlängen
- 5 Säule, bestehend aus drei CFA300 Cell Framing Adaptern mit angeschlossener
- 6 Myo-Cam-S zur Detektion der Sarkomerlänge und angeschlossenen
- 7 PMT400 Photomultiplier Sub-Systemen (PMT) zur Detektion eines Fluoreszenzsignals
- F1 Filter D525/30x, durchlässig für Transmissionen im Bereich von  $525 \pm 15$  nm zur Detektion eines  $\text{FADH}_2$ - oder DCF-Signals
- F2 Filter D435/35x, durchlässig für Transmissionen im Bereich von  $435 \pm 17,5$  nm zur Detektion eines NADH-Signals

## Material

---

- S1 Reiner Spiegel, durchlässig für alle Transmissionen
- S2 Spiegel 490DLCP, <490 nm und >490 nm für NADH/FADH<sub>2</sub>
- S3 Spiegel 650DCXR, <650 nm und >650 nm für Durchlicht

Die Abbildung zeigt einen vereinfachten schematischen Aufbau der IonOptix-Anlage (modifiziert nach [www.ionoptix.com](http://www.ionoptix.com)).

Der in der **Abbildung 5** dargestellte rote Strahlengang schematisiert die Messung der Sarkomerlänge (vgl. **Kapitel 4.3.3**), die mittels der Myo-Cam-S detektiert werden. Das generierte Exzitationslicht, welches eine Schlüsselrolle für die Messung der Fluoreszenzen (vgl. **Kapitel 4.3.4**) spielt, wird mit dem blauen Strahlengang dargestellt, während der grüne Strahlengang das Emissionslicht darstellt, welche für Messungen eines FADH<sub>2</sub>- bzw. DCF-Signals in PMT 1 bzw. für Messungen des NADH-Signals in PMT 2 erfasst werden.

### 3.3.3 Software

Hersteller	Programm
GraphPad Software, La Jolla, CA, USA	GraphPad Prism 7.0
IonOptix, Milton, MA, USA	IonWizard 6.0
Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA	Microsoft Excel 2011 Microsoft PowerPoint 2011 Microsoft Word 2011

**Tabelle 6:      Verwendete Software.**

### 3.3.4 Instrumentarium

Hersteller	Produkt
B. Braun Melsungen AG, Melsungen	Pinzette zum Kanülieren, FD281R
Eppendorf AG, Hamburg	Pipette 0,5 - 10 µL Pipette 10 - 100 µL Pipette 100 - 1000 µL
Fine Science Tools GmbH, Heidelberg	Feinschere Pinzette zur Thorakotomie, 11272-30
Hugo Sachs Elektronik – Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten	Langendorff-Perfusionsanlage Aortic Cannula (Ø 1 mm)
VWR, Darmstadt	Schere 233-2121

**Tabelle 7:      Verwendetes Instrumentarium.**

### 3.3.5 Narkosesystem

Hersteller	Produkt
AbbVie Deutschland GmbH, Ludwigshafen	Forene 100 % (V/V); Wirkstoff: Isofluran
Hugo Sachs Elektronik – Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten	Anaesthesia Mask Fluovac Gas Evacuation System Keyfill Adapter Narkosekammer Oxygen Flowmeter Tube Adapter to Fluosorber Vaporizer Key Fill Isoflurane
Praxair, Düsseldorf	Sauerstoff (O <sub>2</sub> )

**Tabelle 8: Teile des verwendeten Narkosesystems.**



### 3.3.6 Sonstige Geräte

Hersteller	Produkt
Ingenieurbüro CAT, M. Zipperer GmbH, Staufen	Magnetrührer CAT 6.1
Ismatec, Wertheim-Mondfeld	Umwälzpumpe, Modell ISM834C
Kern & Sohn GmbH, Balingen	Feinwaage, ABS 120-4
Labnet International, NJ, USA	Vortex Mixer, SN 41119030
Lauda Dr. R. Wobser, Lauda-Königshofen	Lauda Ecoline Staredition Wärmethermostat mit Edelstahlbad und Variopumpe
Liebherr, Bulle, Schweiz	Gefrierschrank Kühlschrank
Nikon, Düsseldorf	Binokular, SMZ645
Schwarzer Precision, Essen	Vakuumpumpe SP302SA
Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe	Wärmeschrank Heraeus Thermo Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0 R
VWR, Darmstadt	pH-Meter, Eutech Instruments, pH 510 Zentrifuge Galaxy 16DH
WTW, Weilheim	pH Elektrode SenTix 22

**Tabelle 9:**      **Verwendete sonstige Geräte.**

### 3.3.7 Verbrauchsmaterial

Hersteller	Produkt
B. Braun Melsungen AG, Melsungen	Discofix C Dreiwegehahn Exadrop Tropfenregler mit Infusionsgerät Isotone Kochsalzlösung 0,9 % Original Perfusor Spritze 50ml Vasco Nitril white Einmalhandschuhe Wasser, vollentsalzt und destilliert (Aqua.dest.)
Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA	Falcon, Blue Max, 15 ml, 50 ml Polypropylene Conial Tube
Cargille Laboratories Inc., Cedar Grove, NJ, USA	Immersionsöl
Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt	Ethicon Mersilene Nahtmaterial, 5-0
Kurt Obermaier GmbH & Co. KG, Bad Berleburg	Korasilon-Paste, 35 g
VWR International, Darmstadt	Deckgläschen
Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA	Laminin
Sarstedt, Nümbrecht	Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl SafeSeal Reagiergefäße, 2ml
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	Ethanol
TPP, Trasadingen, Schweiz	Zellkulturschalen (Ø 60 x 15 mm) Zellkulturschalen (Ø 100 x 20 mm)

**Tabelle 10: Verwendetes Verbrauchsmaterial.**

## 4 Methodik

### 4.1 Isolation der Kardiomyozyten

#### 4.1.1 Vorgehensweise und verwendete Lösungen

Die im Rahmen der Isolation der Kardiomyozyten durchgeführte Organentnahme und enzymatische Lyse der Herzen erfolgte gemäß der Empfehlungen der *Alliance for Cellular Signaling* (AfCS) [52], welche wir an die Ansprüche und technischen Gegebenheiten unseres Labors modifiziert haben.

Folgende Lösungen werden beim Prozess der Isolation angewandt:

Lösung	Zusammensetzung
Isolutionslösung	H <sub>2</sub> O (250 ml) NaCl (113 mM) KCl (4,7 mM) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,6 mM) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,6 mM) MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (1,2 mM) Phenolrot (0,032 mM) NaHCO <sub>3</sub> (12 mM) KHCO <sub>3</sub> (10 mM) HEPES Pufferlösung (10 mM) Glucose (5,5 mM) Taurin (30 mM) 2,3-Butandion-Monoxim (10 mM)
Stopp-Puffer 1	Isolutionslösung (9 ml) NBCS (1,5 ml)

## Methodik

	CaCl <sub>2</sub> (12,5 µM)
Stopp-Puffer 2	Isolutionslösung (28,5 ml) NBCS (1,5 ml) CaCl <sub>2</sub> (12,5 µM)
Liberaselösung	Isolutionslösung (20 ml) Trypsin (40 µl; 70 mg/ml) CaCl <sub>2</sub> (12,5 µM) Liberase (1,44 mg)
Nährmedium	M199 + GlutaMAX (500 ml) NBCS (5 % ≙ 26,6 ml) Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml) HEPES Pufferlösung (10 mM)

**Tabelle 11: Zusammensetzungen der Lösungen für die Isolation.**

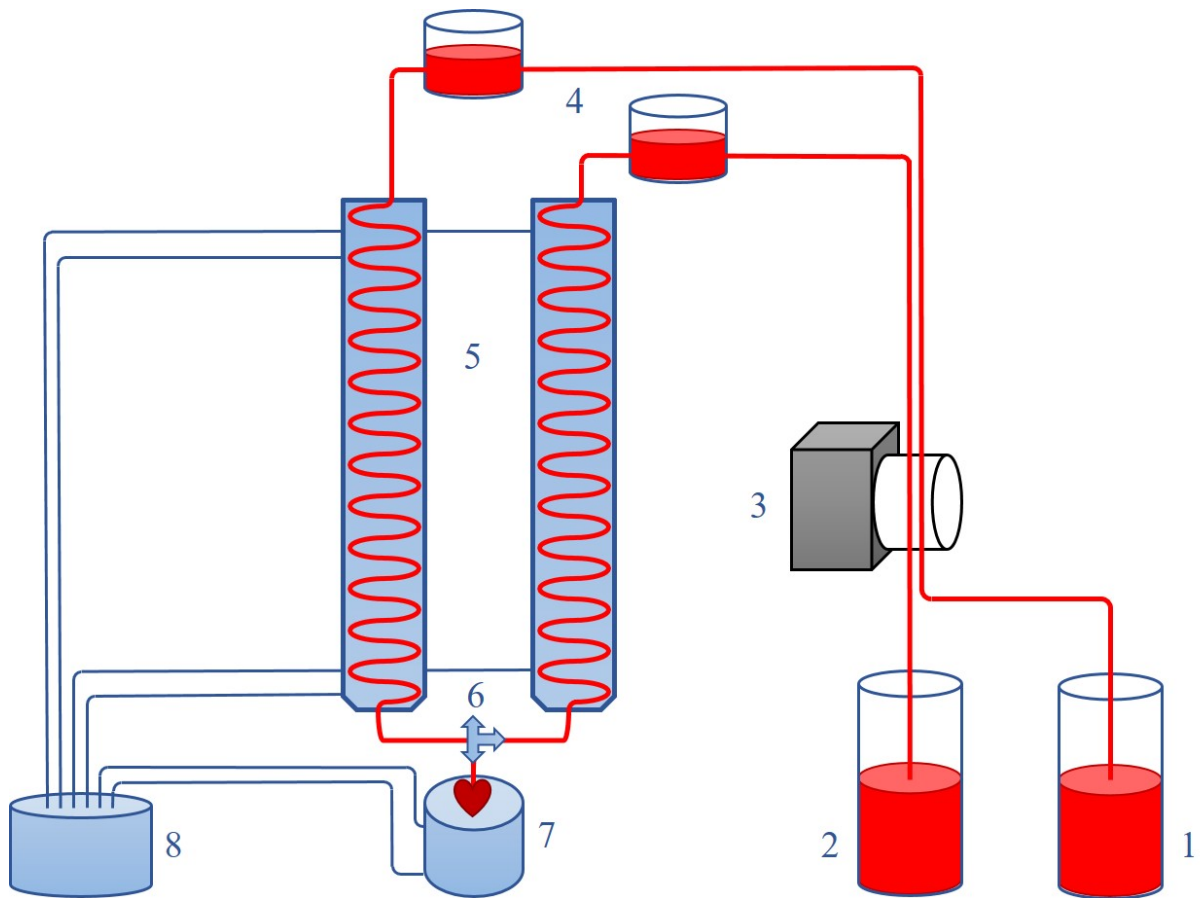
### 4.1.2 Herzexplantation

Vor der Explantation des Herzens werden der Maus subkutan im Bereich des Peritoneums 500 IE Heparin und 0,33 mg Carprofen appliziert; im Anschluss wird die Maus in die Narkosekammer gesetzt. Nach 5 min wird die Narkosekammer mit 5-% Isofluran und 100-% O<sub>2</sub> (Fluss 2,0 l/min, Druck 1 bar) geflutet. 60 – 120 s nach Einstrom des Narkosegases wird die schlafende Maus aus der Kammer herausgenommen und in Rückenlage auf dem Arbeitstisch fixiert, die Narkose wird dabei mit der Narkosemaske aufrechterhalten (5-% Isofluran und 100-% O<sub>2</sub> bei 0,5 l/min). Vor dem Eingriff wird die Narkosetiefe der Maus mithilfe des Zwischenzehenreflexes überprüft. Ist dieser Reflex erloschen, ist von einer suffizienten Narkosetiefe der Maus auszugehen. Nach Desinfektion der Schnittfläche kann bei

der nachfolgenden Laparo-Thorakotomie das Herz aus dem Mediastinum des Versuchstiers explantiert werden.

#### **4.1.3 Ablauf der Isolation**

Umgehend nach der Explantation wird das Herz in die Isolationslösung überführt, nicht-kardiales Gewebe wie etwa Lungen- oder Thymusreste werden entfernt. Über eine in der Zellkulturschale befestigte Kanüle wird das Herz unter Sicht des Binokulars durch die Aorta kanüliert und mittels Nahtmaterial fixiert. Durch sanftes Spülen mit 0,5 ml der Isolationslösung wird die korrekte Lage der Kanüle sichergestellt und mögliche Blutreste aus der Kammer entfernt. Über die Kanüle wird das Herz an die Langendorff-Perfusionsanlage angeschlossen und retrograd perfundiert. Dabei erfolgt zunächst ein Durchlauf der Isolationslösung für exakt 4:00 min, gefolgt vom Durchlauf der Liberaselösung für eine Dauer von mind. 5:00 min bis max. 7:20 min. Die durch die Umwälzpumpe erzeugte Flussrate liegt zu jeder Zeit bei 5,5.



**Abbildung 6: Aufbau der modifizierten Langendorff-Perfusionsanlage.**

- 1 Isolationslösung
- 2 Liberaselösung
- 3 Umwälzpumpe
- 4 Luftblasenfallen
- 5 Schlangenhalskühler
- 6 Dreiwegehahn
- 7 Wärmekammer mit aufgehängtem Herz
- 8 Wärmebad mit zirkulierendem Wasser (37 °C)

Darauf wird das Herz knapp unterhalb der Vorhöfe abgesetzt und in eine Zellkulturschale mit Isolationslösung gelegt. Um den folgenden Lösungen eine möglichst große Angriffsfläche zu bieten, wird das Herz viermal eingeschnitten und sternenförmig aufgefächert. Im direkten Anschluss wird das aufgeschnittene Herz in eine neue Zellkulturschale überführt. Durch sofortige Zugabe von exakt 5 ml Stopp-Puffer 1 wird eine weitere enzymatische Lyse des Herzens verhindert, indem die eventuell in Teilen verschleppte Liberaselösung nun am NBCS des Stopp-Puffers angreift. Die Lösung wird für mind. 3:00 min bis max. 8:00 min geschwenkt. Im Rahmen dieses Zeitfensters wird anhand der visuell abgeschätzten Anzahl der isolierten Kardiomyozyten entschieden, wann das Herz aus der Lösung entfernt wird und die Zellen in ein 15 ml Röhrchen überführt werden, wobei ein Tropfen der Zelllösung zur Begutachtung unter dem Mikroskop auf ein Deckgläschen aufgetragen wird. Das Röhrchen wird für 8:00 min aufgestellt, wodurch ein Pellet (1) und ein Überstand entstehen. Der Überstand wird in ein neues 15 ml Röhrchen überführt und für 1:00 min bei 800 U/min zentrifugiert, während man zum Pellet (1) 5 ml des Stopp-Puffers 2 gibt. Der nach der Zentrifugation entstehende Überstand wird verworfen, zu dem neu entstandenen Pellet (2) werden ebenfalls 5 ml des Stopp-Puffers 2 dazugegeben. Beide Pellets werden in einer Zellkulturschale für den Calciumaufbau vereint.

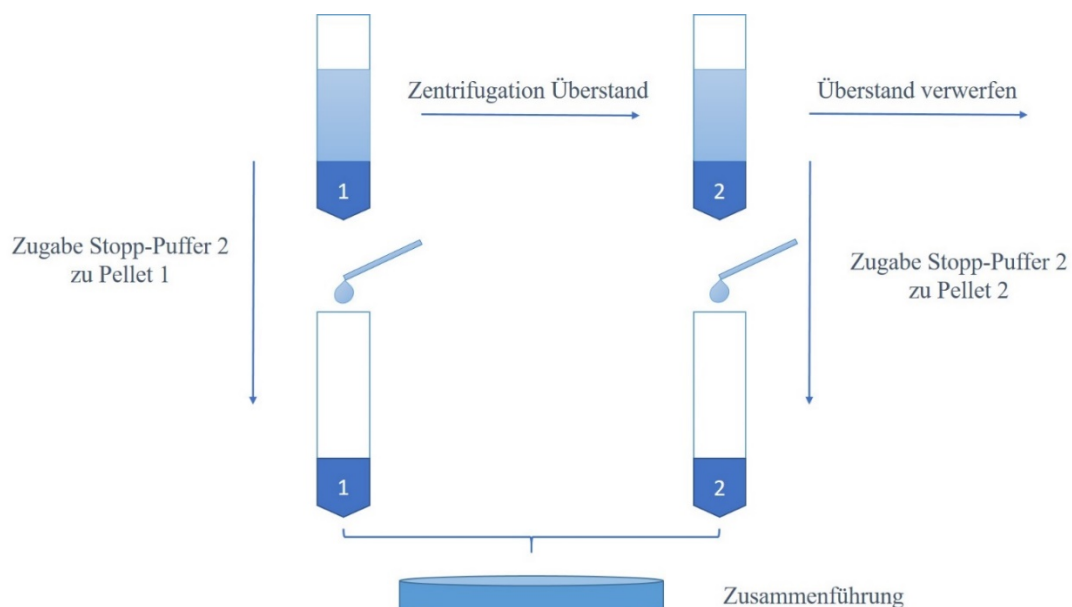


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Ablaufs der Zusammenführung.

#### 4.1.4 Calciumaufbau

Beim Calciumaufbau wird periodisch die Calciumkonzentration der Lösung, in der sich die frisch isolierten Kardiomyozyten befinden, erhöht. Die langsame Steigerung der Konzentration verhindert eine Calciumüberladung der Zelle und einer damit verbundenen frühzeitigen Apoptose. Für den Aufbau wird alle 4:00 min eine neue Calciumlösung zur Zellkulturschale hinzugegeben und die Schale dabei in Form einer „8“ geschwenkt.

Folgende Calciumlösungen werden zugeführt:

	Zeitpunkt	Calciumlösung
<b>I</b>	0. Minute	50 µl mit 10 mM CaCl <sub>2</sub> -Lösung
<b>II</b>	4. Minute	50 µl mit 10 mM CaCl <sub>2</sub> -Lösung
<b>III</b>	8. Minute	100 µl mit 10 mM CaCl <sub>2</sub> -Lösung
<b>IV</b>	12. Minute	30 µl mit 100 mM CaCl <sub>2</sub> -Lösung
<b>V</b>	16. Minute	50 µl mit 100 mM CaCl <sub>2</sub> -Lösung

**Tabelle 12:** Zeitpunkte der zugeführten Calciumlösungen.

Die finale Konzentration der entstandenen Lösung beträgt 1 mM. Diese wird in ein 15 ml Röhrchen übertragen und für 8:00 min aufgestellt. Der Überstand wird auch hier für 1:00 min bei 800 U/min zentrifugiert. In einer Zellkulturschale werden beide Pellets nach Zugabe des Nährmediums vereint und bis zur Nutzung in den Versuchen im Brutschrank bei 37 °C und 5 %-CO<sub>2</sub> belassen.

Die im Prozess der Isolation gewonnenen Kardiomyozyten stehen ausschließlich am Tag der Entnahme der Messung zur Verfügung; keine Zellen werden kultiviert oder stehen zu einem anderem Zeitpunkt außer dem Zeitraum der Messung für Experimente parat.



## 4.2 Vorbereitende Maßnahmen im Rahmen der Messung

### 4.2.1 Vorbereitung der Lösungen

An jedem einzelnen Messtag werden die Normaltyrode-1 (NT-1) bzw. Normaltyrode-2 (NT-2) frisch angesetzt. Die Normaltyroden (NT) sind Elektrolytlösungen, die der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix des Herzens ähneln, sodass sich die isolierten Kardiomyozyten während der Messung in einem möglichst physiologischen Milieu befinden. Der Unterschied zwischen den beiden NTs besteht darin, dass in der NT-1 die Antioxidantien L-Ascorbinsäure und Natriumpyruvat enthalten sind. Diese Antioxidantien fehlen der NT-2, da diese die bei Versuchen mit dem Färbemittel DCF entstehenden ROS (vgl. **Kapitel 4.3.4.2**) abfangen und die Messungen damit verfälschen würden.

Die Zusammensetzungen der NTs ergeben sich wie folgt:

Lösung	Zusammensetzung
NT-1	NaCl (130 mM) KCl (5 mM) MgCl <sub>2</sub> (1 mM) HEPES-Natriumsalz (10 mM) Natriumpyruvat (2 mM) L-Ascorbinsäure (0,3 mM) D-(+)-Glukose (10 mM) CaCl <sub>2</sub> (1 mM)
NT-2	NaCl (130 mM) KCl (5 mM) MgCl <sub>2</sub> (1 mM) HEPES-Natriumsalz (10 mM) D-(+)-Glukose (10 mM) CaCl <sub>2</sub> (1 mM)

**Tabelle 13:** Zusammensetzungen der NT-1 und NT-2.

Bei der Herstellung von NT-1 und NT-2 muss vor Zugabe des Calciumchlorids ( $\text{CaCl}_2$ ) ein Ausgleich des pH-Wertes der Lösung auf pH 7,5 bei Raumtemperatur eingestellt werden. Die Titration erfolgt unter Verwendung des pH-Meters bei einer basischen Lösung mit HCl (1 M), bei einer sauren Lösung mit NaOH (1 M).

Des Weiteren dienen die NTs als Trägermaterial für andere Substanzen, die während der Messung in die Zellkammer eingespült werden. Die Substanzen werden dabei in jeweils 50 ml NT-1 bzw. NT-2 gelöst:

Lösung	Gelöste Substanz
ISO	Isoprenalin (30 nM)
FCCP	FCCP (5 $\mu\text{M}$ )
CN	Natriumcyanid (4 mM)
$\text{H}_2\text{O}_2$	$\text{H}_2\text{O}_2$ (10 mM)

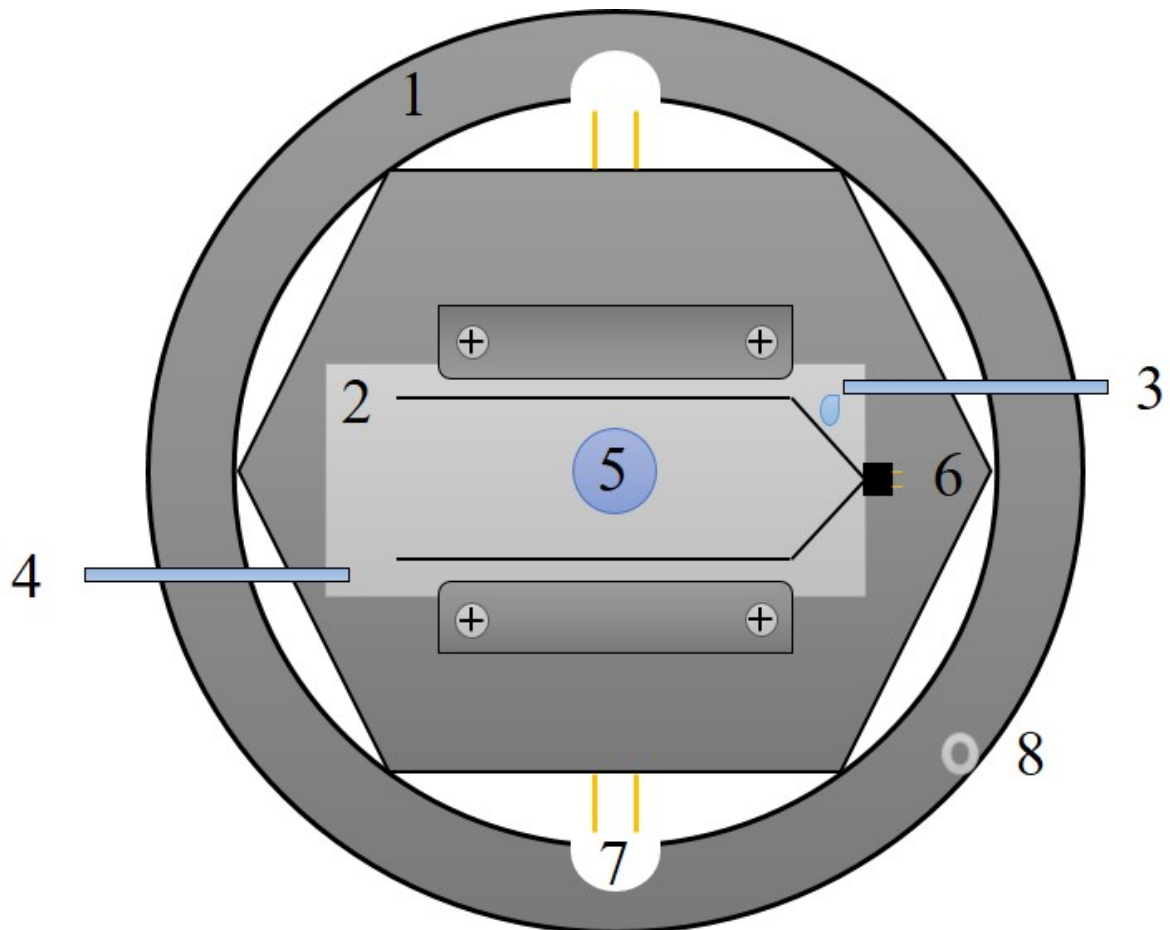
**Tabelle 14:** Zusammensetzung der Einspüllösungen.

#### 4.2.2 Vorbereitung der Messung

Die Zellkulturschale mit den isolierten Kardiomyozyten wird dem Brutschrank entnommen und in die Sterilbank überführt. Dort wird 1 ml der Zellsuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Native Zellen können umgehend gemessen werden. Sollten die Zellen mit dem Farbstoff DCF (vgl. **Kapitel 4.3.4.2**) beladen werden, wird die Zellsuspension im Reaktionsgefäß zunächst für 5:00 min unter der Sterilbank aufgestellt. Nach Entfernung des Überstandes führt man dem Pellet 1 ml NT-2 und 0,5 - 4,0  $\mu\text{l}$  DCF zu. Nachfolgend werden im Brutschrank die Zellen zunächst 15:00 min liegend, dann 5:00 min stehend inkubiert, ehe man dann den Überstand entfernt und erneut 1,5 ml NT-2 auf das Pellet gibt. Die gefärbten Zellen sind nun bereit für die Messung.

Auf ein Deckgläschen werden mittig 4  $\mu\text{l}$  Laminin aufgetragen und verstrichen, welches nach ca. 5:00 min getrocknet ist. Das Deckgläschen wird in die beheizbare Plattform eingesetzt, die Unterseite der Messkammer mit Silikon abgedichtet, die Messkammer auf das Deckgläschen

aufgesetzt und mit vier Schrauben in der Plattform fixiert. Durch das Auftragen von 300  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension heften sich die isolierten Kardiomyozyten nach weiteren 5:00 min an das Laminin an. Nachdem man einen Tropfen des Immersionsöls auf das Objektiv aufgetragen hat, kann man nun die gesamte Messkammer in das Mikroskop einsetzen und den Zu- und Ablauf, die Stimulation, den Temperaturfühler und die Heizung anschließen.



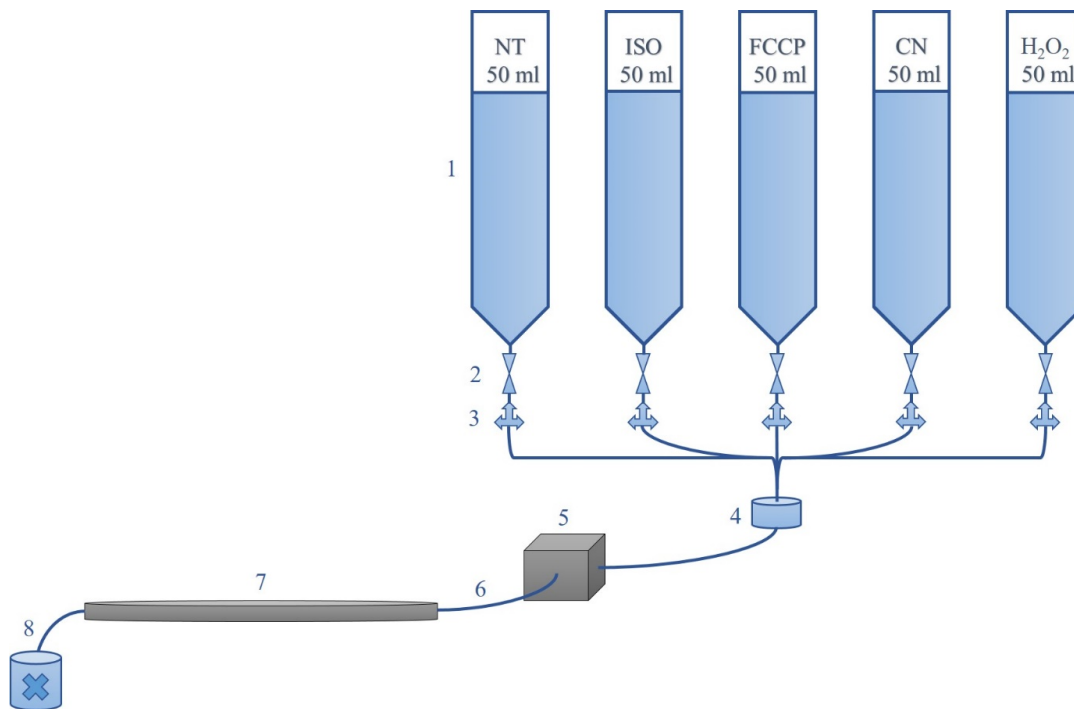
**Abbildung 8: Aufbau der Messkammer.**

- 1 Beheizbare Plattform
- 2 Messkammer mit Deckgläschen
- 3 Zulauf der Einspüllösungen
- 4 Ablauf
- 5 Auf Laminin aufgetragene Zellen
- 6 Elektrische Stimulation
- 7 Heizung
- 8 Anschluss des Temperaturfühlers

### 4.2.3 Vorbereitung des Messplatzes

Am Messplatz werden der Computer und alle Geräte, die im Gebrauch mit der IonOptix zusammenhängen, angeschaltet und hochgefahren. Das Programm IonWizard 6.0 wird gestartet und das der Versuchsreihe entsprechende Setup geladen.

Des Weiteren werden die Lösungen (vgl. **Kapitel 4.2.1**) in das Zulaufsystem gefüllt, die Flussgeschwindigkeit mithilfe der Regelventile eingestellt, der Heizkörper für die einfließenden Lösungen eingeschaltet und der Zulauf mit der Messkammer verbunden. Durch den Anschluss der Vakuumpumpe mit dem Ablauf ist ein konstanter Flüssigkeitsspiegel in der Kammer garantiert.



**Abbildung 9:** Aufbau des Zu- und Ablaufsystems.

- |   |                            |
|---|----------------------------|
| 1 | Gefäße mit Einspüllösungen |
| 2 | Regelventil                |
| 3 | Dreiwegehahn               |
| 4 | Zusammenführung            |
| 5 | Heizkörper                 |
| 6 | Zulauf                     |
| 7 | Messkammer                 |
| 8 | Ablauf mit Vakuumpumpe     |

Um mögliche Interferenzen bei der Fluoreszenzmessung so gering wie möglich zu halten, werden die Messungen in einem Dunkelraum bei Rotlicht durchgeführt und die Messkammer zusätzlich abgeschirmt.

## 4.3 Ablauf der Messung

### 4.3.1 Positionierung einer Kardiomyozyte

Unter Sicht im Mikroskop der IonOptix wird eine Kardiomyozyte aufgesucht, die bestimmten Kriterien im Vorfeld der Messung entsprechen muss. Zu diesen Kriterien zählen u.a. eine ausreichende Größe bei stabförmiger Morphologie, keine Schädigung der Zellmembran, klare Querstreifung und ausschließlich bei elektrischer Stimulation kontrahierend. Zusätzlich darf die Kardiomyozyte nicht von anderen Zellen überlagert sein und es dürfen sich keine luftgefüllten Vakuolen im unmittelbaren Bereich der Zelle befinden. Sobald diese Anforderungen erfüllt sind, wird die Zelle mithilfe des XY-Tisches und mit der um 270° drehbaren MyoCam in eine waagerechte Position gebracht. Abschließend wird der Messbereich durch Blenden abgeschirmt.

### 4.3.2 Messprotokoll

Die Messreihen sind an allen Zellen, unabhängig davon ob nativ oder gefärbt, nach einem einheitlichen Messprotokoll vollzogen worden. Das Protokoll unterteilt sich in eine Mess- und Kalibrierungsphase.

#### Messphase:

	<b>Lösung</b>	<b>Dauer [s]</b>	<b>Frequenz [Hz]</b>
<b>I</b>	NT-1 bzw. NT-2	120	0,5
<b>II</b>	ISO	bis Wirkeintritt	0,5
<b>III</b>	ISO	180	5
<b>IV</b>	NT-1 bzw. NT-2	60	0,5

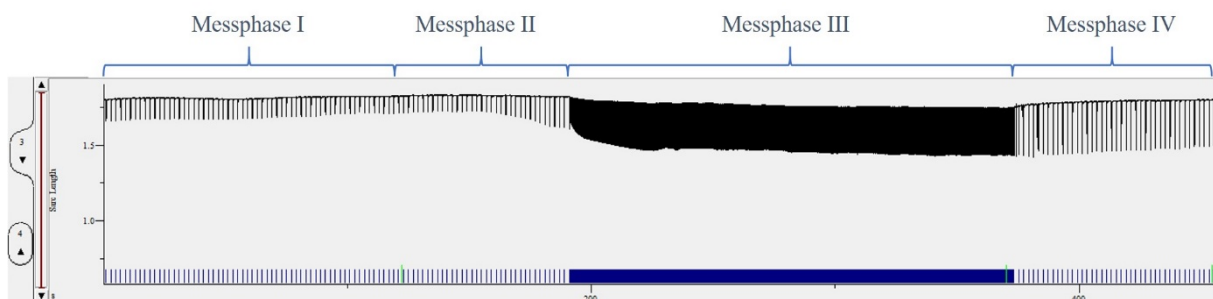
**Tabelle 15: Ablauf der Messphase.**

**Kalibrierungsphase:**

	Lösung	Dauer [s]	Frequenz [Hz]
I'	FCCP	bis 100 % Wirkung	0,5
II'	CN	bis 100 % Wirkung	0,5
III'	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	bis 100 % Wirkung	0,5

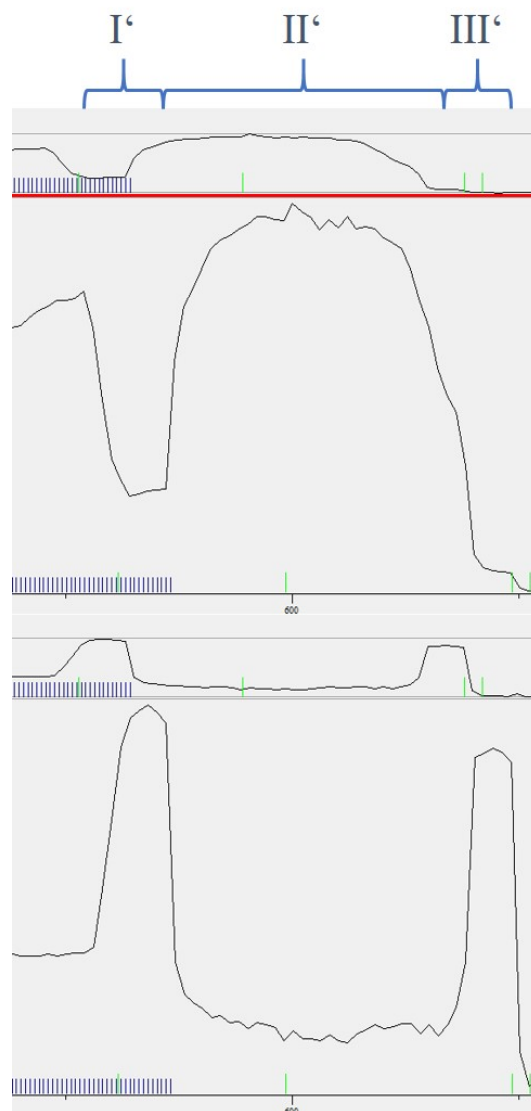
**Tabelle 16:** Ablauf der Kalibrierungsphase.

In der ersten Phase der Messung (I) wird die positionierte Kardiomyozyte in der beheizten Zellkammer (37 °C) bei eingeschalteter Stimulation von 0,5 Hz mit erwärmter NT-1 bzw. NT-2 Lösung für 120 s umspült. Unter anhaltender Stimulation bei 0,5 Hz wird eine  $\beta$ -adrenerge Stimulation durch den Einlauf von Isoprenalin (II) simuliert. Kommt es nach etwa 40 – 90 s zum Wirkeintritt der Substanz, wird die Zelle für weitere 180 s mit einer Frequenz von 5 Hz stimuliert (III). Abschließend wird Isoprenalin für 60 s bei 0,5 Hz durch die erneute Zuführung von NT-1 bzw. NT-2 Lösung aus der Zellkammer ausgewaschen (IV).

**Abbildung 10:** Beispielhafter Ablauf der Messphase anhand der Zelle 151021 Z1.

Bei der anschließenden Kalibrierungsphase wird die Stimulation bei einer Frequenz von 0,5 Hz zu jedem Zeitpunkt fortgeführt. Jede Lösung wird so lange in das System eingespült, bis sich ihr Wirkeintritt – in der Regel nach wenigen Sekunden – bemerkbar macht. Dies äußert sich bei FCCP (I') durch starken Abfall des NAD(P)H-Signals (0 %) und steilen Anstieg des FAD-Signals (100 %), bei CN (II') durch einen steilen Anstieg des NAD(P)H-Signals (100 %) bei gleichzeitigem starken Abfall des FAD-Signals (0 %), bei H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (III')

durch einen erneuten starken Abfall des NAD(P)H-Signals und steilen Anstieg des FAD-Signals. Der Abschluss der Kalibrierung ist u.U. mit dem Tod der Zelle verbunden. Um den Umgebungsbereich der Zelle zu berechnen, erfolgt am Ende jedes Messprotokolls die Messung des Hintergrundes. Hierfür wird der zuvor eingestellte Messbereich freigelegt, indem mithilfe einer Pipette die zuvor positionierte Kardiomyozyte fortgeschwemmt und der freie Bereich für insgesamt 2-3 s gemessen wird.



**Abbildung 11: Beispielhafter Ablauf der Kalibrierungsphase anhand der Zelle 151021 Z9.**



Während des gesamten Versuches werden die Sarkomerlänge und die Fluoreszenz der Kardiomyozyte mit dem Programm IonWizard 6.0 aufgezeichnet und in Echtzeit auf dem Computer wiedergegeben. Die Visualisierung ermöglicht ein promptes Umstellen der Frequenz oder einer Einspüllösung bei sichtbarem Wirkeintritt einer Substanz.

Bei allen Messungen werden NAD(P)H und FAD alle 4 s (über 0,150 s) gemittelt, die Abtastrate (Samplingfrequenz) der aufzeichnenden Kamera liegt stets bei 250 Hz.

### 4.3.3 Messung der Zellkontraktilität

Die elektrische Stimulation der isolierten Kardiomyozyte führt zu rhythmischen Kontraktionen, wobei die dabei entstehenden Veränderungen der Sarkomerlängen dank der IonOptix über den gesamten Zeitraum der Messung aufgezeichnet und dokumentiert werden. Neben der Aufzeichnung der diastolischen und systolischen Sarkomerlänge ermöglicht eine weiterführende Transientenanalyse das Erheben weiterer Kontraktionsparameter, wobei weitere Verkürzungs- (Baseline, Peak, Fractional Shortening) und kinetische Parameter (Zeit zu Maximum, TTP; Zeit bis zur 50%igen bzw. 90%igen Abnahme, RT50 bzw. RT90) erfasst werden.

Da der Wirkeintritt von Isoprenalin, wie in **Kapitel 4.3.2** bereits erwähnt, zeitlichen Variationen unterliegt, erfolgt die Auswertung der Kontraktionsparameter zur besseren Vergleichbarkeit der Einzelmessungen zu bestimmten Messpunkten während des Messprotokolls:

	<b>Phasenbezeichnung</b>	<b>Messpunkt</b>
<b>I</b>	NT – vor ISO	Unmittelbar vor Wechsel auf ISO
<b>II</b>	ISO – vor 5 Hz	Unmittelbar vor Umstellung auf 5 Hz
<b>III</b>	ISO – Ende 5 Hz	Unmittelbar vor Wechsel auf NT und Umstellung auf 0,5 Hz
<b>IV</b>	NT – 60 s nach 5 Hz	60 s nach 5 Hz

**Tabelle 17: Messpunkte zur Auswertung der Kontraktionsparameter.**



### 4.3.4 Messung der Fluoreszenzen

#### 4.3.4.1 NAD(P)H und FADH<sub>2</sub>

Die durch die Vielzahl der Vorgänge während der ECC verbrauchte Energie in Form von ATP wird in den Mitochondrien durch oxidative Phosphorylierung regeneriert, indem reduziertes NADH und FADH<sub>2</sub> an den Komplexen I und II der Atmungskette zu NAD<sup>+</sup> bzw. FAD oxidiert werden [80]. Die Messung der Autofluoreszenzen NADH und NADPH, zusammengefasst als NAD(P)H, sowie der Autofluoreszenz von FAD geben Aufschluss über den Reduktions- und Oxidationsstatus der Kardiomyozyte und spiegeln den kardialen Energiehaushalt wider.

Durch Anregung der Redoxäquivalente bei spezifischen Wellenlängen ( $\lambda$ ) entstehen die Autofluoreszenzen, die durch das PMT der IonOptix erfasst werden. Dabei erfolgt die Anregung von NAD(P)H bei  $\lambda = 340$  nm, seine Emissionen wird bei  $\lambda = 450$  nm erfasst. FAD wird bei  $\lambda = 485$  nm angeregt und seine Emissionen bei  $\lambda = 525$  nm aufgezeichnet.

Redoxäquivalent	Anregung [nm]	Emission [nm]	Bemerkung
FAD	485	525	-
FADH <sub>2</sub>	485	525	Kaum Emissionen
NAD <sup>+</sup>	340	450	Kaum Emissionen
NAD(P)H	340	450	-

**Tabelle 18:** Übersicht der Anregungs- und Emissionsmaxima der Redoxäquivalente.

Das Verhältnis NAD(P)H/FAD ist somit ein sensibler und ratiometrischer Index des mitochondrialen Redoxstatus und somit auch der Atmungskette, deren Redoxstatus mit dem der Flavindinukleotide im Gleichgewicht steht [12].

Während der Messphasen I-IV zeigen sich stetig leichte Änderungen der Fluoreszenzsignale NAD(P)H und FAD, welche die Änderungen des intrazellulären Reduktions- und Oxidationsstatus widerspiegeln. In der Kalibrierungsphase wird die Zelle durch FCCP (I<sup>'</sup>) maximal oxidiert, d.h., dass das NAD(P)H-Signal maximal abfällt (0 %), während das FAD-Signal maximal ansteigt (100 %). Ein gegenteiliger Effekt (NAD(P)H-Signal: 100 %; FAD-

Signal 0 %) wird durch das Einfließen von CN (II<sup>'</sup>) erzielt. Durch das Einspülen der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (III<sup>'</sup>) findet am Ende der Messung der nativen Zellen eine Kontrolle der mitochondrialen Transhydrogenase (Nnt) statt, ein antioxidatives Schlüsselenzym, welches NAD(P)H aus NADH regeneriert [51]. Nach Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kommt es zu einem Verbrauch von NADPH (über Glutathion-Peroxidase und das Peroxiredoxin/Thioredoxin System), und NADPH wird über die Nnt aus NADH regeneriert.

#### 4.3.4.2 DCF

Der oxidationssensitive Farbstoff DCF ermöglicht es ROS, die während des Zellstoffwechsels in Form von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sup>-</sup> und NO<sup>-</sup> anfallen, messbar zu machen. Infolge der Spaltung der Acetatgruppen der Ausgangssubstanz durch intrazelluläre Esterasen sowie der Reaktion der thiolreaktiven Chlormethylgruppe mit intrazellulärem Glutathion und anderen Thiolen entsteht aus dem nicht-fluoreszierenden Edukt ein fluoreszierendes Produkt, dessen Emissionen im Bereich von 517-527 nm bei einer Anregung von 492-495 nm für die IonOptix detektierbar wird ([www.thermofischer.com](http://www.thermofischer.com)) [78].

Im Vorfeld einer Messung mit DCF ist von entscheidender Bedeutung, dass die Konzentration des Färbemittels so gering wie möglich gehalten wird, um potenzielle Artefakte durch Überladung, Hydrolyse und hydrolytisch-entstehende toxische Nebenprodukte so gering wie möglich zu halten. Nichtsdestotrotz sind spontane Artefakte aufgrund atmosphärisch- und lichtinduzierter Oxidationen möglich ([www.thermofischer.com](http://www.thermofischer.com)).

Während der Messphasen I-IV zeigt sich mit DCF eine sukzessive Steigerung des Fluoreszenzsignals im Verlauf der Zeit. In der Kalibrierungsphase kommt es durch FCCP (I<sup>'</sup>) oder CN (II<sup>'</sup>) zu moderaten Veränderungen der DCF Fluoreszenz [36]. Hier ist jedoch zu berücksichtigen, dass die DCF Fluoreszenz die gleiche Anregungs- und Emissionswellenlänge aufweist wie die Autofluoreszenz von FAD, was die Diskriminierung zwischen FAD-Oxidation und tatsächlichen ROS erschwert. Die Positiv-Kontrolle der Messung findet am Ende des Protokolls durch das Einspülen der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (III<sup>'</sup>) statt.

#### 4.4 Statistische Auswertung und graphische Darstellung

Für die weitere Aufarbeitung werden die erfassten Daten in eine spezielle Tabellenkalkulation in Microsoft Excel, bereitgestellt von Dr. rer. nat. Michael Kohlhaas, übertragen. Dabei werden bei den Fluoreszenzmessungen von NAD(P)H und FAD sowie DCF die im Programm IonWizard 6.0 erhobenen Messdaten anhand der 5-Hz-Sequenzen synchronisiert und mittels der Kalibrierung normiert. Für die Berechnungen werden alle erhobenen Messwerte im Zeitraum von 120 s vor ISO-Einspülung bis 60 s nach ISO-Einspülung berücksichtigt. Für die Auswertung der Zellkontraktilität werden 3-8 Kontraktionen zu den vier bestimmten Zeitpunkten (vgl. **Kapitel 4.3.3** sowie **Tabelle 17**) einer Transientenanalyse unterzogen, wobei speziell die Messwerte der diastolischen und systolischen Zelllänge, der fraktionellen Sarkomerverkürzung (*engl.: Fractional Shortening*, FS), der TTP und der Relaxationszeiten (RT50 bzw. RT90) berücksichtigt werden. Die Grafiken werden mithilfe des Programms GraphPad Prism 7.0 erstellt.

Durch eine Zweiweg-Varianzanalyse (zweifaktorielle ANOVA) mit Bonferroni Posttest bzw. einem gepaarten oder ungepaarten t-Test wird die statistische Signifikanz der Ergebnisse ermittelt, wobei Unterschiede von  $p < 0,05$  als statistisch signifikant gelten. Die Daten werden in Form des arithmetischen Mittelwerts (MW) mit zugehörigem Standardfehler (*engl.: Standard Error of the Mean*, SEM) angegeben ( $MW \pm SEM$ ).

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Grundlegende Voraussetzungen für die Erhebung der verschiedenen Teilergebnisse

#### 5.1.1 Zellkontraktilität

Die Ergebnisse der Zellkontraktilität der nTG-, TG-WT- und TG-R400Q-Zellreihen gehen ausschließlich aus den erhobenen Daten derjenigen Messungen hervor, in denen native und ungefärbte Kardiomyozyten dem einheitlichen Messprotokoll (vgl. **Kapitel 4.3.2**) unterzogen wurden. Als Maß der Zellkontraktilität werden die diastolischen und systolischen Sarkomerlängen sowie die FS zu den Messpunkten I-IV (vgl. **Kapitel 4.3.3** sowie **Tabelle 17**) zwischen den Gruppen herangezogen.

#### 5.1.2 Reduktions- und Oxidationsstatus

Die photometrische Messung der Autofluoreszenzen von  $\text{NAD(P)H/NAD(P)}^+$  und  $\text{FADH}_2/\text{FAD}$  ermöglicht die Erfassung der dynamischen Veränderungen des Reduktions- und Oxidationsstatus (kurz: Redoxstatus) innerhalb der Kardiomyozyte und spiegelt damit ihren myokardialen Energiehaushalt wider.

Die Untersuchungen wurden anhand des in **Kapitel 4.3.2** beschriebenen Messprotokolls an nativen und ungefärbten Kardiomyozyten durchgeführt. Zur Vergleichbarkeit der Zellen erfolgt am Ende jedes Protokolls die Kalibrierung, bei der durch das Einspülen von FCCP und CN die jeweiligen Minimal- und Maximalwerte (0 % NADH und 100 % FAD durch FCCP; 100 % NADH und 0 % FAD durch CN) bestimmt werden (vgl. **Kapitel 4.3.4.1**); die Angabe des Redoxstatus erfolgt in Prozent.

### 5.1.3 DCF-Farbstoffmessung

Um die im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung gebildeten Sauerstoffradikale (u.a.  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}^-$  und  $\text{NO}^-$ ) innerhalb der Herzmuskelzelle zu detektieren, eignet sich der Farbstoff DCF, durch dessen Oxidation in ein fluoreszierendes Produkt es ermöglicht, den Verlauf der Entstehung freier Radikaler innerhalb der Zelle zu beobachten und dokumentieren (vgl. **Kapitel 4.3.4.2**).

Alle Zellen wurden vor der Messung mit dem Farbstoff beladen (vgl. **Kapitel 4.2.2**) und im Anschluss dem einheitlichen Messprotokoll (vgl. **Kapitel 4.3.2**) unterzogen.



## 5.2 Versuchsreihe nTG- vs. TG-WT-Kardiomyozyten

### 5.2.1 Vergleich der Zellkontraktilität

Die Kontraktionsparameter der nTG- und TG-WT-Kardiomyozyten sind nahezu identisch (vgl. **Abbildung 13**, oben). Die diastolischen und systolischen Ausgangswerte beider Gruppen sind beim Einspülen von NT bei einer Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz (Messpunkt I) kaum unterschiedlich. Unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin kommt es bei 0,5 Hz zu einer initial geringfügigen Steigerung der Sarkomerverkürzung (II), welche durch Erhöhung der Stimulationsfrequenz auf 5 Hz ihre maximale Verkürzung (III) erreicht. Beim anschließenden Auswaschen (*engl.: Washout*, WO) der  $\beta$ -adrenergen Substanz und Reduktion der Stimulation auf 0,5 Hz nähern sich beide Gruppen ihren basalen Ausgangswerten an.

Die FS beschreibt die Verkürzung der Zelle bei Kontraktion in Prozent von der basalen Zelllänge (*engl.: Baseline*). Die verglichenen nTG- und TG-WT-Kardiomyozyten zeigen in ihren basalen Ausgangswerten (I) keine Differenzen. Auch hier kommt es unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation zu einem Anstieg der prozentuellen Zellverkürzung (gelb hinterlegter Bereich zwischen II und III) ohne Unterschiede zwischen nTG- und TG-WT Zellen. Beim abschließenden WO (IV) verzeichnen beide Gruppen keinen weiteren Anstieg, und auch hier ergibt sich kein Unterscheid zwischen den Gruppen (vgl. **Abbildung 13**, unten).

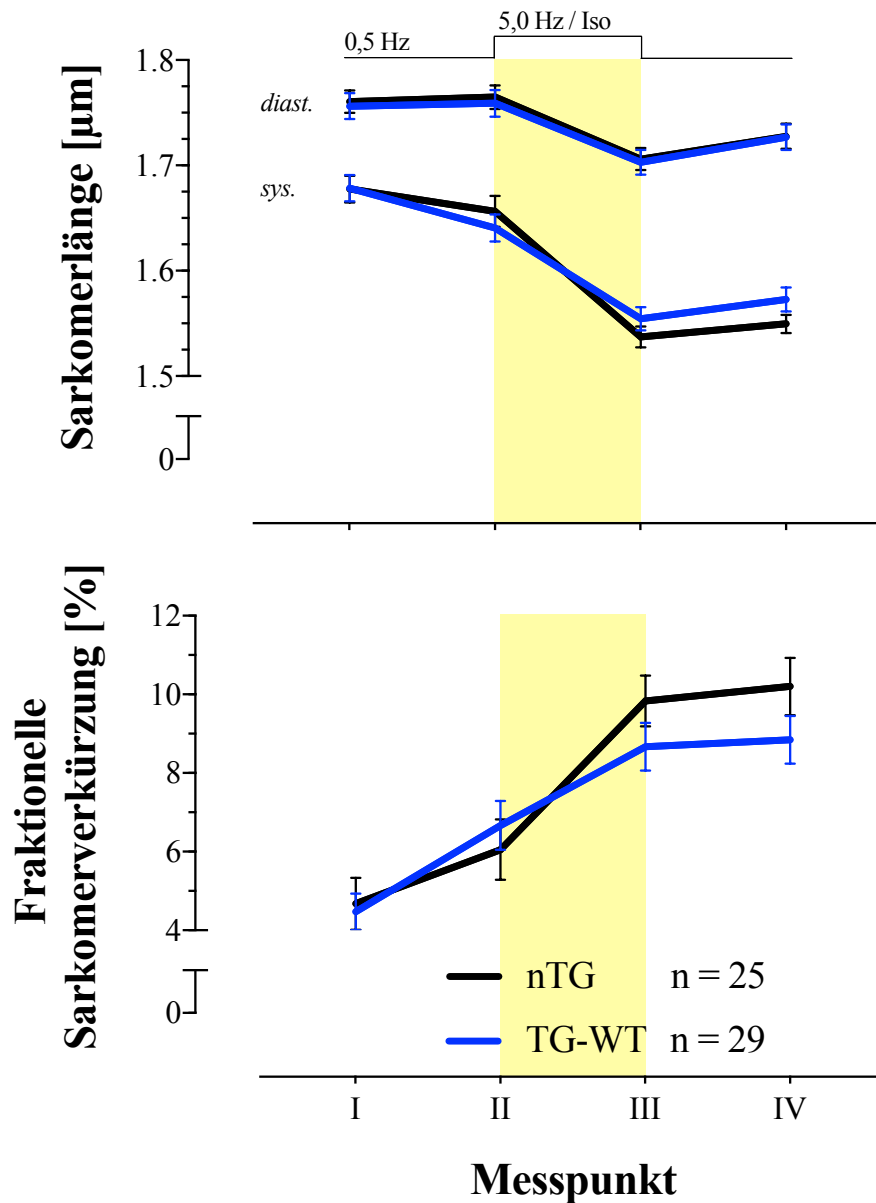


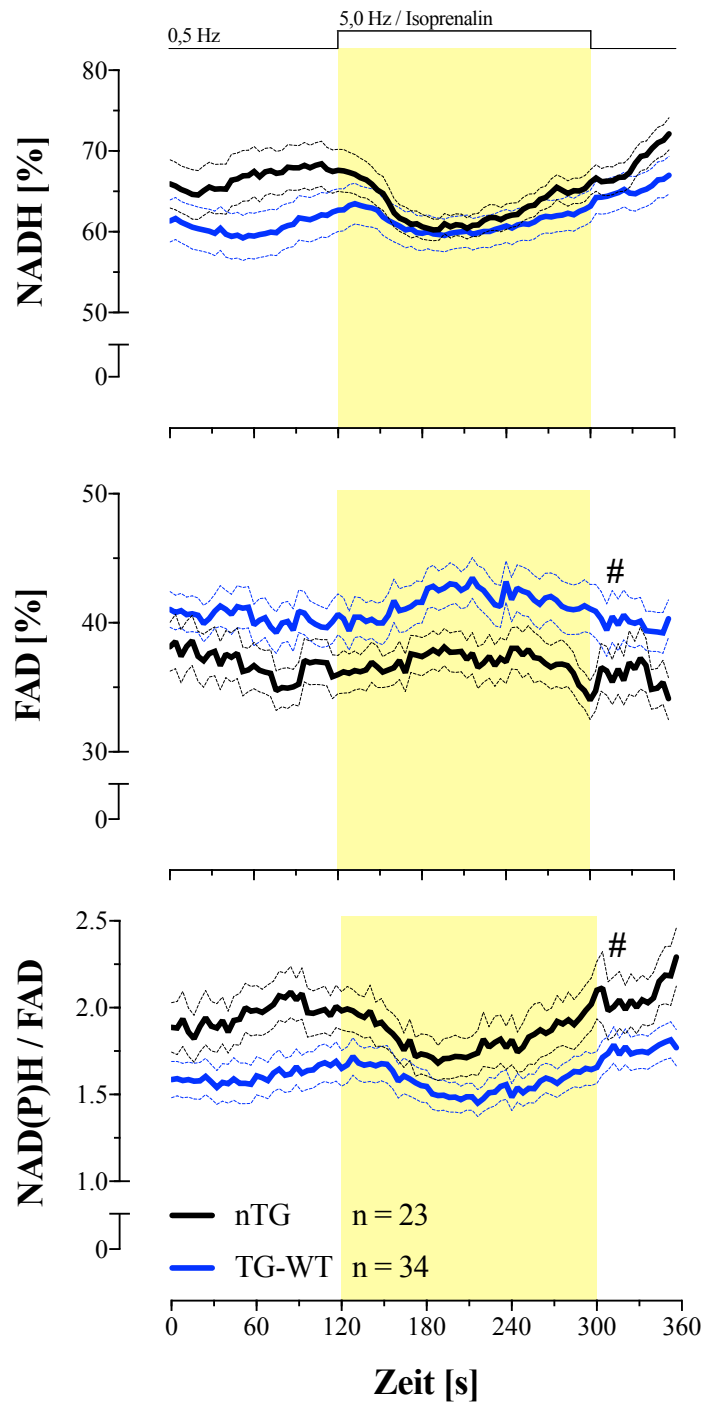
Abbildung 13: Sarkomerlänge (oben) und fraktionelle Sarkomerverkürzung (unten) zu den Messpunkten I-IV im Vergleich zwischen nTG- (n = 25) und TG-WT-Kardiomyozyten (n = 29).

Insgesamt ergibt sich keine statistisch signifikante Differenz zwischen den Gruppen. Der gelb hinterlegte Bereich repräsentiert die  $\beta$ -adrenerge Stimulation mit Isoprenalin bei 5 Hz; die Ergebnisse sind dargestellt als MW  $\pm$  SEM.

### 5.2.2 Vergleich des Reduktions- und Oxidationsstatus

Der Anstieg der Arbeitslast, simuliert durch das Einspülen des  $\beta$ -adrenergen Agonisten Isoprenalin und durch die Erhöhung der Stimulationsfrequenz auf 5 Hz (gelb hervorgehobener Bereich), führt zu einem Mehrverbrauch der Elektronendonatoren NADH und FADH<sub>2</sub> in der Atmungskette. Um den akut gestiegenen Energiebedarf der Zelle zu decken, muss NADH zu NAD<sup>+</sup> und FADH<sub>2</sub> zu FAD oxidiert werden. In den Versuchen beobachtet man folglich eine initiale Abnahme des reduzierten NADHs, während parallel oxidiertes FAD ansteigt.

Der Redoxstatus von NADH ergibt im Vergleich der beiden Gruppen über die Dauer des Versuchs nahezu keinen Unterschied, hingegen zeigt sich der Redoxstatus von FAD in TG-WT-Kardiomyozyten signifikant mehr oxidiert im Gegensatz zur Kontrollgruppe. Demzufolge ist auch das Verhältnis NAD(P)H/FAD signifikant verändert. (vgl. **Abbildung 14**). Wir denken, dass die beschriebenen Unterschiede am ehesten als Artefakt aufgrund der Überexpression zu werten sind.



**Abbildung 14: Redoxstatus in Prozent im Vergleich zwischen nTG- (n = 23) und TG-WT-Kardiomyozyten (n = 34).**

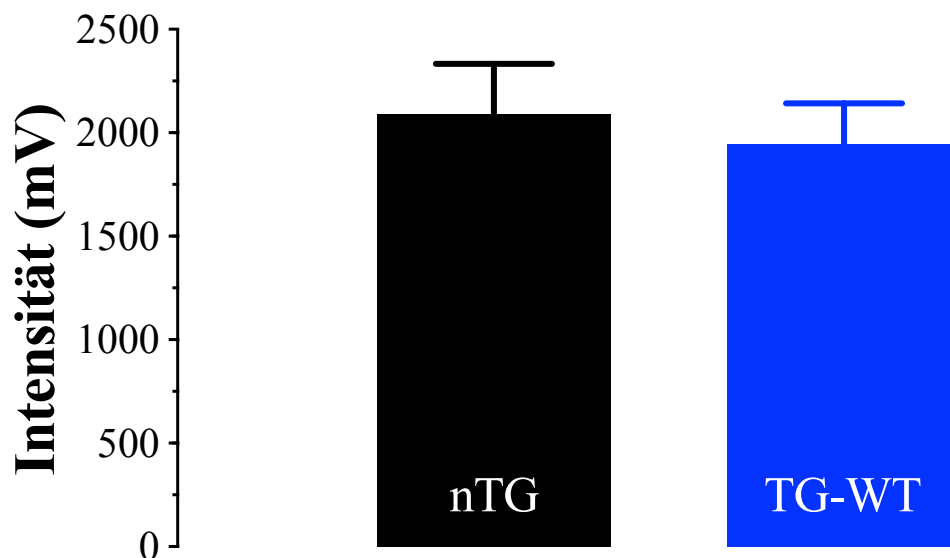
Es besteht eine unwesentliche Differenz in NADH-Redoxmessung; die FAD-Redoxmessung und die ermittelte Ratio NAD(P)H/FAD sind signifikant unterschiedlich. Der gelb hinterlegte Bereich repräsentiert die  $\beta$ -adrenerge Stimulation mit Isoprenalin bei 5 Hz. Die Ergebnisse sind dargestellt als MW  $\pm$  SEM.

### 5.2.3 Vergleich der DCF-Farbstoffmessung

**Abbildung 15** stellt die Intensitäten des DCF-Signals zwischen nTG- und TG-WT-Kardiomyozyten dar. Es ergeben sich keine Unterschiede hinsichtlich der basalen Beladung bzw. Oxidation des Farbstoffs.

Der Vergleich des DCF-Signals im Verlauf der Messung (vgl. **Abbildung 16**) zeigt eine sukzessive Steigerung in beiden Gruppen, wobei die stärkste Zunahme unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation bei einer Frequenz von 5 Hz zu verzeichnen ist. Die Werte für  $\Delta$  DCF sind in der Kontrollgruppe stets höher als in der TG-WT-Gruppe, jedoch nicht statistisch signifikant unterschiedlich.

Insgesamt weisen nTG-Mutanten sowohl in der Intensität als auch im  $\Delta$  DCF höhere Werte auf als die TG-WT-Gruppe, was auf eine höhere Belastung durch reaktive Sauerstoffspezies schließen lassen könnte. Allerdings ist die Differenz zwischen nTG- und TG-WT-Kardiomyozyten nicht signifikant.



**Abbildung 15:** Intensitäten [mV] des DCF-Signals im Vergleich zwischen nTG- (n = 28) und TG-WT-Kardiomyozyten (n = 29).

Das DCF-Signal der Kontrollgruppe ist etwas intensiver als das der TG-WT-Gruppe; insgesamt ergibt sich kein signifikanter Unterschied. Die Ergebnisse sind dargestellt als MW + SEM.

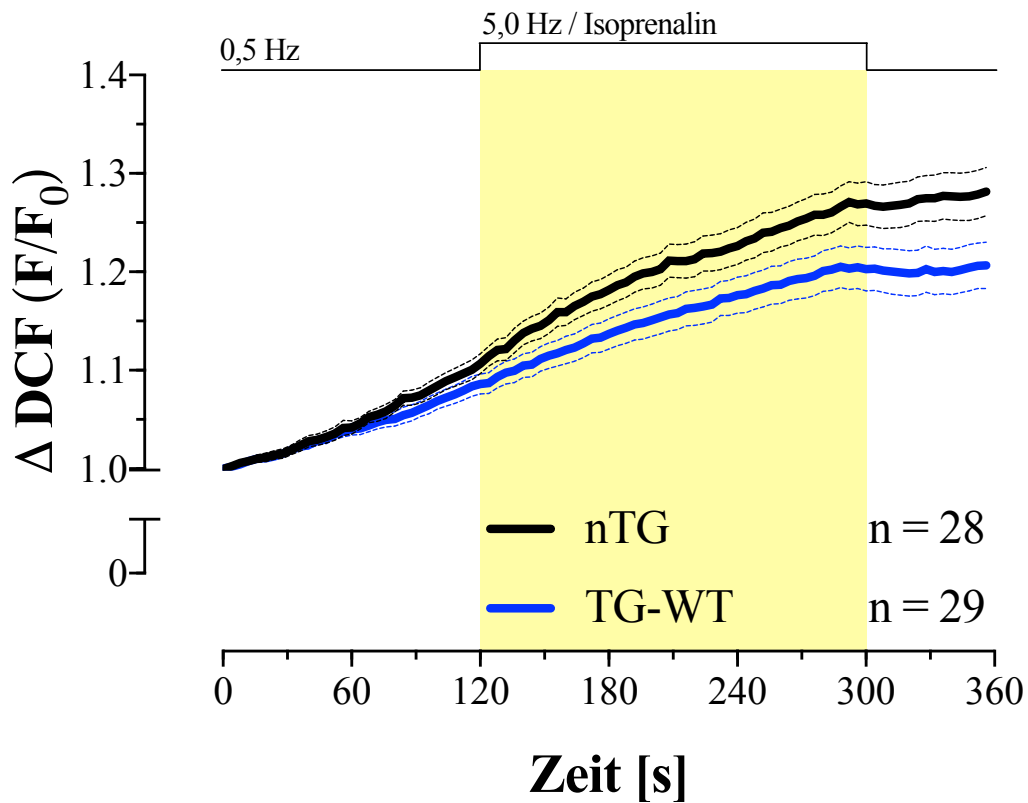


Abbildung 16: Verlauf des DCF-Signals im Vergleich zwischen nTG- (n = 28) und TG-WT-Kardiomyozyten (n = 29).

$\Delta \text{DCF (F/F}_0\text{)}$  liegt bei nTG-Zellen tendenziell etwas höher, insgesamt differieren die beiden Gruppen nicht signifikant. Der gelb hinterlegte Bereich repräsentiert die  $\beta$ -adrenerge Stimulation mit Isoprenalin bei 5 Hz. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM.

## 5.3 Versuchsreihe nTG- vs. TG-R400Q-Kardiomyozyten

### 5.3.1 Vergleich der Zellkontraktilität

Die Kardiomyozyten der nTG-Zellreihe zeigen erwartungsgemäß unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin eine gesteigerte Zellverkürzung (II), die ihr Maximum bei einer Stimulationsfrequenz von 5 Hz erreicht (III) und sich beim WO (IV) der Substanz wieder rückläufig zeigt. Im Vergleich dazu weisen die Zellen der TG-R400Q-Mutanten durchweg eine geringere diastolische Sarkomerlänge auf. Unter  $\beta$ -adrenergem Einfluss zeigt sich hier lediglich eine geringfügig gesteigerte Zellverkürzung (II), die erwartete Maximalverkürzung des Sarkomers in Messpunkt III bleibt aus. Während des WO nähert sich die diastolische Sarkomerlänge der basalen Ausgangslänge wieder an, die systolische Sarkomerlänge zeigt sich insgesamt nicht wie erwartet rückläufig. Alles in allem ergeben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den diastolischen und systolischen Sarkomerlängen der nTG- und TG-R400Q-Zellreihen.

Die FS zeigt sich in TG-R400Q-Mutanten allgemein verringert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Wider Erwarten kommt es bei den TG-R400Q-Mutanten unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin bei 5 Hz (III) zu keiner prozentuellen Maximalverkürzung, eher fallen die Werte von ca. 7,8 % (II) auf etwa 7,4 % (III) ab. Hier ergibt sich ein statistisch signifikanter Unterschied zu nTG-Kardiomyozyten, die zwischen Messpunkt II und III einen prozentuellen Zuwachs der Sarkomerverkürzung um etwa 1,8 % (von ca. 9,7 % auf ca. 11,5 %) erzielen. Siehe **Abbildung 17**, unten.

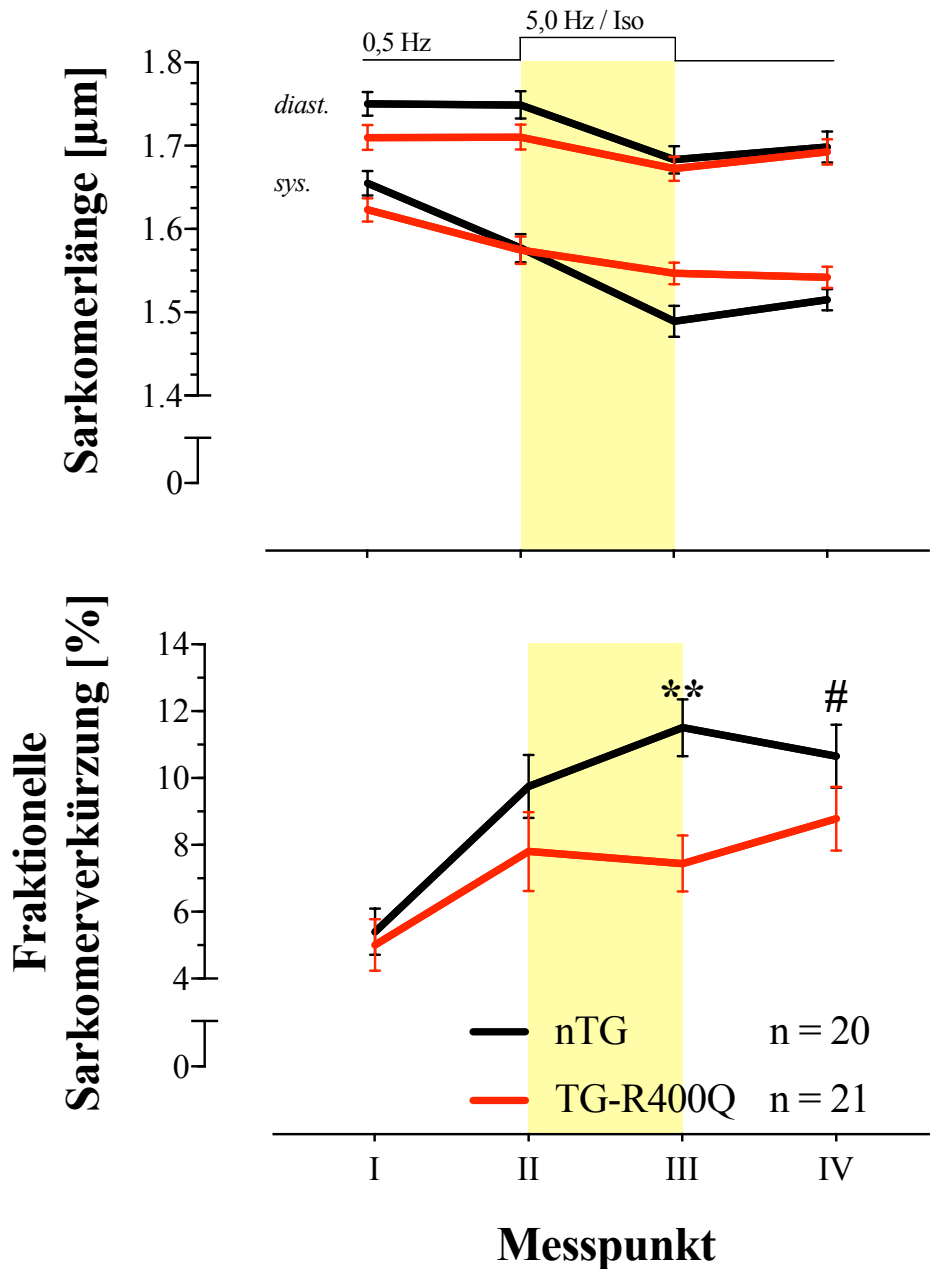


Abbildung 17: Sarkomerlänge (oben) und fraktionelle Sarkomerverkürzung (unten) zu den Messpunkten I-IV im Vergleich zwischen nTG- (n = 20) und TG-R400Q-Kardiomyozyten (n = 21).

Zwischen Messpunkt II und III fällt der Wert der FS bei TG-R400Q-Kardiomyozyten um ca. 0,4 Prozentpunkte; hier ergibt sich ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe. Der gelb hinterlegte Bereich repräsentiert die  $\beta$ -adrenerge Stimulation mit Isoprenalin bei 5 Hz; die Ergebnisse sind dargestellt als MW  $\pm$  SEM.



### 5.3.2 Vergleich des Reduktions- und Oxidationsstatus

In **Abbildung 18** werden die Ergebnisse der Redoxmessungen zwischen der nTG- und TG-R400Q-Zellreihe dargestellt. Hier ergibt sich kein signifikanter Unterschied in den NADH- und FAD-Redoxmessungen und folglich auch keine signifikante Differenz in der NAD(P)H/FAD-Ratio.

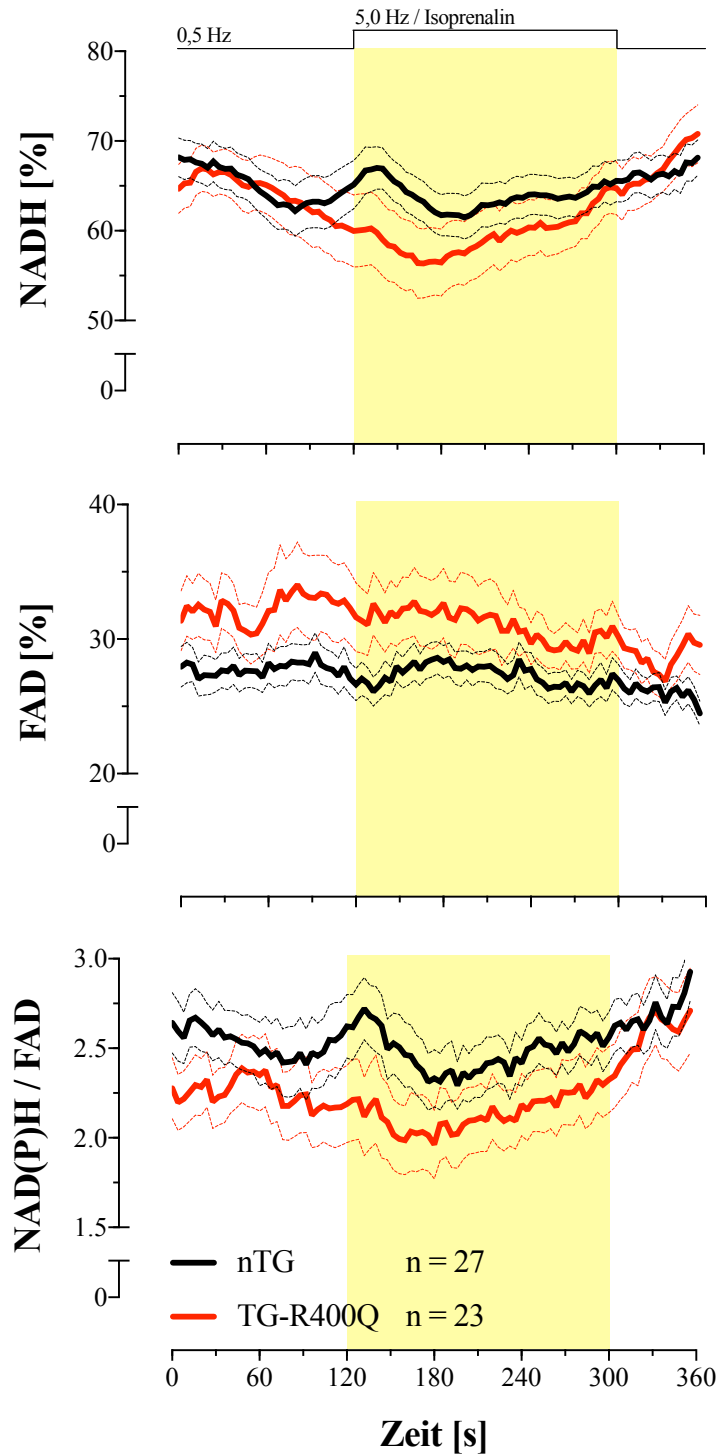
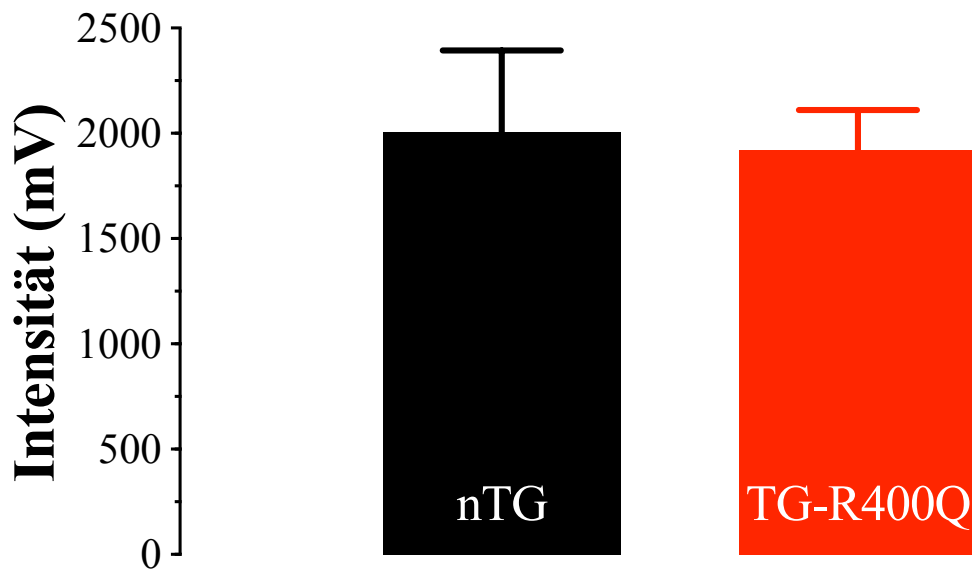


Abbildung 18: Redoxstatus in Prozent im Vergleich zwischen nTG- (n = 27) und TG-R400Q-Kardiomyozyten (n = 34).

Insgesamt ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Zellreihen. Der gelb hinterlegte Bereich repräsentiert die  $\beta$ -adrenerge Stimulation mit Isoprenalin bei 5 Hz. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM.

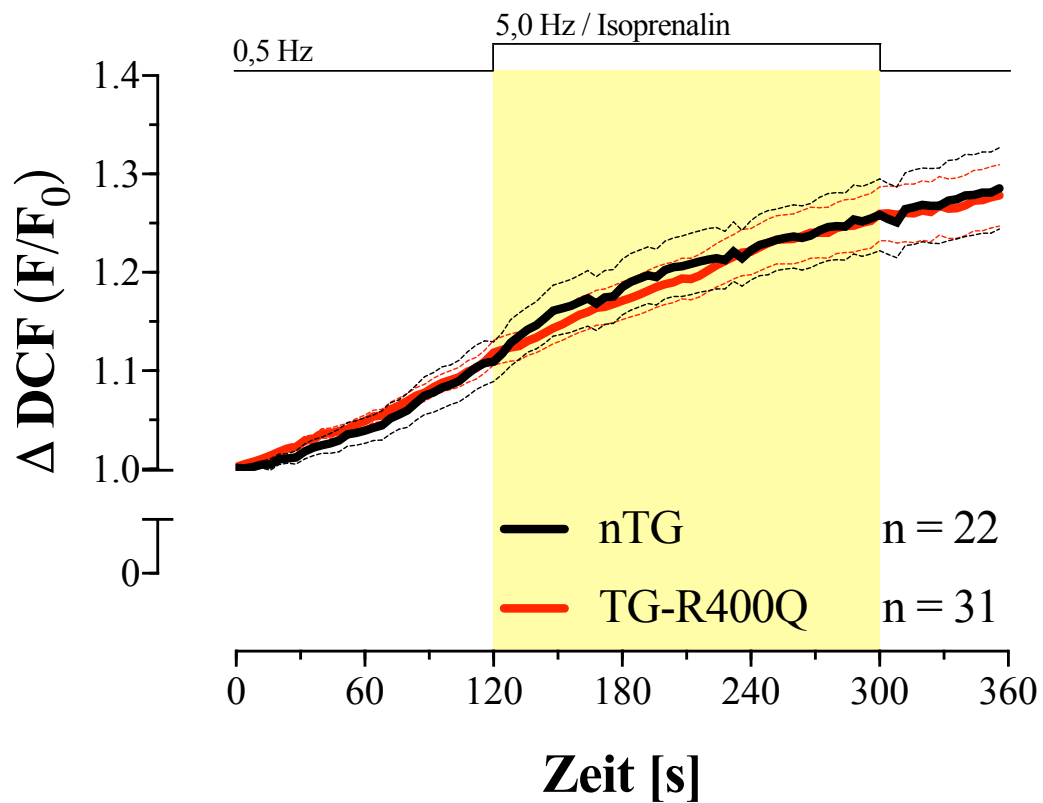
### 5.3.3 Vergleich der DCF-Farbstoffmessung

Die Intensitäten des DCF-Signals zwischen nTG- und TG-R400Q-Kardiomyozyten zeigen sich mit ca. 2000 mV vs. 1920 mV nicht signifikant unterschiedlich zwischen den Gruppen (vgl. **Abbildung 19**). Auch unter kontinuierlicher Stimulation mit Erhöhung der Arbeitslast (5 Hz und Isoprenalin) ist in beiden Gruppen ein vergleichbarer Anstieg der DCF Fluoreszenz zu beobachten ohne Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (vgl. **Abbildung 20**).



**Abbildung 19:** Intensitäten [mV] des DCF-Signals im Vergleich zwischen nTG- (n = 22) und TG-R400Q-Kardiomyozyten (n = 31).

Die nTG-Zellreihe zeigt sich minimal signalintensiver; kein signifikanter Unterschied. Die Ergebnisse sind dargestellt als MW + SEM.



**Abbildung 20:** Verlauf des DCF-Signals im Vergleich zwischen nTG- (n = 22) und TG-R400Q-Kardiomyozyten (n = 31).

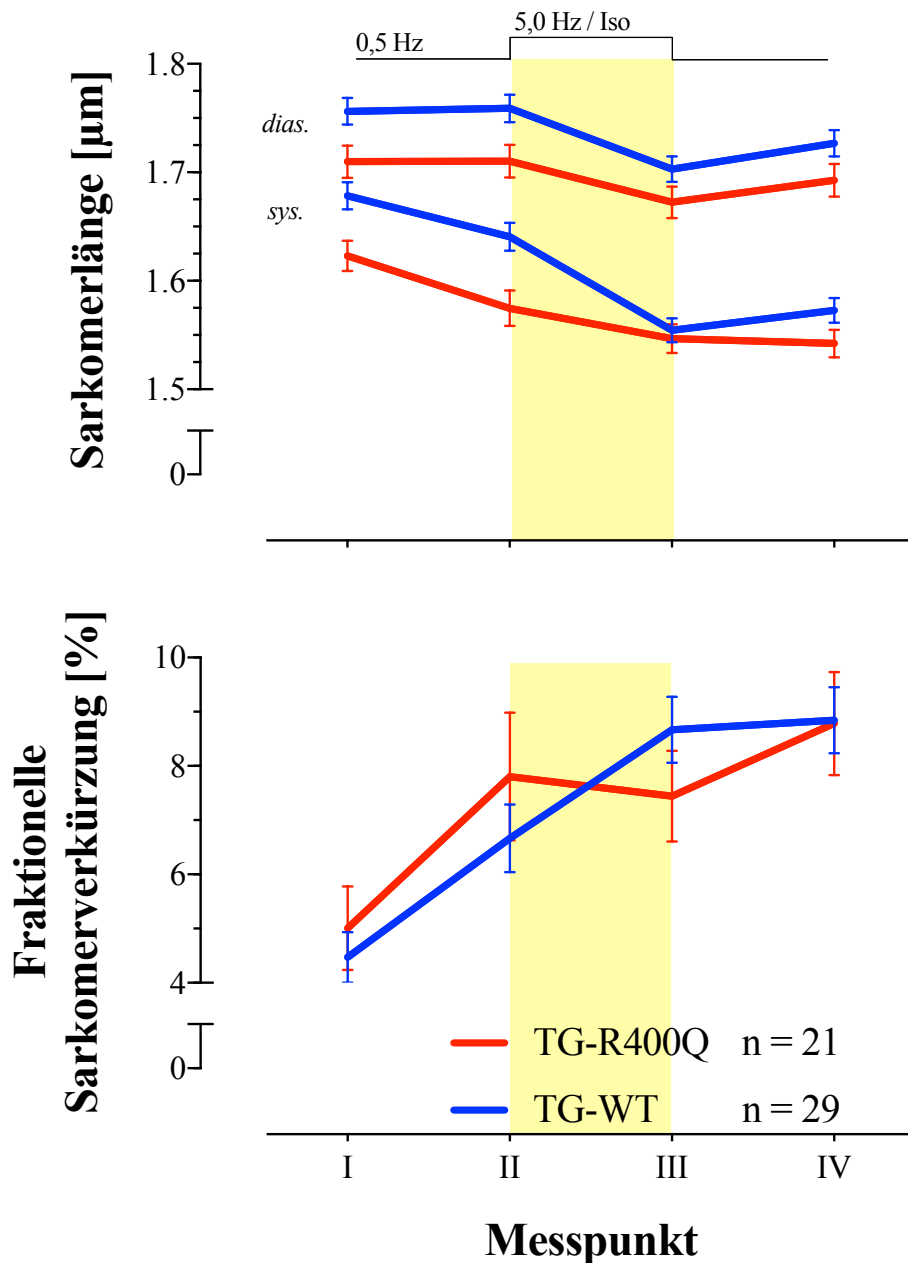
$\Delta \text{DCF} (F/F_0)$  ist für beide Gruppen zu jedem Zeitpunkt nahezu identisch; keine statistische Signifikanz. Der gelb hinterlegte Bereich repräsentiert die  $\beta$ -adrenerge Stimulation mit Isoprenalin bei 5 Hz. Die Ergebnisse sind dargestellt als  $\text{MW} \pm \text{SEM}$ .

## 5.4 Vergleich der TG-WT- vs. TG-R400Q-Kardiomyozyten

### 5.4.1 Vergleich der Zellkontraktilität

Hinsichtlich ihrer kontraktilen Parameter zeigen TG-R400Q- und TG-WT-Kardiomyozyten einen ähnlichen Verlauf: Unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin zeigt sich eine leicht gesteigerte Sarkomerverkürzung (II), die erwartungsgemäß ihren Maximalpunkt bei erhöhter Stimulationsfrequenz mit 5 Hz findet. (III) Während sich die TG-WT-Gruppe beim darauffolgenden WO (IV) ihren basalen Ausgangswerten annähert, weist die TG-R400Q-Zellreihe unerwarteterweise eine Progredienz der systolischen Zellverkürzung auf (vgl. **Abbildung 21**, oben). Insgesamt ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Auch hinsichtlich der FS ergeben sich zwischen TG-R400Q- und TG-WT-Zellreihe keine signifikanten Unterschiede.

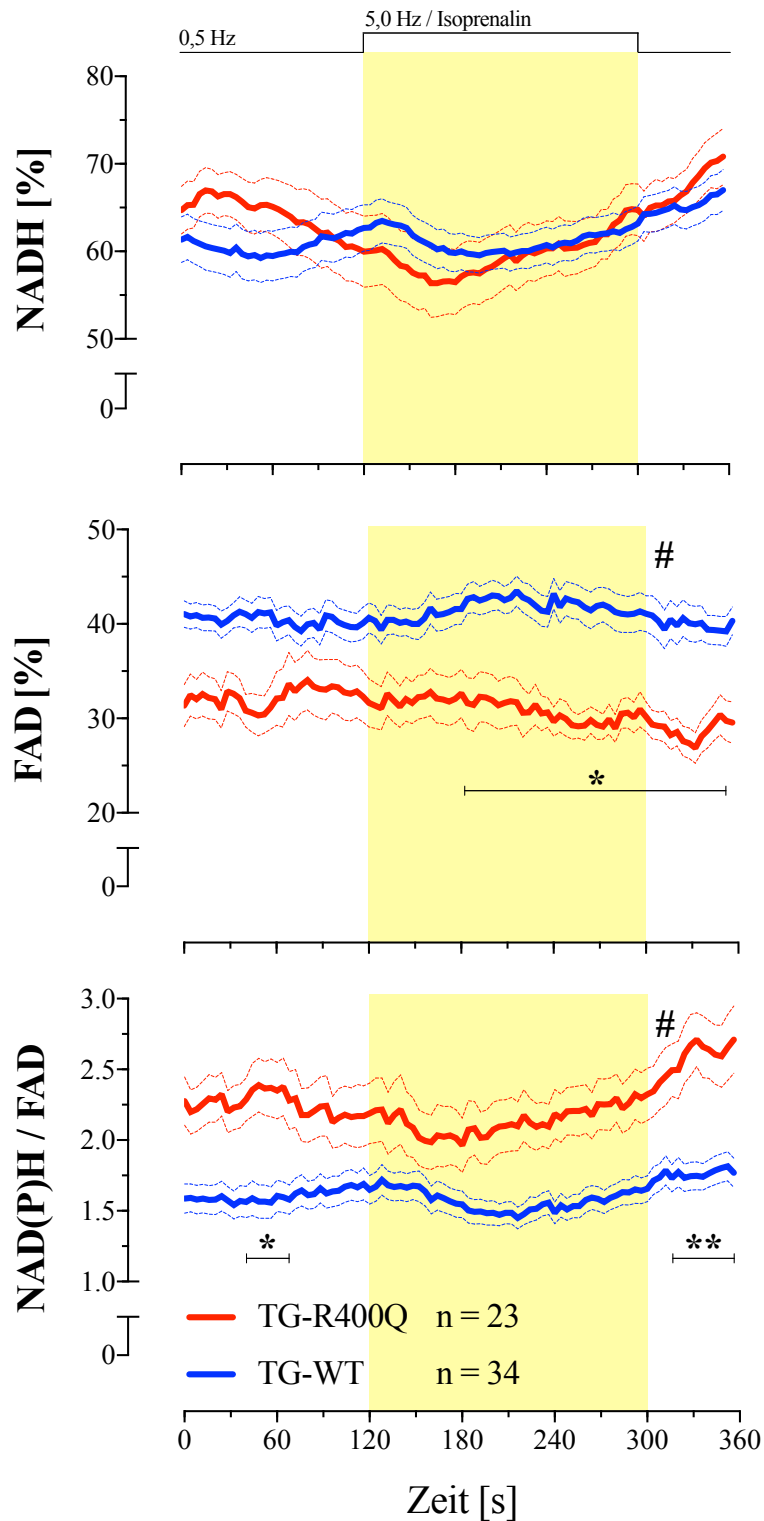


**Abbildung 21:** Sarkomerlänge (oben) und fraktionelle Sarkomerverkürzung (unten) zu den Messpunkten I-IV im Vergleich zwischen TG-R400Q- (n = 21) und TG-WT-Kardiomyozyten (n = 29).

Weder in der systolischen und diastolischen Sarkomerlänge noch in der fraktionellen Sarkomerverkürzung ergeben sich signifikante Unterschiede zwischen TG-R400Q- und TG-WT-Kardiomyozyten. Der gelb hinterlegte Bereich repräsentiert die  $\beta$ -adrenerge Stimulation mit Isoprenalin bei 5 Hz; die Ergebnisse sind dargestellt als MW  $\pm$  SEM.

#### 5.4.2 Vergleich des Reduktions- und Oxidationsstatus

**Abbildung 22** stellt die Ergebnisse der Redoxmessungen zwischen TG-R400Q- und TG-WT-Kardiomyozyten dar. Während sich für die NADH-Werte beider Gruppen keine Unterschiede ergeben, fallen signifikante Unterschiede in der FAD-Bestimmung auf. Unter Bedingungen erhöhter Arbeitslast (5 Hz und Isoprenalin) sowie in der anschließenden Erholungsphase (während des WO) zeigt sich der Redoxstatus des FAD der TG-WT-Gruppe signifikant mehr oxidiert im Vergleich zu TG-R400Q-Zellreihe. Hieraus resultierend ist auch die NAD(P)H/FAD-Ratio signifikant unterschiedlich.



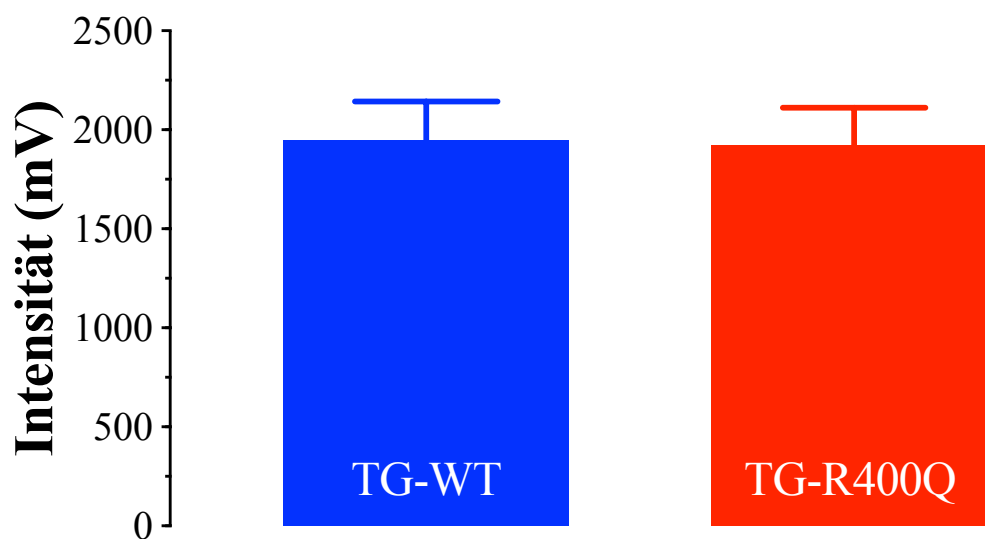
**Abbildung 22: Redoxstatus in Prozent im Vergleich zwischen TG-R400Q- (n = 23) und TG-WT-Kardiomyozyten (n = 34).**

Es bestehen signifikante Unterschiede in der FAD-Redoxmessung sowie NAD(P)H/FAD-Ratio. Der gelb hinterlegte Bereich repräsentiert die  $\beta$ -adrenerge Stimulation mit Isoprenalin bei 5 Hz. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM.



### 5.4.3 Vergleich der DCF-Farbstoffmessung

Die Intensitäten des DCF-Signals zwischen TG-R400Q- und TG-WT-Herzmuskelzellen zeigen sich nahezu identisch (vgl. **Abbildung 23**). Beide Gruppen weisen eine sukzessiven Anstieg der DCF Fluoreszenz auf, wobei es unter Bedingungen mit erhöhter Arbeitslast zum stärksten Anstieg kommt. Die Werte für die TG-R400-Reihe liegen dabei stets über denen der TG-WT-Gruppe, insgesamt besteht kein signifikanter Unterschied (vgl. **Abbildung 24**).



**Abbildung 23:** Intensitäten [mV] des DCF-Signals im Vergleich zwischen TG-R400Q- (n = 31) und TG-WT-Kardiomyozyten (n = 29).

Die Intensitäten der beiden Zellreihen zeigen sich nahezu identisch; kein signifikanter Unterschied. Die Ergebnisse sind dargestellt als MW + SEM.

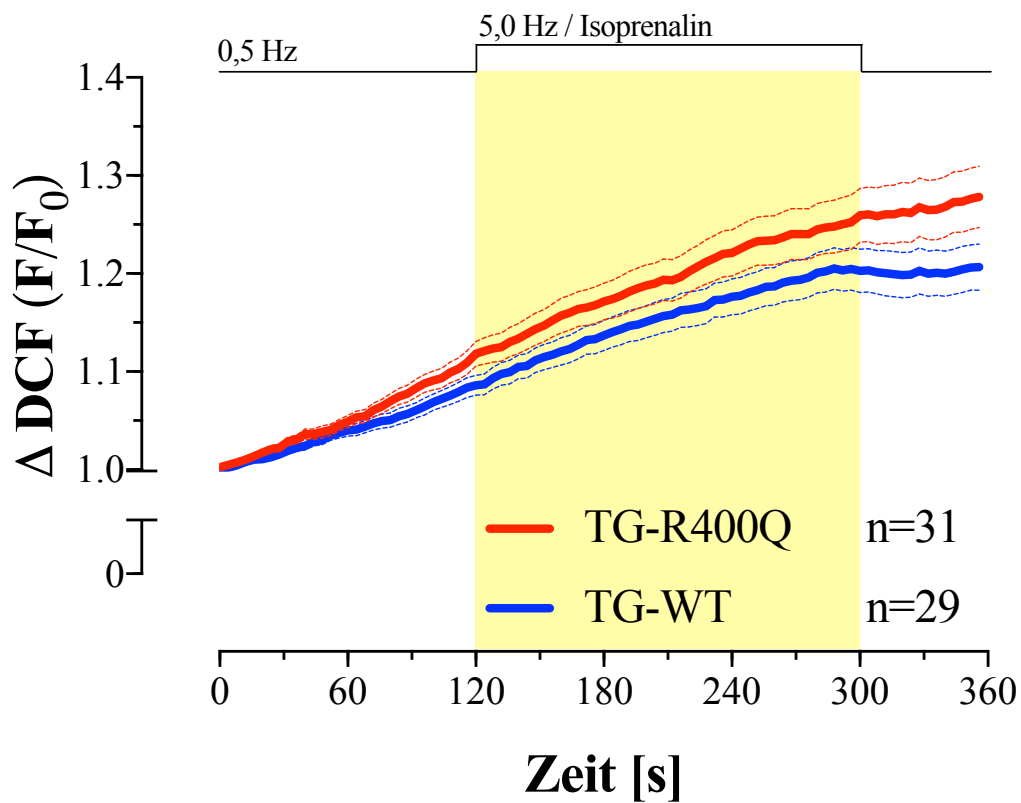


Abbildung 24: Verlauf des DCF-Signals im Vergleich zwischen TG-R400Q- (n = 31) und TG-WT-Kardiomyozyten (n = 29).

$\Delta \text{DCF} (F/F_0)$  ist für die TG-R400Q-Zellreihe stets etwas erhöht; keine statistische Signifikanz. Der gelb hinterlegte Bereich repräsentiert die  $\beta$ -adrenerge Stimulation mit Isoprenalin bei 5 Hz. Die Ergebnisse sind dargestellt als MW  $\pm$  SEM.

## 6 Diskussion

### 6.1 Die Ergebnisse im Kontext des aktuellen Wissenstands

Mitochondrien sind integraler Bestandteil der Zellphysiologie, indem sie als „Kraftwerke der Zelle“ nicht nur die Energieversorgung gewährleisten und den Metabolismus aufrechterhalten, sondern auch die organische Entwicklung der Zelle beeinflussen oder den programmierten Zelltod einleiten. Darüber hinaus wirken Mitochondrien in essentiellen biochemischen Signalwegen wie der Aminosäuresynthese, der Fettsäureoxidation, der Calciumhomöostase oder dem Eisenstoffwechsel mit. [54, 65]. Die mitochondriale Dynamik, welche die Morphologie, Verteilung und Aktivität der Organellen bestimmt, ist durch konstante Fusions- und Spaltungsprozesse geprägt. Hierbei sind verschiedene Proteine beteiligt, wobei Drp1 (*engl.: dynamin-related protein 1*) und Fis1 (*engl.: mitochondrial fission 1 protein*) Mitochondrien voneinander trennen, während die Dynamin-verwandte GTPase OPA1 der IMM als auch die GTPasen Mfn1 und Mfn2 der OMM die Mitochondrien miteinander verbinden [9]. Dysfunktionen, die innerhalb dieses fein abgestimmten mitochondrialen Equilibriums aus Fusion und Spaltung auftreten, schaffen die Grundlage genetischer Erkrankungen der menschlichen Population. Während Mutationen im OPA1-Gen zu Augenfehlbildungen (autosomal dominante Optikusatrophie) führen können [1, 17], sind Mutationen im Mfn2-Gen ursächlich für die Charcot-Marie-Tooth-Neuropathie, eine seltene Erkrankung des peripheren Nervensystems [58, 74, 83].

Insbesondere das Herzmuskelgewebe, welches durch hohe und variable Raten des aeroben Zellstoffwechsels gekennzeichnet ist, zeigt eine deutlich ausgeprägte Entwicklung des mitochondrialen Netzwerks [3, 35]. Im Vergleich zu anderen Geweben wie Gehirn, Leber oder Nieren lässt sich hier eine erhöhte Mfn2-Dichte nachweisen [2]. Das Herz stellt sich somit als besonders geeignet für die weitere Forschung am Verbindungsprotein Mfn2 dar.

Papanicolaou et al. [55] (Walsh-Labor) haben die Ausbildung von Mfn2-Proteinen um 90 % reduzieren und als erstes die Konsequenzen einer kardialen Mfn2-Ablation beobachten können, indem sie unter Verwendung eines herzspezifischen myh6-Cres die Rekombination von geflochtenen Genallelen im embryonalen Herzen initiiert haben [47]. Die Herzen junger erwachsener Mäuse im Alter von 10 – 14 Wochen weisen eine mäßige kardiale Hypertrophie auf, begleitet von kontraktilen Einschränkungen, die einzig unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation

mit dem Wirkstoff Isoproterenol auftreten. Des Weiteren weisen die Mitochondrien eine Größenzunahme vor, wobei sich sowohl der mitochondriale Polarisationsstatus als auch die  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte mitochondriale Schwellung um etwa 25 % vermindert zeigen. Das Dorn-Labor nutzt ein auf das myh6-Cre basierendes zellkerngerichtetes „Turbo-Cre“ [19], welches die Gen-Rekombination erst nach der Geburt initiiert [12]; hierdurch konnte in 16 – 44 Wochen alten Maus-Herzen eine Reduktion der Mfn2-Expression um 80 % erzielt werden [19]. Die Mfn2-defizienten Versuchstiere entwickelten mit zunehmenden Alter eine dilatative Kardiomyopathie mit fortschreitender Einschränkung der Kontraktilität sowie eine Insensitivität zu  $\beta$ -adrenerger Stimulation [13] mit Dobutamin [19]. Neben mitochondrialer Größenzunahme ist der substratabhängige  $\text{O}_2$ -Verbrauch vermindert [13], während die mitochondriale ROS-Produktion auf die bis zu 3-fache Menge ansteigt [70].

Die Ergebnisse der Walsh- und Dorn-Labore deuten auf physische und funktionelle Anomalien kardialer Myozyten hin, die Mfn2 nicht exprimieren. Anhand unseres Studienmodells können wir zeigen, dass weder die Überexpression des Mfn2 in der TG-WT-Zellreihe noch die Mutation des Mfn2 in der TG-R400Q-Zellreihe die Kontraktilität der Herzmuskelzellen maßgeblich einschränken. Eine kontraktile Insuffizienz sowie Insensitivität gegenüber  $\beta$ -adrenerger Stimulation, wie sie die Walsh- und Dorn-Labore an Mfn2-Null-Kardiomyozyten beschreiben, haben wir an den Mfn2 überexprimierenden bzw. mutierten Zellreihen nicht beobachten können. Unsere Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass weder die (moderate) Überexpression noch die Mutation von Mfn2 einen Einfluss auf die Kontraktilität haben. Die Entstehung oder das Voranschreiten einer Herzinsuffizienz durch eine genetische Veränderung des Mfn2 ist daher als fraglich einzuschätzen. Die unterschiedlichen experimentellen Herangehensweisen ebenso wie Methodik der Mfn2-Ablation (embryonal vs. postnatal) scheinen dabei keinen Unterschied zu machen.

Die Größenzunahme der Mitochondrien, wie sie Papanicolaou et al. [55] und Chen et al. [13] in Mfn2-defizienten kardialen Zellen beschreiben, werden durch Beobachtungen an embryonalen Fibroblasten sowie trophoblastischen Stammzellen von Mäusen ergänzt. Die Durchmesser einiger Mitochondrien in Mfn2-abladierten Zellen sind nicht nur um ein Vielfaches größer als die vergleichbarer Wildtyp-Zellen, sondern fallen auch durch ihr breites Größenspektrum auf. Da die Null-Zellen in 85 % der Fälle eine sphärische oder ovale Form annehmen – im Gegensatz zu ausgedehnt welligen Tubuli, die 90 % der Wildtyp-Zellen kennzeichnet – lässt sich darauf schließen, dass Mfn2 nicht nur für die mitochondriale Fusion, sondern auch für die Aufrechterhaltung einer tubulären Form der Mitochondrien

verantwortlich ist [10]. In Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse von Parra et al. [56], die durch eine 75 %-ige Reduktion des Mfn2-Levels an isolierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten eine Abnahme des mitochondrialen Durchschnittsvolumen um 25 % zeigen konnten.

In dem Punkt, dass die Ablation von Mfn2 die mitochondriale Fragmentation begünstigt, sind sich die o.g. Autoren allesamt einig [10, 13, 55, 56]. Für die gegensätzlichen Ergebnissen in Bezug auf das mitochondriale Volumen gilt es, mögliche Ursachen hierfür auszuschließen bzw. zu eruieren: Aus den unterschiedlichen Beobachtungen von Parra et al. [56] (mitochondriale Größenzunahme) und Papanicolaou et al. [55] (mitochondriale Größenabnahme), obwohl beide Gruppen ihre Untersuchungen an isolierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten durchgeführt haben, lässt sich ableiten, dass die Spezies der Mfn2-Null-Versuchstiere, obgleich Mäuse oder Ratten herangezogen wurden, keine Rolle zu spielen scheint. Ebenso scheint der Zeitpunkt der Ablation, obgleich sie in der embryonalen, neo- oder postnatalen Phase stattfindet, sowie die Art der Zelle, obgleich es sich um Fibroblast, Trophoblast oder Kardiomyozyte handelt, keine Auswirkungen zu haben. Es deutet darauf hin, dass auch die Techniken der Mfn2-Deletion nicht die Ursache für die Diskrepanz der mitochondrialen Volumina sind, da jeweils an isolierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten eine signifikante Reduktion des Proteinlevels erreicht wird: Während der Adenovirus, durch dessen Antisense-Mfn2-mRNA ein nicht-funktionsfähiges Mfn2 exprimiert wird, eine Gesamtreduktion des Mfn2-Levels um 75 % induziert [56], wird durch Verwendung einer Mfn2-spezifischen siRNA (*engl.: small interfering RNA*) eine signifikante Reduktion (genaue Kennzahl nicht angegeben) des Mfn2-Levels erzielt [55]. Die verschiedenen Mfn2-Ablationsverfahren der anderen Studien, sei es die Nutzung von Gensatz-Vektoren [10] oder die Verwendung verschiedener Cre-Linien [19, 47], mit denen eine Mfn2-Reduktion von bis zu 90 % ermöglicht wird [55], unterstreichen, dass die verschiedenen Techniken der Mfn2-Ablation als Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse auszuschließen sind.

Eine mögliche Begründung für die erhobene Differenz ist möglicherweise, dass Parra et al. [56] einzig zytoplasmatisch gelegene Mitochondrien in ihre Untersuchungsreihe aufgenommen haben, während kondensierte perinukleär gelegene Mitochondrien von den Messungen ausgeschlossen waren. Weitere Anhaltspunkte für die Gegensätzlichkeit könnten mögliche (unbekannte) Nebenwirkungen der Vielzahl der verwendeten Untersuchungssubstanzen sein oder sind auf andere, nicht näher definierbare Faktoren zurückzuführen.

Neben seiner Funktion als intermitochondriales Fusionsprotein haben de Brito et al. [15] postuliert, dass Mfn2 auch eine Funktion als transmitochondriales Fusionsprotein, nämlich zwischen ER und Mitochondrien, zukommt. Um zu überprüfen, ob dieses Konzept auf das Herz übertragbar ist und inwiefern sich eine Mfn2-Ablation auf die interorganelle Struktur auswirkt, wurden Mfn2-Null-Kardiomyozyten einer morphometrischen Analyse unterzogen: Auf der einen Seite stellt sich in der elektronenmikroskopischen Untersuchung des Walsh-Labors in Mfn2-abladierten Kardiomyozyten heraus, dass sich die Distanz zwischen dem Mittelpunkt der T-Tubuli und der OMM bei etwa 150 nm liegt [55]. Auf der anderen Seite hat das Dorn-Labor in Mfn2-defizienten Zellen die Distanz zwischen dem jSR und den Mitochondrien, die sich im Bereich von 15 nm bewegt, untersucht (ebenfalls elektronenmikroskopisch) und im Vergleich zu Kontrolltieren eine Weitung der Lücke festgestellt. Darüber hinaus zeigt sich die Kontaktlänge, die man zwischen jSR und den Mitochondrien bestimmt hat, um ca. 30 % vermindert [12].

Zwar nutzen die beiden genannten Labore Maus-Modelle, in denen die Mfn2-Ablation durch eine bestimmte Cre-Linie erzielt wird, allerdings ist hier ein wichtiger Unterschied zu vermerken: Für die zellkerngerichtete „Turbo“ Cre-Linie, die eine kardiomyozyten-spezifische Gendeletion in der postnatalen Phase bewirkt und Verwendung im Dorn-Labor findet, ist keine kardiotoxische Wirkung beschrieben. Dem gegenüber führt die stark erhöhte Cre-Expression der im Walsh-Labor eingesetzten Cre-Linie in adulten Mäusen zu Kardiotoxizität [47]. Daraus lässt sich schließen, dass die Technik der Ablation möglicherweise ein Grund für die gegenteiligen Ergebnisse sein könnte. Darüber hinaus ist der im Rahmen der Distanzmessung erfasste Abstand zwischen jSR und Mitochondrien (Dorn-Labor) ein direkterer Parameter für die Verbindung zwischen SR und Mitochondrien als die Messung zwischen dem Zentrum der T-Tubuli und den Mitochondrien (Walsh-Labor) [12]. Zuletzt wurde auch eine Analyse der Kontaktlänge zwischen jSR und Mitochondrien im Walsh-Labor nicht durchgeführt. Aus der zusätzlichen Erkenntnis, dass eine auffallende Verminderung SR-spezifischer RyR in Mitochondrien-assoziierten Membranen in Mfn2-abladierten Herzmuskelzellen vorliegt [12], lässt sich schließen, dass ohne das transmitochondriale Fusionsprotein Mfn2 eine mechanisch instabilere Verbindung zwischen SR und Mitochondrien besteht [12].

Die enge physikalische Verbindung, die Mfn2 im Sinne einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Mikrodomäne zwischen den Mitochondrien und dem SR schafft, ermöglicht trotz geringer Affinität des MCU eine effiziente mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme und privilegiert diesen Signalweg gegenüber dem

transsarkolemmalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom [37-39]. Dabei ist bis dato ungeklärt, ob es sich generell um eine schnelle mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme, im Sinne eines pulsatilen Prozesses („beat-to-beat“), oder um eine langsame  $\text{Ca}^{2+}$ -Akkumulation (in Abhängigkeit von Frequenz und Amplituden der zytosolischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten) handelt [16, 38, 44]. Ungeachtet dessen, dass die Kinetik und umfangreichen Prozesse der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme nicht gänzlich ergründet sind und ein Schwerpunktthema weiterer Forschung bleiben sollte, kommt dem in die mitochondriale Matrix aufgenommenen  $\text{Ca}^{2+}$  eine zentrale Rolle in der Regulation der mitochondrialen Energetik zu: Indem  $\text{Ca}^{2+}$  Schlüsselenzyme des Citratzykluses stimuliert, werden die oxidierten Elektronendonatoren  $\text{NAD}^+$  und  $\text{FAD}$  zu  $\text{NADH}$  und  $\text{FADH}_2$  reduziert. In Situationen gesteigerter kardialer Arbeitslast, bspw. unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation, sind die Amplituden und die Frequenz der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten gesteigert, was wiederum eine erhöhte mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Akkumulation zur Folge hat. Indem vermehrt  $\text{NADH}$  und  $\text{FADH}_2$  bereitgestellt werden, welche wiederum an den Komplexen I und II der ETC verbraucht werden, kann  $\Delta\mu_{\text{H}}$  für die erhöhte Produktion des ATPs aufrechterhalten werden, um so dem ATP-Mehrverbrauch an den Myofilamenten sowie  $\text{Ca}^{2+}$ -austauschenden Proteinen gerecht zu werden [38]. Demnach ist eine stabil funktionierende Verbindung zwischen den zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern und den Mitochondrien, wie sie das Linkerprotein Mfn2 schafft, unabdingbar für die Gesundheit der Zelle sowie für eine regelrechte kontraktile Funktion des Herzens.

Da wir in unseren Experimenten ähnliche Kontraktionsparameter zwischen TG-WT- und TG-R400Q-Zellen (auch im jeweiligen Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrolltieren) erfasst haben, ist von einer vergleichbaren Arbeitslast für die untersuchten Kardiomyozyten auszugehen. Sowohl in der Mfn2-überexprimierten TG-WT-Zellreihe als auch der Mfn2-mutierten TG-R400Q-Zellreihe zeigen sich keine Unterschiede im Reduktions- und Oxidationsstatus im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrolltieren. Vergleicht man allerdings die beiden veränderten Gruppen miteinander, fällt auf, dass die Werte für FAD in der TG-WT-Gruppe unter Bedingungen mit gesteigerter Arbeitslast signifikant erhöht sind. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass die Werte korrespondierenden  $\text{FADH}_2$  signifikant erniedrigt sind. In Zusammenschau mit der ermittelten  $\text{NAD(P)H/FAD}$ -Ratio, die ebenfalls signifikante Unterschiede aufweist, lässt sich für die Mfn2-überexprimierende TG-WT-Kardiomyozyten ableiten, dass die

- a. Reduktions- und Oxidationsstatus dieser Herzmuskelzellen zu oxidierten Konstellationen neigen. Hieraus ergibt sich, dass die durch

- b.  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulierte Regeneration des Elektronendonators  $\text{FADH}_2$  erniedrigt ist, woraus sich wiederum schließen lässt, dass die
- c. mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme bei Überexpression des Mfn2-Gens herabgesetzt sein könnte.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die bioenergetische Adaption durch Überexpression von Mfn2 eingeschränkt ist. Erweitern lassen sich unsere Ergebnisse durch vorangegangene Patch-Clamp-Experimente unserer Arbeitsgruppe [12], anhand derer die Bestimmung der zytosolischen und mitochondrialen  $[\text{Ca}^{2+}]$  zeigen konnte, dass Mfn2-defiziente Mäuse-Kardiomyozyten (ebenfalls postnatale Mfn2-Deletion) eine verminderte mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme vorweisen. Zusätzlich lässt sich also schlussfolgern, dass möglicherweise ein „Überangebot“ von Mfn2 vergleichbare Konsequenzen nach sich zieht wie eine Mfn2-Ablation.

Durch die intime physische Verbindung, die das Linkerprotein zwischen dem SR und den Mitochondrien aufbaut, wird eine erleichterte  $\text{Ca}^{2+}$ -Transmission zwischen diesen Organellen gefördert. Hierdurch wird die mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme begünstigt, was wiederum die bioenergetische Adaption des Herzen an Energieangebot und -nachfrage verbessert. Die Ursache, dass Mfn2-defiziente Herzen mäßige Hypertrophien, kontraktile Dysfunktionen sowie dilatative Kardiomyopathien entwickeln [13, 55], könnte demnach in der gestörten SR-mitochondriellen- $\text{Ca}^{2+}$ -Transmission begründet sein und möglicherweise die Entstehung einer Herzinsuffizienz begünstigen.

Neben einer schnellen „beat-to-beat“  $\text{Ca}^{2+}$ -Transmission zwischen SR und Mitochondrien findet auch eine langsamere  $\text{Ca}^{2+}$ -Transmission zwischen diesen beiden Organellen statt, die vermutlich durch Inositol-1,4,5-Triphosphat ( $\text{IP}_3$ ) -Rezeptoren ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) sowie mitochondrialen RyR Typ 1 (mRyR1) vermittelt wird: Durch den engen Kontakt zwischen Mitochondrien und den  $\text{IP}_3\text{R}$  des SR können  $\text{Ca}^{2+}$ -Flüsse entstehen, welche wiederum mRyR1 aktivieren, welche wiederum eine gesteigerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in die mitochondriale Matrix bewirken, welche wiederum die ATP-Produktion beeinflussen [68]. Bisher nicht-veröffentlichte Daten von Seidlmayer et al., Universitätsklinikum Würzburg (Seidlmayer et al., *Mitofusin 2 is essential for  $\text{IP}_3$ -mediated SR/mitochondria metabolic feedback*, 2018) suggerieren, dass Mfn2 einen besonderen (und ggf. größeren) Einfluss auf die beschriebene langsame  $\text{Ca}^{2+}$ -Transmission hat: In Mfn2-KO-Mäusen (postnatale Deletion) ist der  $\text{IP}_3$ -vermittelte Stoffwechselmechanismus zwischen SR und Mitochondrien stark beeinträchtigt, wodurch die ATP-Produktion in diesen Mäusen nicht induziert wurde. Anhand unserer Ergebnisse lässt



sich ableiten, dass eine R400Q-Mutation des Mfn2 keinen Einfluss auf die schnelle  $\text{Ca}^{2+}$ -Transmission im Sinne eines „beat-to-beat“-Prozesses hat. Ob und wie sich eine R400Q-Mutation auf die langsame  $\text{Ca}^{2+}$ -Transmission auswirkt, ist Gegenstand zukünftiger Forschungsprojekte dieser Arbeitsgruppe.

Mitochondrien sind nicht nur die Quelle des Energielieferanten ATP, sondern auch der Bildungsort freier Sauerstoffradikale. Etwa 0,2 % des konsumierten  $\text{O}_2$  münden in die Entstehung von ROS [4]. Um die Zelle vor oxidativem Stress zu schützen, greifen verschiedene antioxidative Mechanismen, die eine suffiziente Elimination der ROS gewährleisten sollen. Hierzu zählen u.a. enzymatische Antioxidantien, deren Regeneration NADPH-abhängig ist [81]. Da die Regeneration von NADPH substratabhängig vom Citratzyklus ist, ist letztendlich die mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme, die stimulierend auf den Citratzyklus wirkt, von entscheidender Bedeutung für die antioxidative Kapazität der Zelle [36, 38]. Den Beweis, dass die mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme nicht nur die Energiebereitstellung an Angebot und Nachfrage adaptiert, sondern auch den Redoxstatus des NAD(P)H in einem reduzierten Status hält, zeigen Kohlhaas et al. [36], indem sie mittels Ru360 die Funktion des MCU inhibieren. Hierdurch konnte zum einen die  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte Regeneration von NAD(P)H vermindert, gleichzeitig eine signifikante Mehrbildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  detektiert werden.

Anhand der in dieser Studie durchgeführten Farbstoffmessungen mit DCF lässt sich das Ausmaß der ROS-Produktion in den Herzmuskelzellen quantifizieren. Hierbei haben wir die Intensität des DCF-Signals sowie das  $\Delta$  DCF ( $F/F_0$ ) als Parameter herangezogen. Sowohl in der Mfn2-überexprimierten als auch Mfn2-mutierten Zellreihe sind keine signifikanten Unterschiede in der Intensität als auch im  $\Delta$  DCF ( $F/F_0$ ) zu verzeichnen (im Vergleich untereinander als auch im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltieren). Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass weder durch eine Überexpression noch durch eine Mutation des Mfn2 in einer höheren Belastung durch ROS resultieren.

## 6.2 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit stammen aus Versuchsreihen an isolierten Kardiomyozyten mit spezifischen Mfn2-Mutationen. Die Herzmuskelzellen wurden dabei im Hinblick auf die Entstehung und Entwicklung einer Herzinsuffizienz (durch Erfassung verschiedener kontraktiver Parameter) untersucht, die simultane Messung des Reduktions- und Oxidationsstatus gewährt Aufschluss über die mitochondriale Energetik. In separaten Farbstoffmessungen wurde die Produktion freier Sauerstoffradikale dokumentiert. Alle Zellen wurden dabei einem einheitlichen Messprotokoll unterzogen.

Die kardialen Erkrankungen, die in Mfn2-abladierten-Mauskardiomyozyten in Form von Hypertrophie, kontraktile Dysfunktion und/oder dilatative Kardiomyopathie bereits beschrieben wurden, deuten allesamt auf die Entwicklung bzw. das Fortschreiten einer Herzinsuffizienz durch den Verlust von Mfn2 hin. Unsere Ergebnisse hingegen zeigen, dass weder durch moderate Überexpression noch durch Mutation des so überexprimierten Mfn2 die kontraktile Eigenschaften der Herzmuskelzellen signifikant beeinflusst werden, weshalb wir schlussfolgern können, dass weder eine Überexpression noch eine Mutation des Mfn2 sich auf die Entstehung oder das Voranschreiten einer Herzinsuffizienz auswirken.

Anhand der Reduktions- und Oxidationsmessungen stellen wir fest, dass in den Mfn2-überexprimierten Kardiomyozyten die Bereitstellung des Reduktionsäquivalents  $\text{FADH}_2$  eingeschränkt ist. Daher ist davon auszugehen, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transmission zwischen SR und Mitochondrien sowie die bioenergetische Adaption der Zelle an wechselnde Arbeitslasten in Folge einer Überexpression des Mfn2-Gens beeinträchtigt werden könnte. Allerdings haben wir in unserem Studienmodell nur die schnelle „beat-to-beat“  $\text{Ca}^{2+}$ -Transmission beleuchtet. Inwiefern sich eine Überexpression oder R400Q-Mutation auf die langsame  $\text{Ca}^{2+}$ -Transmission auswirkt, ist Gegenstand zukünftiger Forschungsprojekte. Entsprechende Ergebnisse in diesem Bereich gilt es abzuwarten.

In den Farbstoffmessungen haben wir keine Unterschiede zwischen den untersuchten Zellreihen erfassen können. Hieraus schlussfolgern wir, dass weder die Mfn2-Überexpression noch die -Mutation in einer vermehrten Bildung von ROS mündet.

Insgesamt ist eine regelrechte mitochondriale Funktion für das Leben und Überleben aller Zellen von essentieller Bedeutung. Störungen innerhalb der mitochondrialen Dynamik, die von Fusions- und Spaltungsprozessen geprägt ist, sind bewiesenermaßen die Grundlage für seltene hereditäre Erkrankungen wie der autosomal dominanten Optikusatrophie oder der

Charcot-Marie-Tooth-Neuropathie [1, 17, 58, 74, 83]. Nicht nur Störungen im Fusionsprotein Mfn2 [12, 55], sondern generell in der mitochondrialen Organisation [34] weisen auf eine zentrale Rolle der mitochondrialen Fusion- und Spaltung in der Entwicklung einer Herzinsuffizienz hin. Die Wiederherstellung einer „gesunden“ mitochondrialen Dynamik stellt eine therapeutische Option des versagenden Herzens dar: Durch die Behandlung mit dem mitochondrialen Teilungsinhibitor-1, einem Inhibitor des Drp1, konnte in Maus-Kardiomyozyten nach simulierter Ischämie/Reperfusionsverletzung der Zelltod reduziert und die Öffnung des MPTP blockiert werden. Des Weiteren reduzierte der mitochondriale Teilungsinhibitor-1 die Myokardinfarktgröße bei Mäusen in-vivo [53].

Die Ergebnisse offenbaren neue pharmakologische Therapieansätze in der Kardioprotektion. Inwiefern allerdings die therapeutischen Konzepte auch auf den Menschen übertragbar sind, ist derzeit noch ungewiss. Daher sollte die weitere Erforschung der mitochondrialen Dynamik im Herzen, ebenso wie die weitere Forschung an Mfn2 als Teil dieser Dynamik, auch in Zukunft der Schwerpunkt weiterer Studien sein.

## 7 Quellenverzeichnis

1. Alexander, C., et al., *OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28*. Nat Genet, 2000. **26**(2): p. 211-5.
2. Bach, D., et al., *Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity*. J Biol Chem, 2003. **278**(19): p. 17190-7.
3. Bakeeva, L., Y.S. Chentsov, and V. Skulachev, *Mitochondrial framework (reticulum mitochondriale) in rat diaphragm muscle*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 1978. **501**(3): p. 349-369.
4. Balaban, R.S., S. Nemoto, and T. Finkel, *Mitochondria, oxidants, and aging*. Cell, 2005. **120**(4): p. 483-95.
5. Bers, D., *Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force*. Vol. 237. 2001: Springer Science & Business Media.
6. Bers, D.M., *Cardiac excitation-contraction coupling*. Nature, 2002. **415**(6868): p. 198-205.
7. Bers, D.M., *Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure*. Physiology (Bethesda), 2006. **21**: p. 380-7.
8. Bers, D.M., *Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes*. Annu Rev Physiol, 2008. **70**: p. 23-49.
9. Chan, D.C., *Mitochondrial Fusion and Fission in Mammals*. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2006. **22**(1): p. 79-99.
10. Chen, H., et al., *Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development*. J Cell Biol, 2003. **160**(2): p. 189-200.

11. Chen, L. and A. Knowlton, *Mitochondrial Dynamics in Heart Failure*. *Congest Heart Fail*, 2011. **17**(6): p. 257-61.
12. Chen, Y., et al., *Mitofusin 2-containing mitochondrial-reticular microdomains direct rapid cardiomyocyte bioenergetic responses via interorganelle Ca(2+) crosstalk*. *Circ Res*, 2012. **111**(7): p. 863-75.
13. Chen, Y. and G.W. Dorn, *PINK1-Phosphorylated Mitofusin 2 Is a Parkin Receptor for Culling Damaged Mitochondria*. *Science*, 2013. **340**(6131): p. 471-475.
14. Chen, Y., Y. Liu, and G.W. Dorn, 2nd, *Mitochondrial fusion is essential for organelle function and cardiac homeostasis*. *Circ Res*, 2011. **109**(12): p. 1327-31.
15. de Brito, O.M. and L. Scorrano, *Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria*. *Nature*, 2008. **456**(7222): p. 605-10.
16. Dedkova, E.N. and L.A. Blatter, *Calcium signaling in cardiac mitochondria*. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2013. **58**: p. 125-133.
17. Delettre, C., et al., *Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene*. *Hum Genet*, 2001. **109**(6): p. 584-91.
18. Dorn, G.W., 2nd and C. Maack, *SR and mitochondria: calcium cross-talk between kissing cousins*. *J Mol Cell Cardiol*, 2013. **55**: p. 42-9.
19. Dorn, G.W., M. Song, and K. Walsh, *Functional implications of mitofusin 2-mediated mitochondrial-SR tethering*. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2015. **78**: p. 123-128.
20. Dzau, V.J., et al., *Relation of the renin-angiotensin-aldosterone system to clinical state in congestive heart failure*. *Circulation*, 1981. **63**(3): p. 645-51.
21. Dzau, V.J., et al., *Prostaglandins in severe congestive heart failure. Relation to activation of the renin--angiotensin system and hyponatremia*. *N Engl J Med*, 1984. **310**(6): p. 347-52.

22. Eichhorn, E.J. and M.R. Bristow, *Medical therapy can improve the biological properties of the chronically failing heart: a new era in the treatment of heart failure*. *Circulation*, 1996. **94**(9): p. 2285-2296.
23. Eisenhofer, G., et al., *Cardiac sympathetic nerve function in congestive heart failure*. *Circulation*, 1996. **93**(9): p. 1667-1676.
24. Formosa, L.E. and M.T. Ryan, *Mitochondrial fusion: Reaching the end of mitofusin's tether*. *The Journal of Cell Biology*, 2016.
25. Francis, G.S., *Pathophysiology of chronic heart failure*. *The American Journal of Medicine*, 2001. **110**(7, Supplement 1): p. 37-46.
26. Gajarsa, J.J. and R.A. Kloner, *Left ventricular remodeling in the post-infarction heart: a review of cellular, molecular mechanisms, and therapeutic modalities*. *Heart Fail Rev*, 2011. **16**(1): p. 13-21.
27. Garcia-Perez, C., G. Hajnoczky, and G. Csordas, *Physical coupling supports the local Ca<sup>2+</sup> transfer between sarcoplasmic reticulum subdomains and the mitochondria in heart muscle*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(47): p. 32771-80.
28. García-Pérez, C., et al., *Alignment of sarcoplasmic reticulum-mitochondrial junctions with mitochondrial contact points*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011. **301**(5): p. H1907-15.
29. Giacomello, M., et al., *Ca<sup>2+</sup> hot spots on the mitochondrial surface are generated by Ca<sup>2+</sup> mobilization from stores, but not by activation of store-operated Ca<sup>2+</sup> channels*. *Mol Cell*, 2010. **38**(2): p. 280-90.
30. Giordano, F.J., *Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure*. *The Journal of Clinical Investigation*, 2005. **115**(3): p. 500-508.
31. Hales, K.G. and M.T. Fuller, *Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase*. *Cell*, 1997. **90**(1): p. 121-9.

32. Hayashi, T., et al., *Three-dimensional electron microscopy reveals new details of membrane systems for Ca<sup>2+</sup> signaling in the heart*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 7): p. 1005-13.
33. Herold, G., *Innere Medizin : eine vorlesungsorientierte Darstellung : 2018 : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*. 2018: Köln : Gerd Herold, [2018].
34. Hom, J., et al., *Regulation of mitochondrial fission by intracellular Ca<sup>2+</sup> in rat ventricular myocytes*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1797**(6-7): p. 913-21.
35. Kirkwood, S., E. Munn, and G. Brooks, *Mitochondrial reticulum in limb skeletal muscle*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 1986. **251**(3): p. C395-C402.
36. Kohlhaas, M., et al. *Elevated cytosolic [Na<sup>+</sup>] increases mitochondrial formation of reactive oxygen species during excitation-contraction coupling in failing cardiac myocytes*. in *EUROPEAN HEART JOURNAL*. 2009. OXFORD UNIV PRESS GREAT CLARENDON ST, OXFORD OX2 6DP, ENGLAND.
37. Kohlhaas, M. and C. Maack, *Adverse Bioenergetic Consequences of Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> Exchanger-Mediated Ca<sup>2+</sup> Influx in Cardiac Myocytes*. Circulation, 2010: p. CIRCULATIONAHA.110.968057.
38. Kohlhaas, M. and C. Maack, *Calcium release microdomains and mitochondria*. Cardiovasc Res, 2013. **98**(2): p. 259-68.
39. Kohlhaas, M., A.G. Nickel, and C. Maack, *Mitochondrial energetics and calcium coupling in the heart*. J Physiol, 2017. **595**(12): p. 3753-3763.
40. Konstantinidis, K., et al., *Mitofusin 2 joins the sarcoplasmic reticulum and mitochondria at the hip to sustain cardiac energetics*. Circ Res, 2012. **111**(7): p. 821-3.
41. Koshiya, T., et al., *Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes*. Science, 2004. **305**(5685): p. 858-62.

42. Liesa, M., M. Palacín, and A. Zorzano, *Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease*. *Physiological reviews*, 2009. **89**(3): p. 799-845.
43. Maack, C., et al., *Elevated cytosolic Na<sup>+</sup> decreases mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake during excitation-contraction coupling and impairs energetic adaptation in cardiac myocytes*. *Circ Res*, 2006. **99**(2): p. 172-82.
44. Maack, C. and B. O'Rourke, *Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics*. *Basic Res Cardiol*, 2007. **102**(5): p. 369-92.
45. Mann, D.L. and M.R. Bristow, *Mechanisms and Models in Heart Failure. The Biomechanical Model and Beyond*, 2005. **111**(21): p. 2837-2849.
46. Mewis, C. and B.M. Balletshofer, *Kardiologie compact : alles für Station und Facharztprüfung; 189 Tab.* 2006: Stuttgart [u.a.] : Thieme, 2006  
2., unveränd. Aufl.
47. Molkenin, J.D. and J. Robbins, *With great power comes great responsibility: using mouse genetics to study cardiac hypertrophy and failure*. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2009. **46**(2): p. 130-136.
48. Moris, D., et al., *The role of reactive oxygen species in the pathophysiology of cardiovascular diseases and the clinical significance of myocardial redox*. *Annals of Translational Medicine*, 2017. **5**(16): p. 326.
49. Mosterd, A. and A.W. Hoes, *Clinical epidemiology of heart failure*. *Heart*, 2007. **93**(9): p. 1137-46.
50. Munzel, T., et al., *Pathophysiological role of oxidative stress in systolic and diastolic heart failure and its therapeutic implications*. *Eur Heart J*, 2015. **36**(38): p. 2555-64.
51. Nickel, A.G., et al., *Reversal of Mitochondrial Transhydrogenase Causes Oxidative Stress in Heart Failure*. *Cell Metab*, 2015. **22**(3): p. 472-84.



52. O'Connell, T.D., et al., *Isolation and culture of adult mouse cardiac myocytes for signaling studies*. AfCS research reports, 2003. **1**(5): p. 1-9.
53. Ong, S.B., et al., *Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury*. Circulation, 2010. **121**(18): p. 2012-22.
54. Osellame, L.D., T.S. Blacker, and M.R. Duchen, *Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function*. Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism, 2012. **26**(6): p. 711-723.
55. Papanicolaou, K.N., et al., *Mitofusin-2 maintains mitochondrial structure and contributes to stress-induced permeability transition in cardiac myocytes*. Molecular and cellular biology, 2011. **31**(6): p. 1309-1328.
56. Parra, V., et al., *Changes in mitochondrial dynamics during ceramide-induced cardiomyocyte early apoptosis*. Cardiovasc Res, 2008. **77**(2): p. 387-97.
57. Ponikowski, P., et al., *2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC*. Eur Heart J, 2016. **37**(27): p. 2129-200.
58. Ranieri, M., et al., *Mitochondrial fusion proteins and human diseases*. Neurology research international, 2013. **2013**.
59. Rassow, J., et al., *Biochemie*. Duale Reihe. 2016: Stuttgart : Thieme, [2016]  
4. Auflage.
60. Redfield, M.M., et al., *Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community: appreciating the scope of the heart failure epidemic*. JAMA, 2003. **289**(2): p. 194-202.
61. Rizzuto, R., et al., *Microdomains with high Ca<sup>2+</sup> close to IP<sub>3</sub>-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria*. Science, 1993. **262**(5134): p. 744-747.

62. Rizzuto, R., et al., *Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling*. Nature reviews Molecular cell biology, 2012. **13**(9): p. 566.
63. Rizzuto, R., et al., *Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> responses*. Science, 1998. **280**(5370): p. 1763-6.
64. Rizzuto, R. and T. Pozzan, *Microdomains of intracellular Ca<sup>2+</sup>: molecular determinants and functional consequences*. Physiol Rev, 2006. **86**(1): p. 369-408.
65. Santel, A., *Get the balance right: Mitofusins roles in health and disease*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2006. **1763**(5): p. 490-499.
66. Santel, A. and M.T. Fuller, *Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 5): p. 867-74.
67. Sawyer, D.B., *Oxidative stress in heart failure: what are we missing?* Am J Med Sci, 2011. **342**(2): p. 120-4.
68. Seidlmayer, L.K., et al., *Inositol 1, 4, 5-trisphosphate-mediated sarcoplasmic reticulum-mitochondrial crosstalk influences adenosine triphosphate production via mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake through the mitochondrial ryanodine receptor in cardiac myocytes*. Cardiovascular research, 2016. **112**(1): p. 491-501.
69. Sharma, V.K., et al., *Transport of Ca<sup>2+</sup> from sarcoplasmic reticulum to mitochondria in rat ventricular myocytes*. Journal of bioenergetics and biomembranes, 2000. **32**(1): p. 97-104.
70. Song, M., et al., *Super-suppression of mitochondrial reactive oxygen species signaling impairs compensatory autophagy in primary mitophagic cardiomyopathy*. Circulation research, 2014. **115**(3): p. 348-353.
71. Song, Z., et al., *OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L*. J Cell Biol, 2007. **178**(5): p. 749-55.

72. Szalai, G., et al., *Calcium signal transmission between ryanodine receptors and mitochondria*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(20): p. 15305-15313.
73. Thannickal, V.J. and B.L. Fanburg, *Reactive oxygen species in cell signaling*. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 2000. **279**(6): p. L1005-L1028.
74. Timmerman, V., A.V. Strickland, and S. Züchner, *Genetics of Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease within the frame of the human genome project success*. Genes, 2014. **5**(1): p. 13-32.
75. Tsutsui, H., S. Kinugawa, and S. Matsushima, *Oxidative stress and heart failure*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2011. **301**(6): p. H2181-H2190.
76. Vallbracht, C. and D. Horstkotte, *Herz Kreislauf kompakt : 55 Tabellen*. 2006: Darmstadt : Steinkopff, 2006.
77. van Riet, E.E., et al., *Epidemiology of heart failure: the prevalence of heart failure and ventricular dysfunction in older adults over time. A systematic review*. Eur J Heart Fail, 2016. **18**(3): p. 242-52.
78. Wang, X. and M.G. Roper, *Measurement of DCF fluorescence as a measure of reactive oxygen species in murine islets of Langerhans*. Anal Methods, 2014. **6**(9): p. 3019-3024.
79. Wong, A.Y., A. Fabiato, and J.B. Bassingthwaighthe, *Model of calcium-induced calcium release mechanism in cardiac cells*. Bull Math Biol, 1992. **54**(1): p. 95-116.
80. Wust, R.C., M. Helmes, and G.J. Stienen, *Rapid changes in NADH and flavin autofluorescence in rat cardiac trabeculae reveal large mitochondrial complex II reserve capacity*. J Physiol, 2015. **593**(8): p. 1829-40.
81. Ying, W., *NAD<sup>+</sup>/NADH and NADP<sup>+</sup>/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences*. Antioxid Redox Signal, 2008. **10**(2): p. 179-206.

82. Zima, A.V., et al., *Ca handling during excitation-contraction coupling in heart failure*. Pflugers Arch, 2014. **466**(6): p. 1129-37.

83. Zuchner, S., et al., *Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A*. Nat Genet, 2004. **36**(5): p. 449-51.

## 8 Danksagung

Allen voran möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Christoph Maack für die Überlassung des Themas und der hervorragenden Betreuung bedanken. Durch deinen außerordentlichen Enthusiasmus für die kardiologische Wissenschaft hast du auch in mir die Begeisterung für die Wissenschaft wecken können, welche die hier vorliegende Arbeit ermöglicht und meinen Blick für wissenschaftliche Arbeiten nachhaltig geschärft hat. Durch den engen persönlichen Kontakt, den wir in gemeinsamen Homburger Zeiten pflegten, bist du für mich nicht nur Arzt und Wissenschaftler, sondern auch Freund und Vorbild.

Danke auch an Dr. rer. nat. Michael Kohlhaas für die Einarbeitung in die Methodik und in das gesamte Forschungslabor. Bei all den Fragen und Sorgen, die im Rahmen dieser Arbeit aufgetreten sind, bist du oftmals für mich der erste Anlaufpunkt gewesen. Stets hast du mir mit Rate und Tat zur Seite gestanden, was ich sehr zu schätzen weiß.

In diesem Sinne möchte ich auch bei den anderen Kolleginnen und Kollegen im Labor bedanken, namentlich Nina Schnellbach, Michelle Gulentz, Dr. rer. nat. Alexander Nickel und Dr. rer. nat. Mathias Hohl bedanken. Auch allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der kardiologischen Forschungslabore gilt mein Dank.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, denen ich diese Arbeit widme. Eure grenzenlose Liebe, eure unaufhörliche Hilfsbereitschaft, eure unendliche Geduld bilden das Fundament aller jetzigen und zukünftigen Errungenschaften in meinem Leben. Ohne euch wäre all dies niemals möglich gewesen.