

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

**Die Rolle von Mitofusin 2 für die Calcium-Transmission
zwischen dem sarkoplasmatischen Retikulum und Mitochondrien
sowie die bioenergetische Adaptation in Kardiomyozyten**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2015

vorgelegt von:

Maxie Gesine Meiser

geboren am 27.02.1987

in Neunkirchen (Saar)

*"Healing is best accomplished when art and science are conjoined,
when body and spirit are probed together."*

Bernard Lown,
The Lost Art of Healing

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS	V
ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE.....	VI
1. ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY	1
1.1 Die Rolle von Mitofusin 2 für die Calcium-Transmission zwischen dem sarkoplasmatischen Retikulum und Mitochondrien sowie die bioenergetische Adaptation in Kardiomyozyten	1
1.2 The role of Mitofusin 2 for calcium transmission between the sarcoplasmic reticulum and mitochondria as well as for the bioenergetic feedback response in cardiac myocytes	3
2. EINLEITUNG.....	5
2.1 Hintergrund / Literaturübersicht.....	5
2.1.1 Die Prozesse der elektromechanischen Kopplung	5
2.1.2 Die Physiologie der Energetik.....	7
2.1.3 Die zelluläre Entstehung und Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies.....	8
2.1.4 Die mitochondriale Calciumaufnahme als Regulator mitochondrialer und zellulärer Funktionen	10
2.1.5 Das Konzept der mitochondrialen Calcium-Mikrodomäne	12
2.1.6 Die Mitofusine Mfn1 und Mfn2 und ihre Bedeutung	14
2.1.7 Mitofusin 2 als Linkerprotein zwischen SR und Mitochondrien?	16
2.1.8 Pathophysiologische Veränderungen bei chronischer Herzinsuffizienz...	18
2.2 Ziel der Arbeit / Fragestellung.....	21
3. MATERIAL	24
3.1 Verwendete Substanzen.....	24
3.1.1 Substanzen zur Herstellung der Puffer- und Spüllösungen	24
3.1.2 Farbstoffe und Lösungsmittel.....	25

3.1.3	Sonstige verwendete Substanzen	25
3.2	Geräte und Material	26
3.2.1	Setup zur Kontraktilitäts- und Fluoreszenzmessung.....	26
3.2.2	Sonstige Geräte und Instrumentarium	27
3.2.3	Verbrauchsmaterialien.....	28
3.2.4	Computersoftware	28
4.	METHODEN	29
4.1	Tiermodelle	29
4.2	Isolation adulter Kardiomyozyten der Maus	30
4.3	Zellkultur	33
4.4	Elektrische Feldstimulation und Epifluoreszenzmikroskopie.....	34
4.4.1	Das IonOptix-System®	34
4.4.2	Vorbereitungen	36
4.4.3	Messprotokolle.....	38
4.4.4	Kontraktilitätsmessungen.....	39
4.4.5	Messung der cytosolischen Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_c$ mit Indo-1AM. 40	
4.4.6	Messung des Redoxstatus über die Autofluoreszenzen von NAD(P)H und FAD	42
4.4.7	Messung des mitochondrialen Membranpotenzials ($\Delta\Psi_m$) mit TMRM.....	45
4.4.8	Messung des mitochondrialen Superoxids $[\cdot O_2^-]_m$ mit MitoSOX.....	46
4.5	Graphische und statistische Auswertung	48
5.	ERGEBNISSE	49
5.1	Die Zellkontraktilität von Mfn2-KO-Myozyten	49
5.2	Die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration $[Ca^{2+}]_c$ in Mfn2-KO-Myozyten.....	52
5.3	Der mitochondriale Redoxstatus von Mfn1-KO- und Mfn2-KO-Myozyten	54
5.4	Das mitochondriale Membranpotenzial $\Delta\Psi_m$ von Mfn2-KO-Myozyten.....	57
5.5	Die mitochondriale Superoxid-Produktion $[\cdot O_2^-]_m$ in Mfn2-KO-Myozyten.....	58
5.6	Weitere relevante Ergebnisse	59

6. DISKUSSION	61
6.1 Die Ergebnisse im Kontext aktueller Literatur	61
6.2 Schlussfolgerung und Ausblick	69
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	71
8. PUBLIKATIONEN UND PREISE.....	83
9. DANKSAGUNG	84

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die Prozesse der elektromechanischen Kopplung in Kardiomyozyten.....	6
Abb. 2: Die Rolle der Mitofusine Mfn1 und Mfn2 bei der mitochondrialen Fusion.....	16
Abb. 3: Physiologisches und pathophysiologisches Zusammenspiel zwischen elektromechanischer Kopplung, mitochondrialer Energetik und ROS-Produktion in Kardiomyozyten	22
Abb. 4: Postnatale Kardiomyozyten-spezifische Ablation von Mfn1 bzw. Mfn2	29
Abb. 5: Modifizierte Langendorff-Perfusionsanlage zur enzymatischen Myozytenisolation	31
Abb. 6: Das Setup zur Fluoreszenz- und Kontraktilitätsmessung	35
Abb. 7: Messprotokolle zur Kontraktilitäts- und Fluoreszenzmessung.....	38
Abb. 8: Kalibrierung der Fluoreszenzsignale von NAD(P)H/FAD mit FCCP u. CN....	44
Abb. 9: Kontraktilität von Mfn2-KO-Myozyten	50
Abb. 10: Kontraktionskinetik von Mfn2-KO-Myozyten.....	51
Abb. 11: Cytosolische Ca ²⁺ -Konzentration in Mfn2-KO-Myozyten	53
Abb. 12: Mitochondrialer Redoxstatus in Mfn1-KO-Myozyten	55
Abb. 13: Mitochondrialer Redoxstatus in Mfn2-KO-Myozyten	56
Abb. 14: Mitochondriales Membranpotenzial $\Delta\Psi_m$ in Mfn2-KO-Myozyten.....	57
Abb. 15: Mitochondriale Superoxidproduktion [$\cdot\text{O}_2^-$] _m in Mfn2-KO-Myozyten	58
Abb. 16: Mitochondriale Ca ²⁺ -Konzentration [Ca^{2+}] _m in Mfn2-KO-Myozyten.....	59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der zur Myozytenisolation verwendeten Puffer und Lösungen	30
Tabelle 2: Zusammensetzung der zur Kontraktilitäts- und Fluoreszenzmessung verwendeten Lösungen.....	36
Tabelle 3: Fluoreszenzeigenschaften von Indo-1 (AM) sowie Filter- und Spiegel-Einstellungen zur Fluoreszenzmessung an der Messanlage	40
Tabelle 4: Autofluoreszenzeigenschaften von NAD(P)H und FAD sowie Filter- und Spiegel-Einstellungen zur Fluoreszenzmessung an der Messanlage	42
Tabelle 5: Fluoreszenzeigenschaften von TMRM sowie Filter- und Spiegel-Einstellungen zur Fluoreszenzmessung an der Messanlage	45
Tabelle 6: Fluoreszenzeigenschaften von MitoSOX sowie Filter- und Spiegel-Einstellungen zur Fluoreszenzmessung an der Messanlage	46

Abkürzungen und Symbole

°C	Grad Celsius
$\cdot\text{O}_2^-$	Superoxidradikal
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AR	Adrenorezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
Ca^{2+}	Calcium-Ion
CHF	engl. chronic heart failure (chronische Herzinsuffizienz)
CK	Creatinkinase
Cre	engl. cyclization recombination (Rekombinase)
EC-Coupling	engl. excitation-contraction coupling (elektromechanische Kopplung)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ETC	engl. electron transport chain (Atmungskette)
FAD	Flavinadenindinukleotid (oxidierte Form)
FADH_2	Flavinadenindinukleotid (reduzierte Form)
GTPase	Guanosintriphosphatase
H^+	Wasserstoff-Ion (Proton)
H_2O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
Hz	Hertz
I_{Ca}	Ca^{2+} -Einstrom
IMM	innere Mitochondrienmembran
IMR	Intermembranraum
I_{Na}	Na^+ -Einstrom

IP ₃	Inositoltriphosphat
jSR	junktionales Sarkoplasmatisches Retikulum
K _{0.5}	Michaeliskonstante (auch K _m)
KO	engl. Knockout (Deletion)
Li ⁺	Lithium-Ion
LTCC	engl. L-type calcium channel (L-Typ Calciumkanal)
LV	linker Ventrikel
M	Molar
MAM	engl. mitochondria associated membranes
MARF	engl. mitochondrial assembly regulatory factor
MCU	Mitochondrialer Ca ²⁺ -Uniporter
mDNA	mitochondriale DNA
Mfn	Mitofusin
MICU1	engl. mitochondrial calcium uptake 1
min	Minute
Mn ²⁺	Mangan-Ion
mNHE	mitochondrialer Na ⁺ -H ⁺ -Austauscher
Mn-SOD	Mn ²⁺ -abhängige Superoxiddismutase
mPTP	engl. mitochondrial permeability transition pore
Na ⁺	Natrium-Ion
NAD(P) ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat) (oxidierte Form)
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat) (reduzierte Form)
NCLX	mitochondrialer Na ⁺ -Ca ²⁺ -Austauscher
NCX	Na ⁺ -Ca ²⁺ -Austauscher
nNOS	neuronaler NO-Synthase
Nnt	mitochondriale NAD(P)-Transhydrogenase

NO	Stickstoffmonoxid
NOX	NADPH-Oxidase
O ₂	Sauerstoff
OMM	engl. outer mitochondrial membrane (äußere Mitochondrienmembran)
OPA1	engl. optic atrophy 1
PACS-2	engl. phosphofurin acidic cluster sorting protein 2
PCr	Phosphokreatin
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PINK1	PTEN(phosphatase and tensin homolog)-induziertes putatives Kinaseprotein 1
ROS	engl. reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
RT	Raumtemperatur
RyR	Ryanodinrezeptor
SEM	engl. standard error of the mean (Standardfehler)
SERCA	engl. sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase (SR-Ca ²⁺ -ATPase)
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
T-Tubulus	Transversal-Tubulus
VDAC	engl. voltage-dependent anion channel
vs.	versus
WT	Wildtyp

1. Zusammenfassung / Summary

1.1 Die Rolle von Mitofusin 2 für die Calcium-Transmission zwischen dem sarkoplasmatischen Retikulum und Mitochondrien sowie die bioenergetische Adaptation in Kardiomyozyten

Hintergrund: Die mitochondriale Calcium(Ca^{2+})-Aufnahme stimuliert Schlüsselenzyme des Citratzyklus, welcher NADH für die ATP-Produktion und NADPH zur Elimination von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) bereitstellt. Bei chronischer Herzinsuffizienz ist die mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme aufgrund einer Dysregulation der intrazellulären Ca^{2+} - und Na^+ -Homöostase reduziert, was zu einer Fehlanpassung der Energieproduktion an den Energiebedarf und zu oxidativem Stress führt. Es ist jedoch unklar, ob diese Mängel eine kausale Rolle für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz spielen. Durch die enge Assoziation zwischen dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) und Mitochondrien ist die Entstehung einer "Mikrodomäne" möglich, welche die effiziente mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme trotz der niedrigen Ca^{2+} -Affinität des mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporters (MCU) erklären könnte. Die molekularen Determinanten einer solchen Mikrodomäne sind jedoch derzeit noch unzureichend geklärt.

Methoden und Ergebnisse: Die Mitofusine (Mfn) 1 und 2 sind Proteine, die ursprünglich dafür bekannt sind, dass sie im Rahmen mitochondrialer Fusionsprozesse die Verschmelzung von Mitochondrien, insbesondere der äußeren mitochondrialen Membranen, vermitteln und diese Funktion redundant ausüben. Darüber hinaus wurde in Fibroblasten beobachtet, dass Mfn2 (aber nicht Mfn1) eine physikalische Verbindung zwischen den Membranen von Mitochondrien und dem endoplasmatischen Retikulum (ER) herstellt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob Mfn2 auch in Herzmuskelzellen über eine physikalische Verbindung von Mitochondrien mit dem SR eine mitochondriale Ca^{2+} -Mikrodomäne etabliert, über die die Ca^{2+} -Transmission zwischen dem SR und Mitochondrien gewährleistet wird. Um dies zu testen, wurden Herzmuskelzellen von Mäusen mit postnataler Kardiomyozyten-spezifischer Deletion (engl. knockout, KO) von Mfn1 oder Mfn2 verwendet. Hierfür wurden isolierte intakte Kardiomyozyten bei 0,5 Hz

elektrisch stimuliert und dann eine physiologische Zunahme der Arbeitslast durch Applikation des β -adrenergen Agonisten Isoprenalin (30 nM) sowie eine Steigerung der Stimulationsfrequenz auf 5 Hz für 3 min simuliert. Während dieses Übergangs kam es zu einer Oxidation von NAD(P)H und FADH₂, den Hauptprodukten des Citratzyklus ($p < 0,01$; gemessen anhand der Autofluoreszenz), und es trat ein leichter Anstieg der mitochondrialen Superoxidbildung ($p < 0,05$; durch MitoSOX bestimmt) in Mfn2-KO- gegenüber Wildtyp (WT) Myozyten auf, trotz eines konstant bleibenden mitochondrialen Membranpotentials (durch TMRM bestimmt). Im Gegensatz dazu wurden keine solchen Veränderungen in Mfn1-KO-Mäusen nachgewiesen.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit (durch andere Wissenschaftler unserer Gruppe bzw. in Kooperation mit anderen Gruppen durchgeführten) Patch-Clamp-Studien, in denen die mitochondriale Ca²⁺-Akkumulation (durch Rhod-2 bestimmt) in Mfn2-KO-Myozyten bei 0,5 Hz unter Isoprenalin im Vergleich zu Wildtypzellen reduziert war. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten eine Erweiterung des Membranspalts zwischen dem SR und Mitochondrien. Mfn2-KO-Mäuse (aber nicht Mfn1-KO-Mäuse) entwickelten im Alter von 16 Wochen eine dilatative Kardiomyopathie.

Zusammenfassung: Mfn2 (aber nicht Mfn1) verknüpft Mitochondrien mit dem SR und stellt somit eine wichtige molekulare Determinante der mitochondrialen Ca²⁺-Mikrodomäne dar. Dies hat signifikante Auswirkungen auf die bioenergetische Rückkopplung, welche die Energieproduktion an den Bedarf anpasst, und die Regulierung von oxidativem Stress. Defekte in der Ca²⁺-Übertragung zwischen SR und Mitochondrien können eine kausale Rolle bei der Entwicklung einer chronischen Herzinsuffizienz spielen.

1.2 The role of Mitofusin 2 for calcium transmission between the sarcoplasmic reticulum and mitochondria as well as for the bioenergetic feedback response in cardiac myocytes

Background: Mitochondrial calcium (Ca^{2+}) uptake stimulates key enzymes of the Krebs cycle, which produces NADH for ATP production and NADPH that is required for elimination of H_2O_2 . In heart failure, dysregulation of cytosolic Ca^{2+} and Na^+ homeostasis accounts for reduced mitochondrial Ca^{2+} uptake which results in energetic mismatch and oxidative stress. It is unclear, however, whether these defects play a causal role for the development of heart failure. Close association between the sarcoplasmic reticulum (SR) and mitochondria are thought to constitute a "microdomain" that could explain efficient mitochondrial Ca^{2+} uptake despite a low Ca^{2+} affinity of the mitochondrial Ca^{2+} uniporter. The molecular determinants of such a microdomain, however, are presently unknown.

Methods and Results: Mitofusin (Mfn) 1 and 2 are proteins originally known to mediate mitochondrial outer membrane fusion in a redundant way. Furthermore, Mfn2 (but not Mfn1) is supposed to play a role in endoplasmic reticulum (ER)-mitochondrial tethering. The aim of this study was to determine whether in cardiac myocytes, Mfn2 also controls a Ca^{2+} microdomain between the SR and mitochondria. Cardiac myocytes of mice with postnatal and cardiomyocyte-specific deletion (KO) of Mfn1 or Mfn2 were isolated and paced at 0.5 Hz, and then a physiological increase in workload was simulated by applying the β -adrenergic receptor agonist isoproterenol (30 nM) and increasing stimulation frequency to 5 Hz for 3 min. During this transition, an oxidation of NAD(P)H and FADH_2 , the main products of the Krebs cycle ($p < 0.01$, as determined by their autofluorescence), and a slight increase in mitochondrial superoxide formation ($p < 0.05$, as determined by MitoSOX) occurred in Mfn2-KO vs. wildtype (WT) myocytes, despite unchanged mitochondrial membrane potential (as determined by TMRM). In contrast, no such changes were detected in Mfn1-KO mice.

These results are in line with patch-clamp-studies (conducted by other members of our group or in cooperation with other groups), where mitochondrial Ca^{2+} accumulation (measured by rhod-2) was blunted at 0.5 Hz in Mfn2-KO myocytes compared to WT controls. Electron microscopic studies of SR-mitochondrial

architecture revealed a widening of the gap between mitochondria and the SR. *In vivo*, Mfn2-KO mice (but not Mfn1-KO mice) developed dilated cardiomyopathy by the age of 16 weeks.

Conclusions: Mfn2 (but not Mfn1) tethers mitochondria to the SR and thus, is a crucial molecular determinant of the mitochondrial Ca^{2+} microdomain. This has important implications for energy supply and demand matching and the control of oxidative stress. Defects in mitochondria-SR Ca^{2+} transmission can play a causal role for the development of heart failure.

2. Einleitung

2.1 Hintergrund / Literaturübersicht

2.1.1 Die Prozesse der elektromechanischen Kopplung

Das Herz ist der Motor des Lebens – ein muskuläres Hohlorgan, das in seiner Pumpfunktion ein Höchstmaß an Ausdauer, Präzision und Anpassungsfähigkeit beweist. Der gesunde menschliche Herzmuskel kontrahiert zwischen 50 und 80 Mal pro Minute und pumpt dabei etwa 5 Liter Blut durch den Körper. Mit jedem Herzschlag verrichtet das Organ eine Arbeit von etwa 1 Joule, insgesamt rund 100.000 Joule pro Tag.

Die elektromechanische Kopplung umfasst die Prozesse von der elektrischen Erregung der Herzmuskelzelle (Kardiomyozyte) bis zur mechanischen Ausführung einer Kontraktion und der nachfolgenden Relaxation. Calciumionen (Ca^{2+}) spielen hierbei eine zentrale Rolle.¹⁰ Während des myokardialen Aktionspotenzials kommt es durch die Depolarisation der Zellmembran zum Einstrom von Ca^{2+} über spannungsabhängige L-Typ Calciumkanäle (LTCC). Dieser triggert eine größere Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) über Ryanodinrezeptoren (RyR) im Sinne einer „ Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung“.³⁹ Das Calcium diffundiert zu den Myofilamenten und führt zur Kontraktion der Zelle. In der Diastole kommt es zur Relaxation der Myofibrillen, indem das gebundene Ca^{2+} zurück ins Cytosol diffundiert, von wo es mittels energieabhängiger Transportmechanismen eliminiert wird. Hierbei wird der Großteil (im Menschen ~70%) des cytosolischen Ca^{2+} über die Calciumpumpe des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA) zurück in das SR gepumpt. Der Anteil an Ca^{2+} , welcher über LTCC in die Zelle gelangte, wird über den Natrium(Na^+)- Ca^{2+} -Austauscher (NCX) der Zellmembran wieder zurück in den Extrazellulärraum befördert (siehe Abb. 1). Hinsichtlich der anteilmäßigen Beteiligung von SERCA und NCX an der diastolischen Ca^{2+} -Elimination bestehen Spezies-spezifische Unterschiede.¹⁰ Die cytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen $[\text{Ca}^{2+}]_c$ schwanken zyklisch zwischen diastolischen Werten von ~100 nM und systolischen Spitzenwerten von ~2 μM .

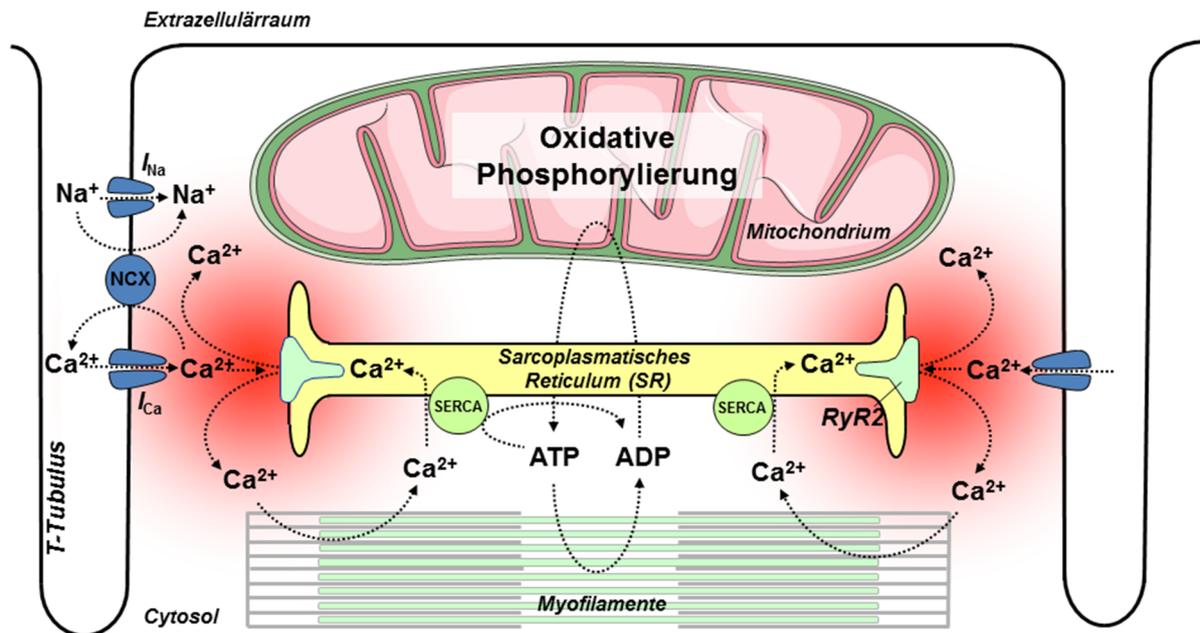


Abb. 1: Die Prozesse der elektromechanischen Kopplung in Kardiomyozyten

Transversal(T)-Tubulus; spannungsabhängiger Ca²⁺-(*I_{Ca}*) und Na⁺-Einstrom (*I_{Na}*); SR, Sarkoplasmatisches Retikulum; SERCA, SR-Ca²⁺-ATPase; RyR2, Ryanodinrezeptor 2; ATP, Adenosintriphosphat; ADP, Adenosindiphosphat (Abb. modifiziert nach C. Maack)

Bei einer Steigerung der Arbeitslast des Herzens *in vivo* kommt es zur physiologischen Anpassung der Herzmuskelleistung über die Wirkung der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin an β_1 -Adrenozeptoren (AR). Diese β -adrenerge Stimulation führt am Sinusknoten zu einer Steigerung der Herzfrequenz (positiv chronotrop), welche über das Erregungsleitungssystem auf den gesamten Herzmuskel fortgeleitet wird. In ventrikulären Kardiomyozyten führt die β -adrenerge Stimulation zur Erhöhung des sarkolemmlen Ca²⁺-Influx (via *I_{Ca}*) während der Systole. Die gleichzeitige Steigerung der Ca²⁺-Effluxmechanismen (via SERCA und NCX) führt sowohl zu einer verbesserten Relaxation der Myofibrillen (positiv lusitrop) als auch über die Erhöhung der Amplitude cytosolischer Ca²⁺-Transienten zur Verstärkung der Kontraktionskraft (positiv inotrop).¹⁰

Die subzelluläre Architektur von Kardiomyozyten ist an die spezifischen funktionellen Anforderungen der Prozesse der elektromechanischen Kopplung angepasst. Durch Einstülpungen der Zellmembran (sarkolemmlale T-Tubuli) entstehen langstreckige enge Nachbarschaftsbeziehungen zwischen Zellmembran und (junktionaler) jSR-Membran – sog. Dyaden – und damit auch zwischen L-Typ-Ca²⁺-Kanälen und Ryanodinrezeptoren. Im Membranspalt der Dyade sind räumlich und zeitlich (durch Diffusion) limitierte Ca²⁺-Peaks möglich, deren Amplituden diejenigen der globalen cytosolischen Transienten übersteigen. In Computersimulationen wurde für diese

lokalen Ca^{2+} -Konzentrationen ein Maximum im Bereich von etwa $10 \mu\text{M}$ bis 7mM errechnet.⁷¹ Aufgrund der räumlich und zeitlich heterogenen Verteilung des cytosolischen Ca^{2+} innerhalb verschiedener Kompartimente wurde der Begriff der Calcium-Mikrodomänen („ Ca^{2+} microdomains“⁹⁴) etabliert, wobei der Membranspalt der Dyade die am besten beschriebene Ca^{2+} -Mikrodomäne in Kardiomyozyten darstellt.⁷¹

2.1.2 Die Physiologie der Energetik

Im Rahmen der Prozesse der elektromechanischen Kopplung werden an Calciumpumpen und Myofilamenten große Mengen Energie in Form von ATP verbraucht. Daher spielen Mitochondrien als Kraftwerke der Zelle insbesondere im Herzmuskelgewebe eine tragende Rolle, indem sie über die oxidative Phosphorylierung den hohen ATP-Bedarf der Kardiomyozyten decken.

In der Mitochondrienmatrix produziert der Citratzyklus (auch Krebszyklus) die Redoxäquivalente NADH und FADH_2 , die ihre Elektronen an die in der inneren Mitochondrienmembran (IMM) lokalisierten Komplexe I und II der Atmungskette (engl. electron transport chain, ETC) abgeben. Über eine Sequenz nachgeschalteter Redoxreaktionen führt dies zur Translokation von Protonen über die IMM in den Intermembranraum (IMR), wodurch ein Protonengradient (ΔpH) erzeugt wird. Zusammen mit dem elektrochemischen Membranpotenzial ($\Delta\Psi_m$) stellt er die Treibkraft (engl. proton motive force, $\Delta\mu_H$) für die ATP-Produktion aus ADP an der F_1F_0 -ATP-Synthase dar.⁶

Für die physiologische Herzfunktion ist ein in besonderem Maße koordiniertes intrazelluläres Energiemanagement von essentieller Bedeutung. Ein einzelner Herzschlag verbraucht bereits $\sim 2\%$ des in der Zelle vorhandenen ATP, und innerhalb einer Minute ist der gesamte ATP-Pool in Kardiomyozyten aufgebraucht.⁸¹ Da sich die Arbeitslast des Herzens und damit auch der myokardiale ATP-Verbrauch *in vivo* kurzfristig drastisch ändern können und eine Speicherung von ATP innerhalb der Zelle nur eingeschränkt möglich ist, muss die ATP-Produktion unmittelbar auf den Energieverbrauch abgestimmt werden. Ca^{2+} und ADP kommt hierbei die wesentliche Rolle in der Regulation der Zellatmung^{6, 14, 30} und damit bei der Homöostase des intrazellulären ATP/ADP-Quotienten zu.⁵⁶

Bei einer physiologischen Erhöhung der Arbeitslast des Herzens im Sinne einer β -adrenergen Stimulation steigen die Amplituden und Frequenzen cytosolischer Ca^{2+} -Transienten an, wodurch sich der Energieverbrauch der am Ca^{2+} -Stoffwechsel beteiligten Ionenpumpen und -transporter erhöht. Das infolge vermehrter ATP-Hydrolyse anfallende ADP bewirkt eine Beschleunigung der ATP-Regeneration an der mitochondrialen ATP-Synthase. Da die ATP-Produktion unter Ausnutzung des Protonengradienten ($\Delta\mu_{\text{H}}$) abläuft, wird dieser durch Mehrabgabe von Elektronen aus dem NADH- (und FADH_2 -) Pool aufrechterhalten. Folglich kommt es initial zur Verschiebung des Redox-Gleichgewichtes in Richtung des oxidierten NAD^+ (und FAD) im Sinne einer Netto-Oxidation der Redoxäquivalente. Der im Rahmen der β -adrenergen Stimulation (physiologische Arbeitslasterrhöhung) der Kardiomyozyten erfolgende Frequenz- und Amplitudenanstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Transienten führt auch zur vermehrten Ca^{2+} -Aufnahme und Ca^{2+} -Akkumulation in Mitochondrien. Dort stimuliert Ca^{2+} die Pyruvatdehydrogenase (PDH) sowie geschwindigkeitsbestimmende Schlüsselenzyme des Citratzyklus (Isocitrat- und α -Ketoglutarat-Dehydrogenase) und beschleunigt dadurch wiederum die Regeneration von oxidiertem NAD^+ zu NADH. Das so entstehende Gleichgewicht zwischen der ADP-induzierten Beschleunigung der Atmung und der durch Ca^{2+} bewirkten Stimulation des Citratzyklus gewährleistet den konstanten Redoxstatus von NADH/NAD^+ und FADH_2/FAD (Abb. 3, rechter oberer Teil).

Die zentrale Rolle von Ca^{2+} als Signalmolekül für die Regulation der Energieproduktion in Mitochondrien macht die Mechanismen sowie die Kinetik der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme, insbesondere im Herzmuskel, zu bedeutsamen Bausteinen im Verständnis des zellulären Energiemanagements.

2.1.3 Die zelluläre Entstehung und Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species, ROS) sind toxische Formen des Sauerstoffs. Sie entstehen einerseits als Nebenprodukte des physiologischen Zellstoffwechsels aerober Organismen, sowie andererseits im Rahmen pathologischer Prozesse und können durch zelleigene Entgiftungsmechanismen eliminiert werden. Sämtliche Zwischenprodukte, die bei der Reduktion von Sauerstoff (O_2) zu Wasser (H_2O) anfallen, werden der Gruppe der ROS zugerechnet. Hierzu gehören insbesondere das Superoxid-Anion als freies

Radikal ($\cdot\text{O}_2^-$, auch Hydroperoxid-Anion) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Oxidativer Stress entsteht, wenn die anfallende ROS-Menge das physiologische Ausmaß überschreitet und ein Ungleichgewicht zwischen ROS-Produktion und -Neutralisation eintritt. Es können oxidative Schäden an Matrixproteinen und -enzymen sowie der mitochondrialen DNA (mtDNA) auftreten.⁷⁶ In Bezug auf Kardiomyozyten beeinträchtigen ROS nachweislich das Ca^{2+} -Handling, die Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente, verursachen Arrhythmien und tragen über die Aktivierung entsprechender Signalwege (Hypertrophie, Apoptose, Nekrose) zu (maladaptiven) Remodeling-Prozessen bei.⁸¹

Mitochondrien stellen eine physiologische Quelle reaktiver Sauerstoffspezies innerhalb der Zelle dar. Im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung entsteht an den Komplexen I und III der Atmungskette Superoxid ($\cdot\text{O}_2^-$),^{2, 7} welches von der mitochondrialen Mangan(Mn^{2+})-abhängigen Superoxid-Dismutase (Mn-SOD) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgesetzt wird. H_2O_2 wiederum wird über Enzymsysteme eliminiert, welche allesamt NADPH als Regenerator benötigen (siehe Abb. 3, linker oberer Teil). Da in Mitochondrien die Regeneration von NADPH aus Produkten des Citratzyklus (NADH,⁶³ Isocitrat, Malat) erfolgt, ist die mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme über die Stimulation des Citratzyklus auch zur Vermeidung von oxidativem Stress wichtig. Dieser Zusammenhang zeigt sich auch experimentell in der gesteigerten H_2O_2 -Bildung, wenn die mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme durch den MCU-Inhibitor Ru360 blockiert wird.⁶⁰

Besonders eine stark reduzierte, also Elektronen beladene Atmungskette begünstigt die Bildung von Superoxid als Ausweichreaktion der Elektronen. Dies ist insbesondere bei hohem Substratangebot und gleichzeitig niedrigem Energie-, und damit auch niedrigem Sauerstoff-Verbrauch der Fall.³ Dieser zellphysiologisch als „state 4 respiration“ bezeichnete Zustand ist in Kardiomyozyten aufgrund des permanenten Energieumsatzes vernachlässigbar. Bei einer Erhöhung der Arbeitslast der Zelle wird durch die ADP-induzierte Beschleunigung der Zellatmung die ETC vermehrt oxidiert und so die Reduktion von O_2 zu H_2O durch die Cytochrom-Oxidase (Komplex IV) begünstigt. Die $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung an den Komplexen I und III wird dabei effektiv vermindert.⁷ Das Konzept des Redox-optimierten ROS-Gleichgewichtes („redox-optimized ROS balance“³) postuliert das Redoxmilieu als zentrales Bindeglied zwischen mitochondrialer Zellatmung und ROS-Entstehung. Demnach

halten Mitochondrien einen intermediären Redoxstatus aufrecht, der ein dynamisches Gleichgewicht zwischen physiologischer ROS-Entstehung und den zelleigenen Entgiftungswegen ermöglicht und exzessiver ROS-Bildung vorbeugt.^{3, 23} Über die mitochondriale ROS-Entstehung im Verlauf der Atmungskette hinausgehend wird als weitere mögliche Quelle mitochondrialen Superoxids eine entkoppelte neuronale NO-Synthase (nNOS) in Betracht gezogen,³² deren Vorkommen in Mitochondrien jedoch kontrovers diskutiert wird.¹³

2.1.4 Die mitochondriale Calciumaufnahme als Regulator mitochondrialer und zellulärer Funktionen

Ca²⁺ ist einer der wichtigsten Regulatoren der oxidativen Phosphorylierung, indem es die geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme des Citratzyklus stimuliert und damit die Verfügbarkeit von NADH und FADH₂ für die Atmungskette steigert.^{6, 71} Die funktionelle Bedeutung der mitochondrialen Calciumaufnahme liegt damit insbesondere in der Anpassung der Energieproduktion an den zellulären Energieverbrauch (Abb. 3, rechter oberer Teil). Zudem ist sie über die Citratzyklus-abhängige Regeneration von NADPH an der Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt (Abb. 3, linker oberer Teil).

Eine exzessive mitochondriale Ca²⁺-Aufnahme („Ca²⁺ overload“) kann über die Öffnung einer Ca²⁺-sensitiven Membranpore (engl. mitochondrial permeability transition pore, mPTP) und nachfolgender übermäßiger mitochondrialer ROS-Entstehung zur „programmierten Zellnekrose“ führen. Entsprechende Ergebnisse lieferten Studien an Kardiomyozyten, die durch eine Sequenz aus Ischämie und Reperfusion gestresst wurden.¹⁰³ Allerdings scheinen intramitochondriale Ca²⁺-Puffersysteme zu existieren, welche dynamisch und Phosphat-abhängig arbeiten und in pathologischen Situationen den mitochondrialen Ca²⁺-Overload hinauszögern können.¹¹⁶ Insgesamt werden Mitochondrien aufgrund ihrer zentralen Rolle im Zellstoffwechsel auch als Regulatoren von Zellüberleben und Zelltod („gatekeepers of life and death“⁸³) angesehen.

Den primären Mechanismus der mitochondrialen Ca²⁺-Aufnahme stellt der mitochondriale Ca²⁺-Uniporter (MCU) dar,^{8, 30} ein Kanalprotein der inneren Mitochondrienmembran mit hoher Ca²⁺-Selektivität.⁵⁹ Der MCU ist Teil eines

makromolekularen Komplexes, der auch MICU1 als Regulator der MCU-Aktivität enthält.⁸⁸ Die Ca^{2+} -Transportkapazität eines einzigen MCU-Moleküls ist mit $5 \cdot 10^6$ Ca^{2+} -Ionen pro Sekunde sehr hoch und die MCU-Dichte in der IMM ($\sim 10\text{-}40/\mu\text{m}^2$) liegt nur geringfügig unterhalb der Dichte der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle in der Zellmembran ($\sim 100/\mu\text{m}^2$).⁵⁹ Neben dem MCU existieren weitere Mechanismen des mitochondrialen Ca^{2+} -Uptakes, denen anteilmäßig eine jedoch weitaus geringere Bedeutung zukommt.^{31, 53}

Als Treibkraft für die mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme dient der elektrochemische Gradient über der IMM, das mitochondriale Membranpotenzial $\Delta\Psi_m$, mit einer Spannung von etwa -180 mV. Untersuchungen zur MCU-Kinetik an isolierten Mitochondrien ergaben, dass die halbmaximale Aktivierung ($K_{0.5}$) des MCU bei Ca^{2+} -Konzentrationen im oberen mikromolaren Bereich ($\sim 10\text{-}20 \mu\text{M}$) erreicht wird.^{46, 47} In Patch-Clamp-Studien lag $K_{0.5}$ sogar noch höher im millimolaren Bereich (~ 20 mM).^{59, 73} Diese Ca^{2+} -Konzentrationen liegen weit oberhalb der normalerweise im Cytoplasma von Kardiomyozyten erreichten systolischen Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) von ~ 100 nM - $2 \mu\text{M}$. Eine zentrale Frage der mitochondrialen Ca^{2+} -Kinetik, nämlich ob Mitochondrien Ca^{2+} langsam (kumulativ) oder schnell (pulsatil) aufnehmen, ist nach wie vor Gegenstand zahlreicher Diskussionen.^{49, 71, 82}

Den dynamischen Gegenpol zur mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme bildet der mitochondriale Ca^{2+} -Export. Über den mitochondrialen Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher (NCLX) wird ein Ca^{2+} -Ion im Austausch gegen drei cytosolische Na^+ - (oder Li^+ -) Ionen aus der mitochondrialen Matrix befördert. Da der mitochondriale Na^+ -Export im Austausch gegen H^+ über einen Na^+ - H^+ -Austauscher (mNHE) erfolgt, findet ein konsekutiver Abbau des über der IMM etablierten Protonengradienten statt. Dieser muss unter energetischem Aufwand über die Atmungskette (ETC) permanent regeneriert werden. Aufgrund der deutlich langsameren Kinetik des NCLX⁸⁷ hat die mitochondriale Ca^{2+} -Ausschleusung einen entscheidenden Einfluss auf die Netto- Ca^{2+} -Akkumulation in Mitochondrien. Unter β -adrenerger Stimulation sind mitochondriale Ca^{2+} -Konzentrationen möglich, die oberhalb der diastolischen Ca^{2+} -Level im Cytosol liegen.^{60, 69} Eine erhöhte cytosolische Na^+ -Konzentration, wie sie beispielsweise im Rahmen der Herzinsuffizienz beschrieben wird, führt über die Beschleunigung des NCLX zu einer verminderten mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme, der vermehrten Oxidation von NAD(P)H und zu oxidativem Stress.^{60, 64, 69}

2.1.5 Das Konzept der mitochondrialen Calcium-Mikrodomäne

Aufgrund der geringen Ca^{2+} -Sensitivität des MCU wurde initial eine nur langsame und kumulative Ca^{2+} -Aufnahme in Mitochondrien angenommen,⁷⁴ denn auch unter β -adrenerger Stimulation liegen die systolischen Ca^{2+} -Konzentrationen im Cytosol 1-2 Größenordnungen unterhalb der halbmaximalen Aktivierung ($K_{0.5}$) des MCU. Eine mögliche Erklärung für diese paradoxe Begebenheit könnte das Konzept einer durch die räumliche Nähe von SR- und Mitochondrienmembran entstehenden mitochondrialen Ca^{2+} -Mikrodomäne liefern. In Nicht-Kardiomyozyten ist dieses Konzept der Interaktion zwischen ER und Mitochondrien bereits gut etabliert.⁹⁴ Erste elektronenmikroskopische Untersuchungen an Kardiomyozyten hatten zwischen RyR und der Mitochondrienoberfläche einen durchschnittlichen Abstand im Bereich von 37-270 nm ergeben.¹⁰² Neuere Auswertungen elektronenmikroskopischer Bilder lieferten für den Membranspalt zwischen jSR und Mitochondrien sogar Messwerte von 15-20 nm.¹⁸ Die in dieser Entfernung von den RyR vorliegende systolische Ca^{2+} -Konzentration wird in Computermodellen auf 10-30 μM geschätzt.⁸⁹ In einem anderen Computermodell war nach Einspeisung aller bekannten kinetischen Daten des MCU sowie des Krebszyklus die Simulation einer mitochondrialen Ca^{2+} -Mikrodomäne möglich. Setzte man Mitochondrien kurzen Ca^{2+} -Impulsen mit einer Amplitude von 10-20 μM aus, folgte auf jeden der extramitochondrialen Ca^{2+} -Transienten ein mitochondrialer Ca^{2+} -Transient („beat-to-beat“) mit schneller Anstiegskinetik.²² Diese Erkenntnisse stehen im Einklang mit den experimentell erhobenen Ergebnissen von Maack et al. in Kardiomyozyten.⁶⁹

In diesem Zusammenhang unterstützen auch einige weitere funktionelle Untersuchungen an Kardiomyozyten das Konzept der mitochondrialen Ca^{2+} -Mikrodomäne: In kardialen H9c2-Zellen (kultivierbare kardiomyozytäre Zelllinie) war die mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme nach der durch Coffein (als Aktivator der RyR) induzierten rapiden SR- Ca^{2+} -Freisetzung vergleichbar mit derjenigen, welche nach Etablierung einer extramitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration von 30 μM zu messen war.¹⁰⁷ Die Hinzugabe cytosolischer Ca^{2+} -Puffer verminderte den cytosolischen, nicht aber den mitochondrialen Ca^{2+} -Transienten nach Coffein-Applikation.^{102, 107} Auch in der Matrix isolierter Mitochondrien (aus Rattenherzen) zeigten sich nach Coffein-Applikation Ca^{2+} -Transienten, welche in der extramitochondrialen Lösung nicht nachzuweisen waren. Möglicherweise ist dies auf den Ca^{2+} -Transfer aus

SR-Fragmenten zurückzuführen, welche als sog. MAM's (von engl. mitochondria associated membranes) – offenbar aufgrund ihrer physikalischen Verbindung mit der äußeren Mitochondrienmembran (OMM) – im Rahmen der Isolationsprozeduren nicht vollständig entfernt wurden.⁴¹ In Studien an Nicht-Kardiomyozyten (HeLa Zellen) und kardialen Myotuben (aus H9c2-Zellen) wurden mittels gentechnischer Methoden Ca^{2+} -sensitive Fluoreszenzproteine an die OMM angebracht. Die anhand der Fluoreszenzauswertungen ermöglichte $[\text{Ca}^{2+}]$ -Messung im Grenzbereich zwischen ER und Mitochondrien ergab eine 5- bis 10-fach höhere Ca^{2+} -Konzentration verglichen mit dem Gesamtcytosol.^{25, 43} Diese Beobachtungen unterstützen die Annahme, dass die Ca^{2+} -Konzentrationen, denen Mitochondrien ausgesetzt sind, ausreichen, um die geringe Ca^{2+} -Affinität des MCU zu überwinden.⁶²

Die Existenz sowie die physiologischen Auswirkungen einer mitochondrialen Ca^{2+} -Mikrodomäne ließen sich auch an Kardiomyozyten adulter Meerschweinchen überprüfen. Hierzu wurde die Effizienz der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme (über das Verhältnis der Transienten von $[\text{Ca}^{2+}]_m$ zu $[\text{Ca}^{2+}]_c$ einer Zelle) nach der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR mit derjenigen nach einem trans-sarkolemmalen Ca^{2+} -Einstrom über den Umkehrmodus des NCX (bei Ca^{2+} -entleertem SR) verglichen.⁶¹ Es ergab sich eine 2-fach effektivere mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme infolge der SR- Ca^{2+} -Freisetzung, wobei eine enge Korrelation zwischen der Anstiegskinetik des cytosolischen Ca^{2+} -Transienten und der Effizienz der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme bestand.⁶¹ Als bioenergetische Konsequenz war das Verhältnis von NAD(P)H/FAD, das einen sensitiven Index für die Aktivität des Krebszyklus darstellt, nach der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR stärker erhöht als nach einem NCX-assoziierten Ca^{2+} -Einstrom vergleichbaren Ausmaßes.⁶¹ Zusammenfassend deuten diese Daten auf eine privilegierte Ca^{2+} -Kommunikation zwischen Mitochondrien und dem SR bzw. ER gegenüber anderen Quellen des cytosolischen Ca^{2+} -Einstromes hin.⁶²

Eine experimentelle Studie von Rizzuto et al. verwendete fluoreszierende Ca^{2+} -Indikatoren, welche über gentechnische Methoden in das Cytosol, die äußere Mitochondrienmembran oder die mitochondriale Matrix neonataler Kardiomyozyten eingebracht wurden, während zusätzlich die Expression des MCU auf genetischer Ebene entweder supprimiert oder hochreguliert wurde.³⁷ Die

Fluoreszenzauswertungen ergaben, dass die Ca^{2+} -Konzentrationen an der äußeren Mitochondrienmembran diejenigen im Gesamtcytosol deutlich überschreiten. Des Weiteren hatte eine veränderte Expression des MCU gegensätzliche Auswirkungen auf mitochondriale und cytosolische Ca^{2+} -Transienten: Während die MCU-Suppression zur Abschwächung der (schnellen) mitochondrialen Ca^{2+} -Transienten führte und gleichzeitig die Amplitude der cytosolischen Ca^{2+} -Transienten erhöhte, hatte die MCU-Hochregulation gesteigerte $[\text{Ca}^{2+}]_m$ - bei verminderten $[\text{Ca}^{2+}]_c$ -Transienten zur Folge.^{37, 62} Bezüglich dieses sogenannten „Shapings“, also der „Modellierung“ cytosolischer Ca^{2+} -Transienten durch die mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme, liegen kontroverse Daten vor: So konnte das Phänomen in einigen Studien nachgewiesen werden,^{37, 69} während es andere Untersuchungen nicht reproduzieren konnten.^{1, 18, 62, 67, 101}

In Kardiomyozyten bilden das SR, die Mitochondrien und die Myofilamente eine sowohl funktionelle als auch strukturelle Einheit. Die Mitochondrien liegen hierbei jeweils zwischen zwei T-Tubuli und werden seitlich vom junktionalen SR (jSR) flankiert. 3D-elektronentomographische Bilder von Hayashi et al. zeigten den sehr engen Kontakt zwischen dem jSR und Mitochondrien in Maus-Kardiomyozyten und ließen darüber hinaus Verbindungs(„Linker“-)Proteine erkennen, die Mitochondrien- und jSR-Membran direkt miteinander zu verknüpfen schienen.⁴⁸ Die molekulare Identität dieser Linkerproteine war jedoch noch nicht vollständig geklärt.

2.1.6 Die Mitofusine Mfn1 und Mfn2 und ihre Bedeutung

Mitochondrien sind Zellorganellen, welche evolutionsbiologisch aus phagozytierten primitiven aeroben Bakterien hervorgingen („Endosymbiontentheorie“).⁹⁹ Die Mitochondrien einer Zelle tauschen im Rahmen zyklischer Fusions- und Teilungsprozesse Matrixbestandteile untereinander aus. Diese Dynamik dient dem Erhalt der physiologischen Homöostase innerhalb der Mitochondrienpopulation und reguliert sowohl Morphologie als auch Funktion der Mitochondrien.^{14, 15} Darüber hinaus werden einzelne gealterte und geschädigte Mitochondrien durch Mitophagie, eine Form der Autophagozytose, selektiv abgebaut.⁵⁷

Da Mitochondrien eine Doppelmembran besitzen, müssen zum Matrixaustausch sowohl die äußeren als auch die inneren Membranen zweier Mitochondrien

miteinander fusionieren, was durch die Interaktionen spezieller Membranproteine reguliert wird. Hierzu gehören im Wesentlichen drei Dynamin-ähnliche GTPasen: Mitofusin 1 (Mfn1) und Mitofusin 2 (Mfn2), welche in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert sind, und das Optic atrophy protein 1 (OPA1) in der inneren Mitochondrienmembran.⁵² Genetische Defekte an den Proteinen der mitochondrialen Fusionsmaschinerie sind als Ursachen verschiedener menschlicher Erbkrankheiten identifiziert. Vor allem hereditäre neurologische Erkrankungen (Charcot-Marie-Tooth-Neuropathie Typ 2A) sowie Augenfehlbildungen (autosomal dominante Optikusatrophie) scheinen auf einer Beeinträchtigung der mitochondrialen Fusion zu beruhen.^{4, 90}

Die Mitofusine (Mfn) 1 und 2 zählen zu den Proteinen der äußeren Mitochondrienmembran und regulieren die mitochondriale Fusion, indem sie über die Bildung homo- und heterotypischer Komplexe die Verschmelzung benachbarter äußerer Mitochondrienmembranen induzieren. Funktionelle Untersuchungen in verschiedenen Geweben zeigen, dass Mfn1 und Mfn2 hinsichtlich ihrer Beteiligung an den mitochondrialen Fusionsprozessen eine funktionell redundante Rolle besitzen, denn weder die alleinige Deletion von Mfn1 noch von Mfn2 beeinträchtigt die mitochondriale Fusion *in vivo*.¹⁶

Auch in Kardiomyozyten finden mitochondriale Fusions- und Teilungsprozesse statt,⁵⁴ allerdings ist die Bedeutung der mitochondrialen Fusionsproteine für die mitochondriale Homöostase von Herzmuskelzellen noch nicht vollständig geklärt. Die spezielle subzelluläre Architektur in Kardiomyozyten gewährleistet bereits eine enge räumliche Nähe zwischen den Mitochondrien und könnte somit molekulare Verknüpfungen als Fusionsinitiatoren überflüssig machen.⁵ Allerdings legen verschiedene Untersuchungen die funktionelle Relevanz der Mitofusine in Kardiomyozyten nahe: Ein Kardiomyozyten-spezifischer Doppel-KO von Mfn1 und Mfn2 ist bereits in der Embryonalperiode (Tag 10,5) letal.²⁰ Der konditionale kombinierte Knockout von Mfn1 und Mfn2 in adulten Mäuseherzen induziert eine rapide-progressive dilatative Kardiomyopathie mit Fragmentierung der Mitochondrien und ansteigenden cytosolischen Ca^{2+} -Transienten.²⁰ Auch in der Fruchtfliege *Drosophila* führte die epigenetische Suppression des Proteins MARF (von engl. mitochondrial assembly regulatory factor), welches das funktionelle Analogon zu Mfn1 und Mfn2 darstellt, zur Ausbildung einer Kardiomyopathie.³⁴

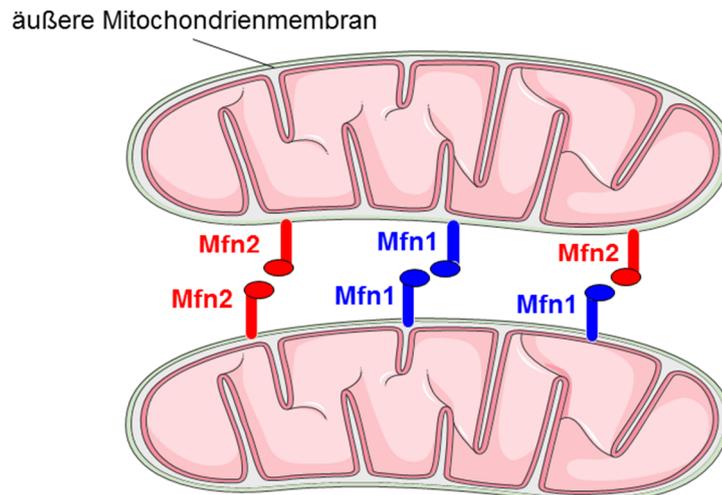


Abb. 2: Die Rolle der Mitofusine Mfn1 und Mfn2 bei der mitochondrialen Fusion

Die Mitofusine 1 (Mfn1) und 2 (Mfn2) sind als Membranproteine der äußeren Mitochondrienmembran über die Ausbildung homotypischer (Mfn1-Mfn1 und Mfn2-Mfn2) sowie heterotypischer (Mfn1-Mfn2) Komplexe an der Initiation mitochondrialer Fusionsprozesse beteiligt.

Die Annahme einer weitgehenden funktionellen Redundanz der Mitofusine in Säugetieren wurde durch Beobachtungen von de Brito und Scorrano²⁹ infrage gestellt. In Studien an Mäusefibroblasten stellten sie fest, dass Mfn2 – im Unterschied zu Mfn1 – zusätzlich in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert ist und so Mitochondrien und ER miteinander verknüpft.²⁹ Diese Verbindung scheint allerdings nicht Fusionszwecken zu dienen, sondern eine enge räumliche Assoziation der beiden Organellen zu bewirken, wodurch die lokale Ca^{2+} -Transmission zwischen ER und Mitochondrienmatrix erleichtert²⁴ und damit die mitochondrialen Ca^{2+} -Signalwege gefördert werden.⁹⁴ Auch in Kardiomyozyten konnte Mfn2 in SR-Membran-Fragmenten aus Kontaktstellen zwischen SR- und Mitochondrienmembran nachgewiesen werden⁴² und stellt damit einen möglichen Kandidaten als Linkerprotein zwischen SR und Mitochondrien dar.

2.1.7 Mitofusin 2 als Linkerprotein zwischen SR und Mitochondrien?

Elektronentomographische Untersuchungen an Ratten-Kardiomyozyten lassen Linkerproteine zwischen Mitochondrien und dem SR erkennen, deren molekulare Identität noch nicht vollständig geklärt ist.^{41, 48} Mfn2 ist nachweislich auch in der Membran des SR von Kardiomyozyten lokalisiert⁴² und kommt daher potenziell als ein solches Linkerprotein in Frage. Im Einklang mit der Vorstellung von Mfn2 als Bindeglied zwischen ER und Mitochondrien in Nicht-Kardiomyozyten stehen

Beobachtungen von de Brito und Scorrano,²⁹ wonach die Ablation oder Suppression von Mfn2 (nicht aber Mfn1) in embryonalen Mäusefibroblasten und HeLa-Zellen den räumlichen Abstand zwischen ER und Mitochondrien vergrößerte, die Ca²⁺-Beladung des ER erhöhte und die mitochondriale Ca²⁺-Aufnahme nach ER-Ca²⁺-Freisetzung (induziert durch Stimulation mit Inositoltriphosphat (IP₃)) verringerte.²⁹ Diese Ergebnisse begründeten die molekularen Komponenten des ursprünglich von Rizzuto und Pozzan vorgestellten Konzeptes der ER-mitochondrialen Ca²⁺-Mikrodomäne.⁹⁴

Im Gegensatz zu nichtkardialen Zellen, in welchen das Konzept der mitochondrialen Ca²⁺-Mikrodomänen bereits gut etabliert ist,⁹⁴ ist deren Existenz und funktionelle Bedeutung in kardialen Myozyten noch unklar.^{21, 33, 71, 82} Garcia-Perez et al. beobachteten, dass sich das jSR bevorzugt an denjenigen Stellen der Mitochondrienoberfläche anlagert, welche Kontaktpunkte zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran aufweisen und dass diese IMM-OMM-Kontaktpunkte vermehrt Mfn2 und VDAC (Ca²⁺-durchlässiger Anionenkanal der OMM) enthalten.⁴² In Zusammenschau mit den Entdeckungen von de Brito und Scorrano²⁹ deuten diese Daten auf eine möglicherweise auch in Kardiomyozyten bestehende Beteiligung von Mfn2 an den Ankerpunkten zwischen SR und Mitochondrien hin.

Diesbezüglich stellt ein Report von Papanicolaou et al. die Anwendbarkeit der von de Brito und Scorrano gewonnenen Erkenntnisse auf Kardiomyozyten in Frage.⁸⁵ Die Herzmuskel-spezifische Ablation von Mfn2 induzierte eine Mitochondrien-Vergrößerung und kardiale Hypertrophie in ansonsten normalen Herzen ohne Auswirkungen auf die Interaktion zwischen Mitochondrien und SR oder den Ca²⁺-Stoffwechsel.⁸⁵ Zwar waren in dieser Publikation die Kardiomyozyten durch die Mfn2-Defizienz vor der mitochondrialen Depolarisation und dem ROS-vermittelten programmierten Zelltod – wie von de Brito und Scorrano vorhergesagt – geschützt, dies ließ sich jedoch nicht auf veränderte SR-mitochondriale Interaktionen, sondern auf den Anstieg der mitochondrialen Ca²⁺-Speicherkapazität und eine Unempfindlichkeit der mPTP zurückführen.⁸⁵ Als Erklärung für die Unterschiede zwischen den Entdeckungen von de Brito und Scorrano in Fibroblasten²⁹ und jenen von Papanicolaou et al. in Mäuseherzen⁸⁵ kommen mehrere Möglichkeiten in Betracht: Erstens, die Verknüpfungen zwischen SR und Mitochondrien werden nicht

von Mfn2, sondern von anderen Linkerproteinen gebildet – wie etwa PACS-2 und/oder IP₃-Rezeptor-VDAC-Komplexen.^{104, 106} Zweitens, Mfn2 verknüpft zwar in Kardiomyozyten SR und Mitochondrien, aber diese physikalische Anbindung hat keine funktionelle Relevanz, entweder weil in Kardiomyozyten die enge räumliche Nachbarschaft der beiden Organellen bereits gegeben ist, oder weil sich die mitochondriale Empfindlichkeit für über RyR freigesetztes SR-Ca²⁺ von jener für über IP₃-Rezeptoren freigesetztes Ca²⁺ unterscheidet.⁷⁸ Schließlich besteht auch die Möglichkeit, dass die durch Mfn2 gebildeten SR-mitochondrialen Verknüpfungen in Kardiomyozyten nur dem von Papanicolaou beschriebenen rein pathologischen Mechanismus dienen, die mitochondriale Sensitivität für die Ca²⁺-induzierte Depolarisierung und den Zelltod zu erhöhen,⁸⁵ ohne die physiologische Ca²⁺-Kommunikation von SR und Mitochondrien zu beeinflussen.¹⁸

Die vorliegende Arbeit wird den möglichen Erklärungen insofern gerecht, als Knockout-Modelle für Mfn1 und Mfn2 verwendet werden, in denen die Mitofusinablation erst postnatal induziert wird. Dadurch wird das Risiko möglicher toxischer Effekte des stark exprimierten Cre-Transgenes, welches Papanicolaou et al. verwenden, umgangen.⁷⁵

2.1.8 Pathophysiologische Veränderungen bei chronischer Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz beschreibt ein Syndrom, welches pathophysiologisch auf der Unfähigkeit des Herzens beruht, Blut – und damit Sauerstoff – in einem bedarfsgerechten Maße zu den Organen zu transportieren. Klinisch liegt eine Herzinsuffizienz vor, wenn dem Symptomenkomplex der Luftnot und schnellen Ermüdbarkeit eine kardiale Erkrankung als Ursache zugrunde liegt (World Health Organization, WHO 1995). Die Herzinsuffizienz ist die am häufigsten gestellte Hauptdiagnose in deutschen Krankenhäusern (~360.000 Fälle pro Jahr bei Erwachsenen; Statistisches Bundesamt, 2011) mit einer Neuerkrankungsrate von 10/1.000 Einwohnern in der Altersklasse über 65 Jahren und einer hohen krankheitsbezogenen Sterblichkeit (52,3% innerhalb von 5 Jahren nach Erstdiagnose).⁶⁵

Im Herzmuskelgewebe kommt es im Rahmen der Herzinsuffizienz über verschiedene Mechanismen zu fortschreitenden myokardialen Umbauprozessen (kardiales

Remodeling). Diese erfüllen zunächst eine adaptive Funktion (kompensierte Herzinsuffizienz durch Hypertrophie), münden schließlich aber in einem zunehmenden Verlust von Kardiomyozyten (Nekrose bzw. Apoptose) sowie einer Fibrosierung des Herzmuskelgewebes mit progredienter Beeinträchtigung der kardialen Pumpfunktion (dekompensierte Herzinsuffizienz).

Auf Kardiomyozytenebene können im Zusammenhang mit der chronischen Herzinsuffizienz (engl. chronic heart failure, CHF) neben strukturellen Anomalien der Mitochondrien – wie beispielsweise einem verminderten Gehalt an Cristae (Auffaltungen der IMM in die Mitochondrienmatrix)⁹⁸ – eine Reihe zellphysiologischer Veränderungen beobachtet werden, bei denen Mitochondrien eine zentrale Rolle zu spielen scheinen. Im Wesentlichen bestehen pathophysiologische Veränderungen der elektromechanischen Kopplung, ein energetisches Defizit, sowie durch mitochondriale Defekte bedingter oxidativer Stress (siehe Abb. 3, rote Pfeile). Das ursprüngliche Konzept des „verhungerten“ („energy starved“) Herzens geht von einer myokardialen Energieverarmung als Ursache für die Entwicklung der chronischen Herzinsuffizienz aus.⁵¹ Autopsien an erkrankten menschlichen Herzen ergaben einen um ca. 25-30% verminderten myokardialen ATP-Gehalt.¹⁰⁵ Es zeigte sich auch ein verminderter Spiegel von Phosphokreatin (PCr) als wichtigem Regulator der intrazellulären ATP-Verfügbarkeit. Der Quotient aus PCr/ATP gilt als umgekehrt proportional zur Prognose der entsprechenden Patienten.⁸⁰ In den letzten Jahren wurde das Konzept des Energiemangels sowohl durch weiterführende experimentelle Untersuchungen des Kreatin/CK-Systems,⁶⁸ als auch klinische Studien mit Betablockern (Metoprolol vs. Carvedilol)^{12, 84} als alleiniges Erklärungsmodell zunehmend in Frage gestellt.⁸¹

Beeinträchtigungen der elektromechanischen Kopplung bei CHF äußern sich insbesondere in der verminderten Amplitude cytosolischer Ca^{2+} -Transienten und scheinen vorwiegend auf einer geringeren Ca^{2+} -Beladung des SR zu beruhen.^{35, 71} Diese ist zum einen durch die reduzierte Aktivität der SERCA, zum anderen durch den stetigen Verlust von SR-Ca^{2+} über Ryanodinrezeptoren im Sinne eines „ Ca^{2+} -Lecks“ zu erklären.^{6, 24} Des Weiteren liegt eine erhöhte intrazelluläre Na^+ -Konzentration $[\text{Na}^+]_i$ vor, welche zusammen mit der gesteigerten Genexpression des sarkolemmalen Na^+ - Ca^{2+} -Austauschers (NCX) zu einer ineffizienteren NCX-assoziierten Ca^{2+} -Elimination in der Diastole führt.⁵¹ Zusätzlich fördert eine erhöhte

[Na⁺]_i; die Umkehr der Ionentransportrichtung des NCX („reverse mode“) und damit den Ca²⁺-Einstrom in der Plateauphase des Aktionspotenzials.² Dieser Ca²⁺-Einstrom scheint den verminderten SR-Ca²⁺-Gehalt teilweise zu kompensieren und eine Aufrechterhaltung der Inotropie zu ermöglichen.¹¹⁷ Allerdings trägt der alternative Ca²⁺-Einstrom, verglichen mit der SR-Ca²⁺-Freisetzung, nicht adäquat zur mitochondrialen Ca²⁺-Aufnahme bei.⁶¹ Infolge des erhöhten cytosolischen Na⁺-Spiegels kommt es zusätzlich zum verstärkten Ca²⁺-Efflux aus Mitochondrien über den NCLX.⁶¹ Diese beiden Bedingungen erschweren die mitochondriale Ca²⁺-Akkumulation unter β -adrenerger Stimulation, sodass durch mangelnde Ca²⁺-assoziierte Aktivierung des Krebszyklus die bioenergetische Adaptation defizitär bleibt und vermehrt mitochondriales H₂O₂ entsteht.^{60, 64, 69} Ein in den letzten Jahren etabliertes Konzept zeigt, dass aufgrund des engen Zusammenspiels zwischen elektromechanischer Kopplung, mitochondrialem Redoxstatus und der Regulation der ROS-Produktion Defekte der elektromechanischen Kopplung eine kausale Rolle für die Entwicklung des energetischen Defizits sowie oxidativen Stresses bei Herzinsuffizienz spielen.⁶³

Oxidativer Stress ist nachweislich am Progress kardialer Remodelingprozesse und der Entwicklung der chronischen Herzinsuffizienz beteiligt⁷⁹ und bei Patienten mit CHF korreliert oxidativer Stress mit der Einschränkung der systolischen LV-Funktion.^{70, 72} Allerdings erbrachten klinische Studien mit antioxidativen Behandlungsansätzen bisher keine vielversprechenden Ergebnisse.^{66, 97, 118} Möglicherweise können der ROS-Produktion in Kardiomyozyten, je nach Entstehungsort, -zeitpunkt und -menge, sowohl adaptive als auch maladaptive Effekte zugeschrieben werden.⁸¹ Nach dem Konzept der „Mitohormesis“⁹¹ im Rahmen von Alterungsprozessen führt die Freisetzung kleinerer ROS-Mengen beispielsweise über adaptive Mechanismen zu längerer Lebensdauer.⁹¹ Auch bei Ischämie/Reperfusionsexperimenten kann für die akute Angiotensin-II-induzierte ROS-Produktion durch Nox2 ein protektiver Effekt (Mechanismus der ischämischen Präkonditionierung) nachgewiesen werden,^{58, 114} während die chronische ROS-Belastung aus dieser Quelle (Nox2) zu maladaptivem Remodeling führt.²⁸

Alle beschriebenen pathophysiologischen Mechanismen der CHF sind in komplexer Art und Weise ineinander verzahnt. Die Aufklärung der kausalen Zusammenhänge birgt Herausforderungen und bedarf weiterer Untersuchungen.

2.2 Ziel der Arbeit / Fragestellung

Aufgrund des engen Zusammenspiels zwischen Prozessen der elektromechanischen Kopplung, dem Redoxstatus sowie der ROS-Produktion in Mitochondrien, können Defekte der elektromechanischen Kopplung zur Entwicklung eines Energiedefizits sowie zu oxidativem Stress führen. Mitochondriales Ca^{2+} ist als Signalmolekül essentiell für einen ökonomisch abgestimmten zellulären Energiehaushalt, welcher insbesondere im Herzmuskel aufgrund rascher Arbeitslast-Änderungen gewahrt werden muss. Das Konzept einer mitochondrialen Ca^{2+} -Mikrodomäne, welche die Ca^{2+} -Transmission zwischen ER und Mitochondrien optimiert, ist für nichtkardiale Zellen bereits etabliert.⁹⁴ Auch konnte für Mfn2 (nicht jedoch für Mfn1) über die Verknüpfung der Membranen von ER und Mitochondrien in verschiedenen Zellmodellen eine strukturelle Beteiligung an dieser Mikrodomäne nachgewiesen werden.²⁹

Mfn2 könnte folglich auch in Kardiomyozyten ein Linkerprotein darstellen, das die räumliche Interaktion von Mitochondrien mit dem SR reguliert und dadurch an der Ca^{2+} -Mikrodomäne beteiligt ist, welche von wesentlicher Bedeutung für die effiziente Ca^{2+} -Transmission zwischen SR und Mitochondrien ist. Damit wäre Mfn2 eine funktionell bedeutende Rolle für die erfolgreiche bioenergetische Adaptation (Anpassung der mitochondrialen Energieproduktion an wechselnde Arbeitslasten) und die Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies zur Vermeidung von oxidativem Stress zuzuschreiben (Abb. 3). Der Kardiomyozyten-spezifische KO von Mfn2 führt im Mausmodell zur Entwicklung einer chronischen Herzinsuffizienz.¹⁸ Eine mögliche Ursache könnte die Beeinträchtigung der Ca^{2+} -Transmission zwischen SR und Mitochondrien sein.

In der vorliegenden Arbeit soll in diesem Zusammenhang die Hypothese überprüft werden, dass in Kardiomyozyten der Verlust von Mfn2, nicht aber von Mfn1, über eine Beeinträchtigung der Ca^{2+} -Transmission zwischen SR und Mitochondrien und eine nachfolgend verminderte Ca^{2+} -assoziierte Stimulation des Citratzyklus Auswirkungen auf die energetische Adaptation sowie die Entgiftungskapazität von Sauerstoffradikalen hat. Um die spezifische Bedeutung von Mfn1 und Mfn2, insbesondere hinsichtlich ihres Einflusses auf den mitochondrialen Ca^{2+} -Stoffwechsel, zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit Mäuse mit selektivem

Im Konkreten gilt es folgende Fragen zu klären:

1. Welche Rolle spielt Mfn2 für die SR-mitochondriale Ca^{2+} -Transmission?
2. Welche Rolle spielt Mfn2 für die bioenergetische Adaptation?
3. Welche Rolle spielt Mfn2 für die Elimination reaktiver Sauerstoffspezies?

3. Material

3.1 Verwendete Substanzen

3.1.1 Substanzen zur Herstellung der Puffer- und Spüllösungen

Substanz	MG	Hersteller	
Natriumchlorid, NaCl	58	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	
Fetal Calf Serum, FCS (Bovines Serum)		Invitrogen, Karlsruhe	
Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4	136	Merck, Darmstadt	
Dinatriumdihydrogenphosphat, Na_2HPO_4	120		
Liberase Blendzyme 1		Roche Diagnostics, Indianapolis, USA	
2,3-Butandion-Monoxim (BDM)	101	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	
Salzsäure, HCl	36		
D-(+)-Glukose, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	180		
Hepes Natriumsalz, $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_2\text{NaO}_4\text{S}$	238		
Kaliumchlorid, KCl	75		
Kaliumhydrogencarbonat, KHCO_3	100		
Kalziumchlorid, CaCl_2	110		
Magnesiumsulfatheptahydrat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246		
Natriumhydroxid, NaOH	40		
Phenolrot	354		
Taurin, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$	125		
Trypsin			
Natriumhydrogencarbonat, NaHCO_3	84		VWR, Leuven

3.1.2 Farbstoffe und Lösungsmittel

Farbstoff / Lösungsmittel	MG	Hersteller
Indo-1 AM	1010	Invitrogen, Karlsruhe
MitoSOX	760	
Pluronic F-127, P3000MP	20% w/V	
TMRM	501	
Dimethylsulfoxid, DMSO, C ₂ H ₆ OS	78	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

3.1.3 Sonstige verwendete Substanzen

Substanz	Hersteller
Heparin-Natrium 5000 I.E./ml Softasept N Hautdesinfektionsmittel	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Isofluran	
FCS Hepes-Pufferlösung, 1 M Medium 199 Penicillin G (10.000 Units) / Streptomycinsulfat	Invitrogen, Karlsruhe
Rimadyl Injektionslösung, 50 mg Carprofen und 10 mg Benzylalkohol pro 1 ml	
Laminin	
Antimycin A FCCP, Carbonyl Cyanid 4-(trifluoromethoxy)- phenylhydrazon Isoprenalin Natriumcyanid, NaCN	
	Pfizer GmbH, Karlsruhe
	Roche Diagnostics, Indianapolis, USA
	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

3.2 Geräte und Material

3.2.1 Setup zur Kontraktilitäts- und Fluoreszenzmessung

Produkt	Hersteller / Bezugsquelle
Acquisition Computer (inkl. Monitor)	Dell GmbH, Frankfurt am Main
CFA Option D: Dual Emission option for CFA300	IonOptix, Milton, MA, USA
CFA300 Cell framing adapter	
FSI700 Fluorescence system interface	
MCS100 Myo-Cam-S Digital Variable field rate CCD	
MUS200 μ 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)	
Mikroskop Nikon Ti-S/L100	Nikon GmbH, Düsseldorf
Xenon short arc lamp -75XE (75 W)	Ushio Inc., Tokyo
Constant Current / Voltage Isolated Stimulators (DS2A / DS3)	Warner Instruments
SIU-102 Stimulus Isolation Unit	
Filter und Spiegel	Chroma Technology GmbH, Fürstfeldbruck

Die verwendeten Filter und Spiegel werden mit ihrer Bezeichnung sowie ihren Reflexions- und Transmissionseigenschaften in Kapitel 4.4 an entsprechender Stelle aufgeführt.

3.2.2 Sonstige Geräte und Instrumentarium

Produkt	Hersteller / Bezugsquelle
Pinzette zum Kanülieren, FD281R	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Feinschere 14088-10 Pinzette zur Thorakotomie, 11272-30	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Isoflurannarkose-System: - Vaporizer Key Fill Isoflurane - Fluovac Gas Evacuation System - Oxygen Flowmeter - Keyfill Adapter - Tube Adapter to Fluosorber Langendorff-Perfusionsanlage	Hugo Sachs Elektronik - Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten
Magnetrührer CAT 6.1	Ingenieurbüro CAT, M. Zipperer GmbH, Staufen
Feinwaage, ABS 120-4	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Vortex Mixer SN41119030	Labnet International, NJ, USA
Lauda Ecoline Staredition Wärmethermostat mit Edelstahlbad und Variopumpe	Lauda Dr. R. Wobser, Lauda- Königshofen
Gefrierschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
Binokular, SMZ645	Nikon, Düsseldorf
Vakuumpumpe SP302SA	Schwarzer Precision, Essen
Wärmeschrank Heraeus Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0 R	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe
Schere 233-2121 pH-Meter, Eutech Instruments, pH 510 Zentrifuge Galaxy 16DH	VWR, Darmstadt
pH-Elektrode SenTix 22	WTW, Weilheim

3.2.3 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller / Bezugsquelle
Discofix C Dreiwegehahn Exadrop Tropfenregler mit Infusionsgerät Isotone Kochsalzlösung 0,9 % Original Perfusor Spritze 50 ml Wasser, vollentsalzt und destilliert (Aqua dest.)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Falcon, Blue Max, 15 ml und 50 ml Polypropylene Conial Tube Nadel BSS Microlance 3 Spritze 1 ml BD Plastipak	Becton Dickinson, N.J., USA
Immersionsöl	Cargille Laboratories Inc., Cedar Grove, N.J., USA
Ethicon Mersilene Polyesterfaden 5-0	Johnson-Johnson, Neuss
MoleNea plus L, Unterlagen	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Sauerstoff	Praxair, Düsseldorf
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl SafeSeal Reagiergefäße, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Zellkulturschalen Ø100x20 mm und Ø60x15 mm	TPP, Trasadingen, Schweiz
Deckgläschen	VWR International, Darmstadt

3.2.4 Computersoftware

Zur Erstellung dieser Arbeit wurden die Programme IonWizard 6.0 (IonOptix, Milton, MA, USA), MS Office 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) und GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, CA, USA) verwendet.

4. Methoden

4.1 Tiermodelle

Die Tierhaltung sowie alle Tierversuche wurden in Abstimmung mit der Tierschutzbeauftragten der Universität des Saarlandes, Frau Dr. med. vet. Monika Frings, gemäß den Vorgaben des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt (Genehmigung zur Tiertötung lag vor). Die Versuchstiere wurden freundlicherweise von Gerald Dorn (Washington University in St. Louis, School of Medicine, St. Louis, USA) bereitgestellt. Es wurden Mäuse mit Kardiomyozyten-spezifischer Deletion (engl. knockout, KO) von entweder Mfn1 („Mfn1-/-“) oder Mfn2 („Mfn2-/-“) sowie die jeweiligen Geschwistertiere (engl. littermates; „ctrl“) eingesetzt. Der Kardiomyozyten-spezifische selektive KO von Mitofusin 1 oder 2 entstand durch Verkreuzen der globalen KO-Mäuse (Mfn1- und Mfn2-floxed-Allele)¹⁷ mit einer Cre-Mauslinie, die ein Myosin heavy chain 6 (Myh6)-gerichtetes („Turbo“) Cre-Transgen trug.¹¹³ In den transgenen Tieren induzierte dies eine erst in der frühen postnatalen Periode beginnende selektive Genrekombination in den Kardiomyozyten.¹⁸

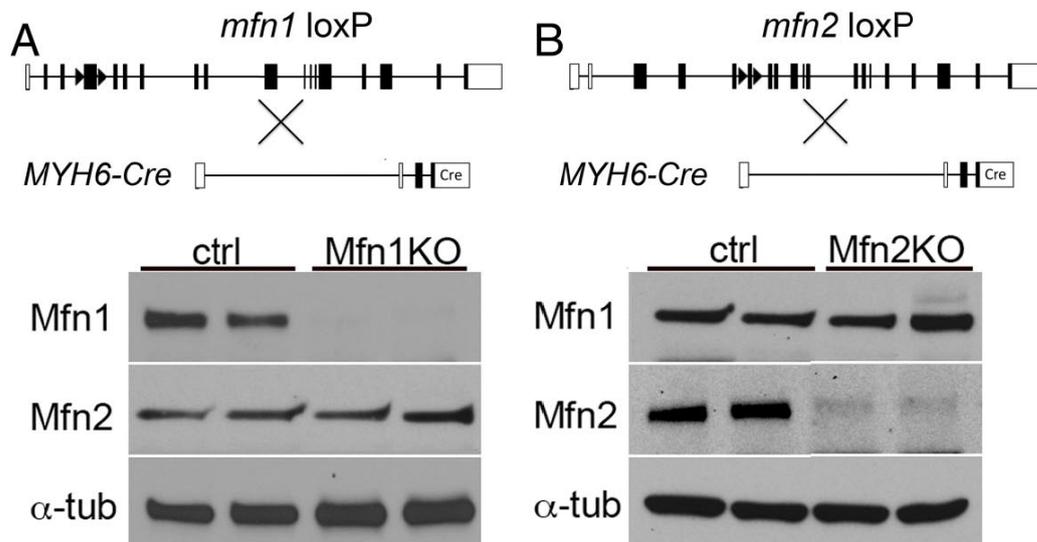


Abb. 4: Postnatale Kardiomyozyten-spezifische Ablation von Mfn1 bzw. Mfn2

Schematische Darstellung der Cre-Lox Strategie zur Kardiomyozyten-spezifischen Deletion von Mfn1 Exon 4 (A oben) bzw. Mfn2 Exon 6 (B oben) mittels eines Myh6-gerichteten Zellkern-lokalisierten Cre-Transgens und entsprechende repräsentative Immunoblot-Analysen der kardialen Mfn1- und Mfn2-Expression in Mfn1-KO- (A unten) und Mfn2-KO-Herzen (B unten), wobei jede Spalte eine einzelne Herzpräparation darstellt und α-Tubulin (α-tub) als Kontrollbande dient.

Chen et al. (2012)

4.2 Isolation adulter Kardiomyozyten der Maus

Die für die Messreihen verwendeten Kardiomyozyten wurden aus 6-8 Wochen alten KO-Mäusen und den jeweiligen Geschwistertieren gewonnen. Die Durchführung der Organentnahme sowie die enzymatische Isolation der Kardiomyozyten erfolgten bis auf wenige Anpassungen gemäß den Empfehlungen der AfCS (Alliance for Cellular Signaling) unter Verwendung einer modifizierten Langendorff-Perfusionsanlage (Abb. 5) und dienten der Herstellung einer Primärkultur. Die Zusammensetzung der zur Myozytenisolation benötigten Lösungen und Puffer findet sich in Tabelle 1.

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
Perfusions-Puffer (250 ml, dH ₂ O)	NaCl 113 mM KCl 4,7 mM KH ₂ PO ₄ 0,6 mM Na ₂ HPO ₄ 0,6 mM MgSO ₄ ·7H ₂ O 1,2 mM Phenolrot 0,032 mM NaHCO ₃ 12 mM KHCO ₃ 10 mM Hepes Pufferlösung 10 mM Glucose 5,5 mM BDM 10 mM Taurin 30 mM
Liberase-Puffer (20 ml)	20 ml Perfusions-Puffer 2 mg Liberase (0,07 mg/ml) 40µl Trypsin (0,14 mg/ml) 25,2 µl 10 mM CaCl ₂ (12,5 µM)
Stopp-Puffer 1 (10 ml)	9 ml Perfusions-Puffer 1 ml (10%) FCS 12,5 µl 10 mM CaCl ₂ (12,5 µM)
Stopp-Puffer 2 (30 ml)	28,5 ml Perfusions-Puffer 1,5 ml (5%) FCS 37,5 µl 10 mM CaCl ₂ (12,5 µM)

Tabelle 1: Zusammensetzung der zur Myozytenisolation verwendeten Puffer und Lösungen

Der Maus wurden im Vorfeld 0,5 ml Heparin (1:10 verdünnt) sowie 0,1 ml des Analgetikums Rimadyl (1:15 verdünnt) intraperitoneal appliziert. Nach Ablauf von etwa 10 min erfolgte die Betäubung des Tieres mittels einer Inhalationsnarkose mit Isofluran (Fluss 0,5 ml/min mit 5% Isofluran) und 100% O₂ (0,5 l/min). Nach Erreichen einer suffizienten Narkostiefe (Zwischenzehenreflex erloschen) wurde eine Laparo-Thorakotomie durchgeführt und das Herz unter Erhalt der herznahen Gefäße explantiert. Etwaige angelagerte Organreste von Lunge, Fettgewebe o.ä. wurden entfernt, die Aorta freipräpariert und das Herz in eine mit Perfusionspuffer gefüllte Petrischale transferiert. Nach Kanülierung des Herzens über die Aorta und Fixierung der Kanüle mittels eines chirurgischen 5-0 Polyesterfadens knapp oberhalb der Koronarienabgänge wurde das Herz in die vorbereitete Langendorff-Perfusionsanlage (siehe Abb. 5) eingebracht.

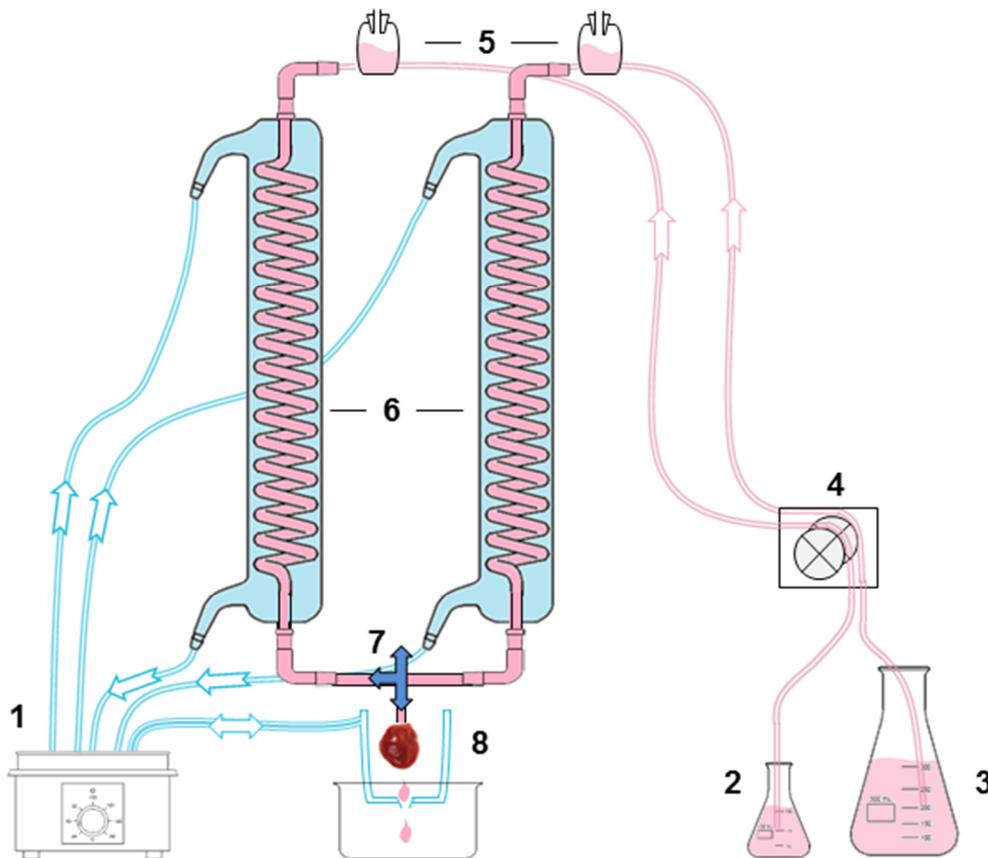


Abb. 5: Modifizierte Langendorff-Perfusionsanlage zur enzymatischen Myozytenisolation

- 1 Zirkulierendes Wasserbad (37 °C)
- 2 Reservoir für Liberasepuffer und
- 3 Perfusionspuffer
- 4 Peristaltische Pumpe
- 5 Blasenfallen
- 6 Wasser-ummantelte Wärmeaustausch-Spiralen
- 7 Dreiwegehahn
- 8 Kanüliertes, retrograd perfundiertes Mäuseherz in Wärmekammer

Über die Langendorff-Perfusionsanlage wurde das Herz retrograd über die Aorta zunächst für 4 min mit auf 37 °C temperierter Perfusionslösung gespült (konstante Flussgeschwindigkeit 2 ml/min), um Blutreste zu entfernen. Anschließend erfolgte die Perfusion mit Liberasepuffer für ca. 6-7 min (37 °C, 2 ml/min) bis zum Erreichen des gewünschten Verdauungsergebnisses. Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit erfolgte die visuelle (angeschwollenes Herz, Blässe des Gewebes) sowie vorsichtige manuelle (verminderte Gewebekonsistenz) Überprüfung der Enzymwirkung. Das Herz wurde unterhalb der Vorhöfe mit einer Schere abgesetzt und zügig in eine Petrischale mit Perfusionspuffer überführt. Mittels vier Einschnitten wurde das Organgewebe aufgefächert, in eine weitere Petrischale mit genau 5 ml Perfusionslösung transferiert und 5 ml Stopp-Puffer 1 zugesetzt, um ein Fortschreiten des enzymatischen Verdaus zu verhindern. Nach 5 min vorsichtigen Schwenkens des Gewebes zum Lösen der Kardiomyozyten aus dem Zellverband wurden die Reste des Herzens verworfen, die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon (Falcon 1) überführt und für 8 min bei Raumtemperatur sedimentiert. Anhand eines Tropfens der Zellsuspension konnten die Zellausbeute und -qualität lichtmikroskopisch begutachtet werden. Nach der Sedimentation wurde der Überstand in ein separates 15 ml-Falcon (Falcon 2) pipettiert und für 1 min bei 800 U/min zentrifugiert. Das Pellet aus Falcon 1 wurde in 5 ml Stopp-Puffer 2 resuspendiert. Der Überstand aus Falcon 2 wurde verworfen und dem Pellet ebenfalls 5 ml Stopp-Puffer 2 zur Resuspension zugesetzt. Nach Zusammenführen der Zellsuspensionen aus Falcon 1 und 2 in eine Petrischale erfolgte der Ca²⁺-Aufbau. Hierzu wurde die Ca²⁺-Konzentration der Suspension alle 4 min durch Zugabe von CaCl₂-Lösung gesteigert:

t = 0 min: +50 µl 10 mM CaCl₂

t = 4 min: +50 µl 10 mM CaCl₂

t = 8 min: +100 µl 10 mM CaCl₂

t = 12 min: +30 µl 100 mM CaCl₂

t = 16 min: +50 µl 100 mM CaCl₂

Im Anschluss wurde die Suspension erneut in ein 15 ml Falcon (Falcon 3) überführt und bei 37 °C für 8 min sedimentiert. Der Überstand wurde in ein 2. Falcon (Falcon 4) pipettiert, für 1 min bei 800 U/min zentrifugiert, der entstehende Überstand verworfen und das Pellet zusammen mit dem Pellet aus Falcon 3 in Zellmedium eingebracht.

4.3 Zellkultur

Zellmedium: Medium 199 mit 5% fetales Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin Streptomycin (PS) + 1% HEPES (kurz vor Verwendung hinzugefügt)

Die isolierten Kardiomyozyten wurden unter sterilen Bedingungen in 25 ml des auf 37 °C vorgewärmten Nährmediums eingebracht und in einer Petrischale als Primärkultur im Brutschrank (37 °C, Luftfeuchtigkeit 95%) aufbewahrt. Die Verwendung der Zellen für die Messreihen erfolgte ausschließlich am Entnahmetag. Vor der Inkubation mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoSOX (siehe 4.4.8) wurden die Kardiomyozyten zunächst für eine Ruhezeit von 20 min im Brutschrank belassen.

4.4 Elektrische Feldstimulation und Epifluoreszenzmikroskopie

4.4.1 Das IonOptix-System®

Als Messapparatur diente ein IonOptix®-System (IonOptix, Milton, MA, USA; www.ionoptix.com), welches es ermöglicht, an intakten Kardiomyozyten über die Aufzeichnung der Sarkomerlänge (digitale Zellengeometrie) Parameter der Zellverkürzung in Echtzeit zu erheben sowie simultan Fluoreszenzmessungen (Epifluoreszenzmikroskopie) durchzuführen. Die Messungen wurden unter Ausschluss von Tageslicht (Rotlicht als Arbeitsbeleuchtung) sowie mit zusätzlicher Verdunklung des Mikroskops durchgeführt, um Störungen der Fluoreszenzsignale zu vermeiden. Die einzelnen Komponenten der Messanlage sowie der schematische Aufbau des Messplatzes sind Abb. 6 zu entnehmen. Die Gerätebezeichnungen und -hersteller sind in 3.2.1 aufgelistet.

Native oder mit Fluoreszenzfarbstoff beladene isolierte Kardiomyozyten wurden in die Zellkammer des Mikroskops eingebracht, wo sie kontinuierlich mit erwärmten Lösungen umspült und einem elektrischen Feld mit variablen Stimulationsfrequenzen ausgesetzt wurden. Mittels einer Xenonlampe mit nachgeschaltetem Filter wurde die gewünschte Exzitationswellenlänge λ_{exc} zur Erregung des verwendeten Fluoreszenzindikators erzeugt und dem Mikroskop zugeleitet. Nach Auftreffen des Lichtes auf die Objektkammer kam es durch den Indikator in den Myozyten zur Emission eines (Auto-) Fluoreszenzsignals mit der Emissionswellenlänge λ_{em} . Das emittierte Licht wurde mittels verschiedener Filter aufbereitet und über Spiegel zu einer Photomultiplier-Röhre (PMT) weitergeleitet, wo das Fluoreszenzsignal verstärkt und in ein Stromsignal umgewandelt wurde. Dieser Strom konnte über das zwischengeschaltete „Fluorescence System Interface“ vom Computer erfasst und mit Hilfe der IonOptix-Software „IonWizard 6.0“ graphisch dargestellt und analysiert werden.

Das mittels einer zweiten Lichtquelle in Durchlichtmikroskopie erzeugte Bild der fokussierten Kardiomyozyte wurde einer speziellen Kamera (Myocam-S) zugeleitet und auf der Benutzeroberfläche des Programms IonWizard angezeigt. Über digitale Zellengeometrie erfolgten die kontinuierliche Messung sowie die graphische Darstellung der Sarkomerlänge der Kardiomyozyte im Zeitverlauf.

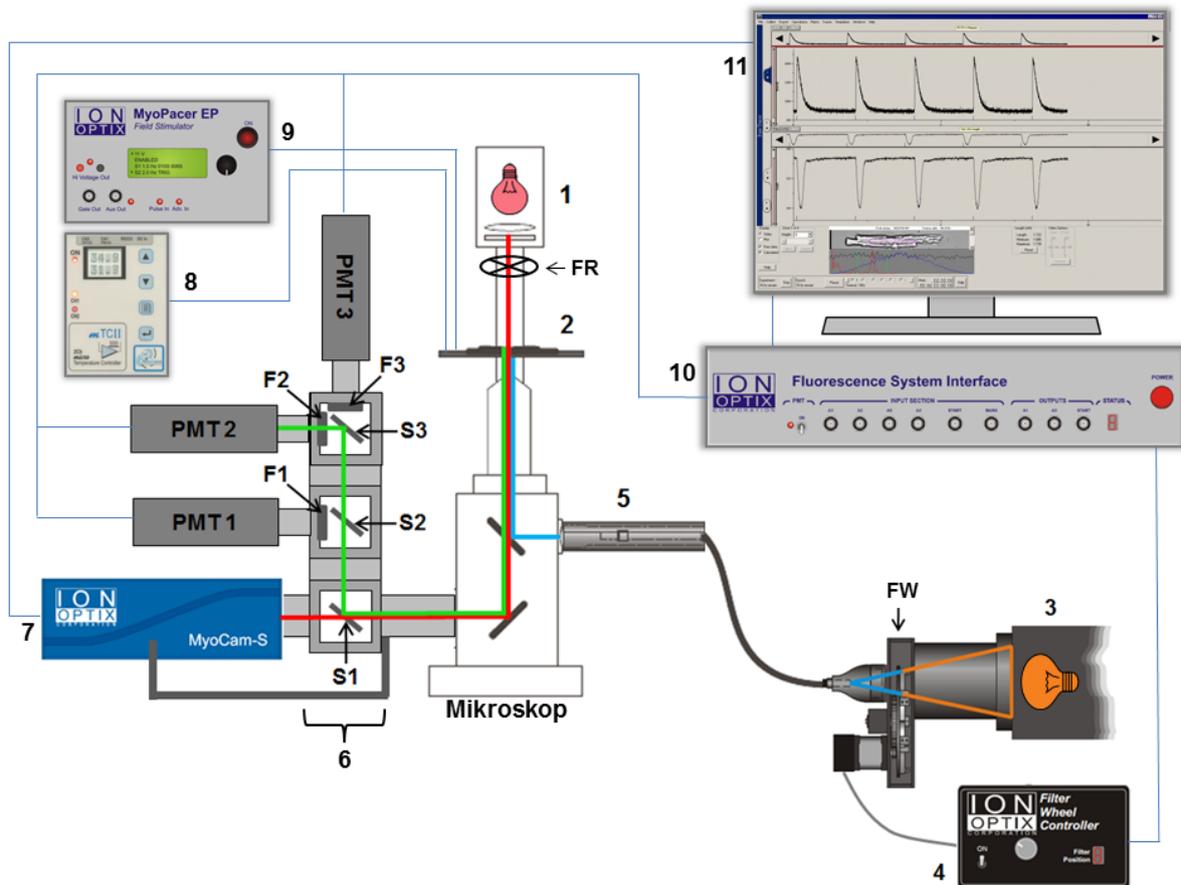


Abb. 6: Das Setup zur Fluoreszenz- und Kontraktilitätsmessung

Inverses Mikroskop (Nikon Ti-S/L100) mit Filterrad (FR) zur Phasenkontrastierung

- 1 Lichtquelle zur Durchlicht-Mikroskopie (roter Strahlengang)
- 2 Mikroskop-Tisch mit Objekt (Zellkammer)
- 3 Lichtquelle (Xenon Short Arc Lamp -75XE mit IonOptix μ Step) mit Filterwechsler (FW) zur Erzeugung des Exzitationslichtes (blauer Strahlengang)
- 4 Filter Controller
- 5 Lichtleitereinkoppler am Mikroskop-Gehäuse
- 6 Säule aus 3 Cell Framing Adaptern (CFA) mit Spiegeln (S1-3) und Filtern (F1-3) zur Modifizierung des Emissionslichtes (grüner Strahlengang) sowie 3 Photomultiplier-Röhren (PMT 1-3) zur Detektion des Fluoreszenzsignals
- 7 Kamera (MyoCam-S) zur Detektion der Sarkomerlänge
- 8 Temperatur-Kontrolleinheit zur Beheizung der Zellkammer
- 9 Zell-Stimulator (MyoPacer Cell Stimulator) zur elektrischen Feldstimulation
- 10 Fluorescence System Interface
- 11 Computer mit Aquisitions-Software (IonWizard 6.0)

Dünne blaue Verbindungslinien stellen die wichtigsten Anschlüsse zwischen den Komponenten dar. (Abb. modifiziert nach www.ionoptix.com)

4.4.2 Vorbereitungen

Die Messungen wurden an intakten ventrikulären Kardiomyozyten durchgeführt, welche am Tag der jeweiligen Messungen frisch isoliert (wie in 4.2 beschrieben) und in Primärkultur gehalten wurden (siehe 4.3). Die Zusammensetzung der für die Messungen verwendeten Lösungen ist Tabelle 2 zu entnehmen.

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
NT-Lösung	NaCl 130 mM KCl 5 mM MgCl ₂ 1 mM Na-HEPES 10 mM Na-Pyruvat 2 mM Ascorbinsäure 0,3 mM Glucose 10 mM Ausgleich auf pH 7,5 bei RT + CaCl ₂ 1 mM
NT'-Lösung (ohne antioxidative Substanzen)	NaCl 130 mM KCl 5 mM MgCl ₂ 1 mM Na-HEPES 10 mM Glucose 10 mM Ausgleich auf pH 7,5 bei RT + CaCl ₂ 1 mM
Isoprenalin	Isoprenalin 30 nM in NT bzw. NT'
FCCP	FCCP 5 µM in NT
Cyanid	HCN 4 mM in NT
FCCP + Oligomycin	FCCP 5 µM + Oligomycin 1,26 µM in NT
Antimycin A	Antimycin A (gelöst in Ethanol) 150 µM in NT'

Tabelle 2: Zusammensetzung der zur Kontraktilitäts- und Fluoreszenzmessung verwendeten Lösungen

Der pH-Wert der Normaltyrode-Lösungen (NT und NT') wurde vor der Zugabe des CaCl_2 auf pH 7,5 bei Raumtemperatur (RT) eingestellt. Hierzu erfolgte unter Verwendung eines pH-Meters die Titration mit entweder HCl (1 M) oder NaOH (1 M). Zur Messung der Fluoreszenzsignale von NAD(P)H, FAD, Indo-1 und TMRM wurde die Standard NT-Lösung (NT) verwendet. Für die MitoSOX-Messungen wurde eine NT'-Lösung ohne die antioxidativ wirkenden Substanzen Na-Pyruvat und Ascorbinsäure angesetzt.

Unter sterilen Bedingungen wurde der Zellkultur jeweils 1 ml Zellsuspension (isolierte murine Kardiomyozyten in Nährmedium) entnommen, für 3 min sedimentiert, der Überstand durch vorgewärmte Normal-Tyrode-Lösung ersetzt und resuspendiert. Je nach Messprotokoll wurden die Zellen anschließend entweder mit dem entsprechenden Farbstoff inkubiert (siehe 4.4.5, 4.4.7 und 4.4.8) oder nativ verwendet (siehe 4.4.4 und 4.4.6).

Zur Fixierung der Zellen in der Zellkammer wurden die Objektträger zunächst mittig dünn mit Laminin (Konzentration 0,5 mg/ml) beschichtet und nach einer Wartezeit von 5 min ein Tropfen der Zellsuspension (je nach Messung native oder zuvor mit Farbstoff beladene Zellen) aufgebracht. Nach weiteren 5 min Ruhezeit zum Anheften der Myozyten wurde der Objektträger in die Zellkammer eingebracht und diese auf dem Objektisch des Epifluoreszenz-Mikroskops eingespannt, wo sie mit erwärmter ($37\text{ }^\circ\text{C}$) Ca^{2+} -haltiger (2 mM) NT-Lösung gespült wurde. Zum Einspülen der Lösungen diente eine Apparatur, bei der die vorbereiteten Lösungen in separate Gefäße eingefüllt und der Zellkammer mittels eines Dreivegehahns zum gewünschten Zeitpunkt zugeführt werden konnten. Ein Regelventil zur Einstellung der Flussgeschwindigkeit der Spüllösung sowie ein Absaugsystem (Vakuumpumpe mit Auffangreservoir) an der Zellkammer gewährleisteten einen gleichmäßigen Flüssigkeitsspiegel im Verlauf der Messung.

Als Messobjekt für die Erfassung von Sarkomerlänge und Fluoreszenz diente jeweils nur eine einzelne Kardiomyozyte. Hierzu wurde eine zur Messung geeignete Zelle im Fokus des Mikroskops eingestellt. Sie musste stabförmig und von ausreichender Größe sein, mit deutlich erkennbarer Querstreifung, und durfte keine sichtbaren Membranschäden oder Spontankontraktionen aufweisen. Durch die Verwendung von Blenden wurden benachbart liegende Kardiomyozyten von der Messung ausgeschlossen.

4.4.3 Messprotokolle

Die Messungen wurden nach einem zuvor etablierten Protokoll durchgeführt, welchem – je nach verwendetem Fluoreszenzindikator – eine Kalibrierungsphase angeschlossen wurde.

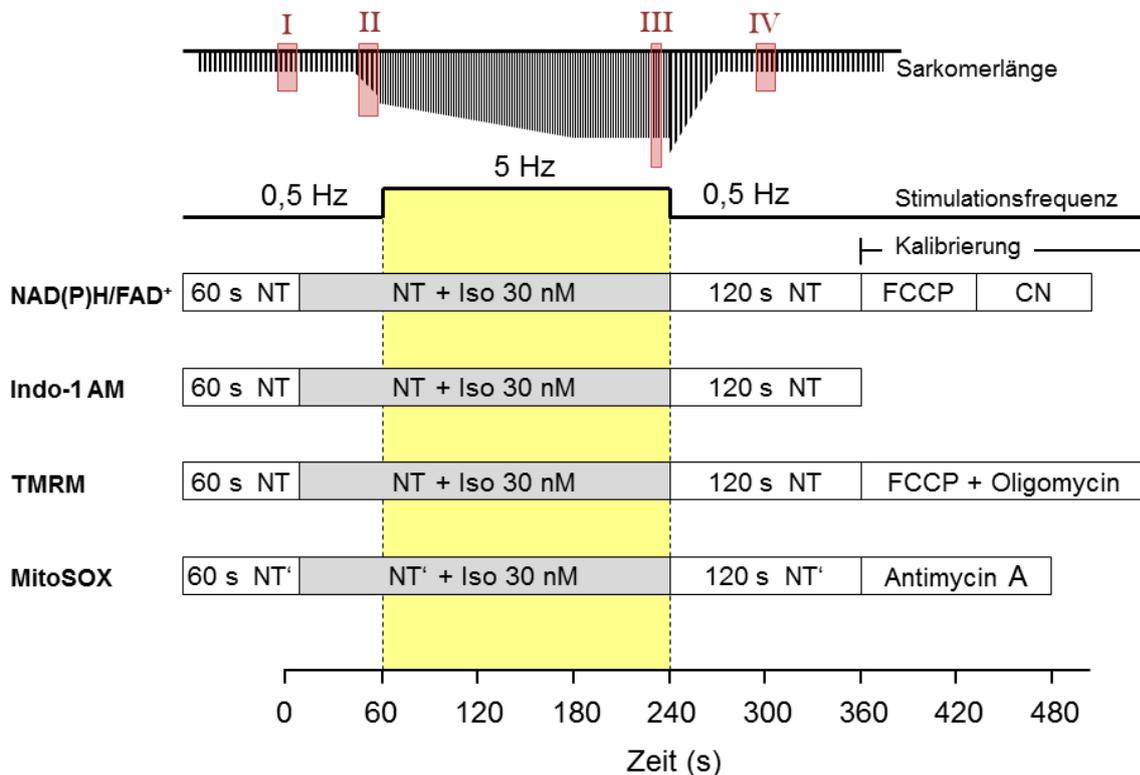


Abb. 7: Messprotokolle zur Kontraktilitäts- und Fluoreszenzmessung

Adulte ventrikuläre Kardiomyozyten der Maus (nativ oder Farbstoff-inkubiert) wurden einem „Stressprotokoll“ unterzogen, indem man sie unter elektrischer Feldstimulation mit 0,5 Hz dem β -adrenergen Agonisten Isoprenalin (30 nM) aussetzte und die Stimulationsfrequenz für 3 min auf 5 Hz erhöhte. Zu den Protokollen sind die Stimulationsfrequenz sowie die jeweils in die Zellkammer einzuspülenden Lösungen angegeben.

Im oberen Teil ist die Sarkomerlänge im Verlauf des Protokolls schematisch dargestellt, wobei I-IV die Zeitpunkte markieren, zu denen die Auswertung repräsentativer Kontraktions- und $[Ca^{2+}]_c$ -Transienten erfolgte. Die untere Zeitachse synchronisiert die Experimente anhand der 5 Hz-Phase zur Vergleichbarkeit bei der Auswertung.

Im elektrischen Feld wurden die Kardiomyozyten in der beheizten Zellkammer mit NT-Lösung umspült und mit bipolaren Impulsen (Einzelimpulsdauer 5 ms) zunächst für 60 s mit einer Frequenz von 0,5 Hz stimuliert. Um einen physiologischen Anstieg der Arbeitslast zu simulieren, wurde über die Spüllösung der β -adrenerge Agonist Isoprenalin appliziert (30 nM). Die β -adrenerge Wirkung von Isoprenalin erhöht die Herzfrequenz in gleichem Maße wie körperliche Betätigung *in vivo*, sodass sich

Isoprenalin dazu eignet, eine möglichst physiologische Stresssituation hervorzurufen.⁵⁵ Unmittelbar nachdem es zum sichtbaren Eintritt der Isoprenalinwirkung an den ventrikulären Kardiomyozyten im Sinne eines Anstiegs der Kontraktionsamplitude kam (erkennbar anhand der Echtzeit-Visualisierung der Sarkomerlänge durch die IonOptix-Software), wurde die Stimulationsfrequenz unter weiterem Zulauf von Isoprenalin-Lösung für 180 s auf 5 Hz erhöht. Auf diese Weise wurde ein Anstieg der Herzfrequenz simuliert, welcher *in vivo* nach β -adrenerger Stimulation auf die Zunahme der Depolarisationsrate von Sinusknoten-Kardiomyozyten zurückzuführen ist.

Am Ende des Protokolls wurde Isoprenalin mit NT-Lösung aus der Kammer ausgewaschen und für weitere 120 s eine Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz verwendet. Je nach Messparameter und verwendetem Farbstoff erfolgte im Anschluss die Kalibrierung des Messsignals durch Zugabe weiterer Substanzen über das Einspülsystem (siehe Abb. 7 sowie entsprechende Kapitel in 4.4).

4.4.4 Kontraktilitätsmessungen

Zur Messung der Kardiomyozyten-Kontraktilität kann die Zellverkürzung im Vergleich zur Ausgangslänge herangezogen werden. Im Verlauf des Messprotokolls wurden mit Hilfe des IonOptix-Systems die Kontraktionen einer einzelnen fokussierten Kardiomyozyte in Echtzeit mit einer Frequenz von 240 Hz digital visualisiert und dokumentiert. Hierdurch konnten kontinuierlich die Sarkomerlänge (sarcomere length) aufgezeichnet sowie mittels Transientenanalyse folgende Parameter erhoben werden: Grundlinie (baseline, BL), Scheitelpunkt (peak), Zeit bis zum Maximum (time to peak, TTP), Relaxationszeit bis 50% der Baseline (RT 50%) und bis 90% der Baseline (RT 90%). Als Maß für die Zellkontraktilität wurde die fraktionelle Sarkomerverkürzung (fractional sarcomere shortening, FS) bestimmt, welche die Verkürzung der Sarkomerlänge in Relation zur Baseline wiedergibt.

Zur Vergleichbarkeit der Einzelmessungen (leicht unterschiedliche Dauer bis zum sichtbaren Wirkungseintritt von Isoprenalin) wurde in der Auswertung der Zeitpunkt 60 s vor Beginn der 5 Hz-Phase des Messprotokolls als $t = 0$ gesetzt. Die Auswertung der Kontraktionskinetik erfolgte anhand von 3-5 repräsentativen Kontraktionstransienten je Phase des Protokolls (siehe auch Abb. 7):

- I. „0,5 Hz“ (60 s vor 5 Hz)
 II. „0,5 Hz + Iso“ (kurz vor Beginn 5 Hz unter Isoprenalin)
 III. „5 Hz + Iso“ (kurz vor Ende 5 Hz unter Isoprenalin)
 IV. „0,5 Hz nach Iso“ (60 s nach 5 Hz)

Die Auswertung der Kontraktilitätsparameter erfolgte an nativen ungefärbten Kardiomyozyten (Messungen in 4.4.6). In allen anderen Messprotokollen dienten die am PC visualisierten Echtzeit-Kontraktionen der Zelle zum Monitoring der Zellvitalität sowie der Isoprenalinwirkung während des Experiments.

4.4.5 Messung der cytosolischen Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_c$ mit Indo-1AM

Indikator	Parameter	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)	Lok.	Bezeichn.	Spiegel (nm)	Transmission (nm)
Indo-1 (AM)	$[Ca^{2+}]_c$	338	405 / 485	FW	D340/12x	-	340±6
				S1	650DCXR	< 650	> 650
				S2	440DCLP	< 440	> 440
				S3	515DCXR	< 515	> 515
				F1	D405/30x	-	405±15
				F2	D485/30x	-	485±15
				F3	D605/55x	-	405±27,5

Tabelle 3: Fluoreszenzeigenschaften von Indo-1 (AM) sowie Filter- und Spiegel-Einstellungen zur Fluoreszenzmessung an der Messanlage

links oben: Verwendete Fluoreszenzindikatoren mit Anregungswellenlänge (λ_{exc}) und Emissionswellenlänge (λ_{em}); *links unten:* schematische Darstellung der Strahlengänge von Durchlicht (rot), Anregungs- (blau) und Emissionslicht (hell- und dunkelgrün) der Fluoreszenzindikatoren
rechts: Filter- und Spiegeleinstellungen am IonOptix-System, Lokalisationsbezeichnungen wie in Abb. 6 verwendet

Indo-1 AM ist ein ratiometrischer Fluoreszenzfarbstoff, welcher in seiner Form als Acetoxymethylester (AM) Zellmembranen permeieren kann. Im Cytosol wird die AM-Gruppe des Farbstoffs durch zelleigene Esterasen abgespalten, wodurch kein erneutes Passieren der Zellmembran möglich ist und das Indo-1-Molekül im Cytosol verbleibt. Indo-1 hat eine hohe Ca^{2+} -Affinität und kann daher anhand seines

Fluoreszenzspektrums als Ca^{2+} -Indikator dienen.⁸⁶ Das Absorptionsmaximum des Indo-1-Moleküls liegt bei 346 nm. Durch die Bindung von Ca^{2+} -Ionen verschiebt sich das Emissionsmaximum des ungebundenen Indo-1 ($\lambda_{\text{em1}} = 485 \text{ nm}$) in Richtung kürzerer Wellenlängen auf nun $\lambda_{\text{em2}} = 405 \text{ nm}$.⁴⁴ Die Fluoreszenzsignale der beiden Emissionswellenlängen können gemessen und das Verhältnis $\lambda_{\text{em1}}/\lambda_{\text{em2}}$ gebildet werden. Dieses Verhältnis ist hoch sensitiv für Veränderungen der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und reduziert Messartefakte, welche insbesondere durch eine inhomogene cytosolische Farbstoffanreicherung entstehen könnten.¹¹⁰

Um Änderungen des cytosolischen Calciums $[\text{Ca}^{2+}]_c$ im Verlauf des Stressprotokolls zu erfassen, wurde 1 ml der Zellsuspension in einem Eppendorfgefäß mit Indo-1 AM ($5 \mu\text{M}$, in DMSO gelöst) für insgesamt 20 min bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert, wobei in den letzten 5 min der Farbstoffeinwirkung ein Sedimentieren der Zellen ermöglicht wurde. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellsediment mit Farbstofffreier NT-Lösung auf 1 ml aufgefüllt, erneut sedimentiert und durch Abpipettieren des Überstandes Reste des Farbstoffs ausgewaschen. Nach erneutem Auffüllen mit NT-Lösung und Abwarten einer Ruhezeit von 30 min (Esterhydrolyse) erfolgte im Verlauf des Messprotokolls die Aufzeichnung der Fluoreszenzsignale bei den Wellenlängen $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 405/485 \text{ nm}$.

4.4.6 Messung des Redoxstatus über die Autofluoreszenzen von NAD(P)H und FAD

Indikatoren	Parameter	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)	Lok.	Bezeichn.	Spiegel (nm)	Transmission (nm)
NAD(P)H	NAD(P)H	340	450	FW1	D340/12x	-	340±6
FAD	FAD	485	525	FW2	S490/20x	-	490±10
				S1	650DCXR	< 650	> 650
				S2	490DCLP	< 440	> 440
				S3	Spiegel	alles	-
				F1	D435/35x	-	435±17,5
				F2	D525/30x	-	525±15
				F3	-	-	-

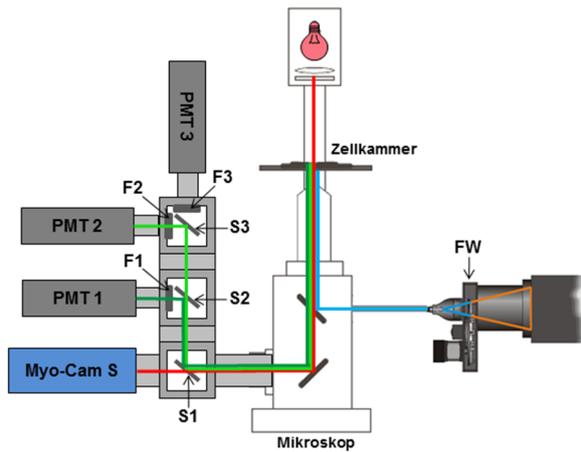


Tabelle 4: Autofluoreszenzeigenschaften von NAD(P)H und FAD sowie Filter- und Spiegel-Einstellungen zur Fluoreszenzmessung an der Messanlage

links oben: Verwendete Fluoreszenzindikatoren mit Anregungswellenlänge (λ_{exc}) und Emissionswellenlänge (λ_{em}); *links unten:* schematische Darstellung der Strahlengänge von Durchlicht (rot), Anregungs- (blau) und Emissionslicht (hell- und dunkelgrün) der Fluoreszenzindikatoren
rechts: Filter- und Spiegeleinstellungen am IonOptix-System, Lokalisationsbezeichnungen wie in Abb. 6 verwendet

In Mitochondrien wird im Rahmen der ADP-abhängigen ATP-Produktion über den Krebszyklus generiertes NADH und $FADH_2$ zu NAD^+ und FAD oxidiert. Die in der Mitochondrienmatrix befindlichen Dehydrogenasen des Krebszyklus sind als Schlüsselenzyme durch Ca^{2+} aktivierbar. Da eine erhöhte Arbeitsbelastung der Kardiomyozyten mit steigenden cytosolischen Ca^{2+} -Transienten einhergeht, kann über die konsekutiv verbesserte mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme die Regenerationsrate von in der Atmungskette oxidierten Redoxäquivalenten beschleunigt und somit die mitochondriale ATP-Produktion an eine akute Arbeitslast-Änderung angepasst werden. Der Redoxstatus der Redoxpaare NAD(P)H/ $NAD(P)^+$ und $FADH_2$ /FAD sowie insbesondere der Quotient aus NAD(P)H/FAD dienen somit als sensitive und ratiometrische Indikatoren der Ca^{2+} -induzierten Krebszyklus-Aktivierung und damit der bioenergetischen Adaptation. Die Parameter können über

ihre Autofluoreszenzen an intakten Kardiomyozyten unter Erhalt des physiologischen intrazellulären Milieus erhoben werden und bilden auch kurzfristige Änderungen der Redoxgleichgewichte ab.

Das Redoxpaar NADH/NAD⁺ absorbiert ultraviolettes Licht der Wellenlänge $\lambda_{exc} = 340$ nm. Die beiden Redoxformen des Coenzym unterscheiden sich in ihren emittierten Fluoreszenzprofilen. Während das Emissionsmaximum der reduzierten Form NADH bei $\lambda_{em} = 450$ nm liegt, besitzt die oxidierte Form NAD⁺ keine signifikante Fluoreszenz bei dieser Wellenlänge. In Kardiomyozyten setzt sich das Fluoreszenzsignal bei $\lambda_{em} = 450$ nm aus den Fluoreszenzen der reduzierten Formen NADH und NADPH (zusammenfassend als NAD(P)H bezeichnet) in der Mitochondrienmatrix sowie einer geringfügigen Menge im Cytosol lokalisierten NAD(P)H zusammen.³⁸ Das Redoxpaar FADH₂/FAD besitzt sein Absorptionsmaximum bei der Wellenlänge $\lambda_{exc} = 450$ nm. Aus technischen Gründen erfolgt die Anregung mit der vom Maximum abweichenden Exzitationswellenlänge $\lambda_{exc} = 485$ nm, welche ein schwächeres Emissionssignal erzeugt. Das unterschiedliche Emissionsspektrum der beiden Redoxformen FADH₂ und FAD lässt sich auch hier für die Messung nutzen. Die oxidierte Form FAD besitzt ihr Emissionsmaximum bei $\lambda_{em} = 525$ nm, während reduziertes FADH₂ nur eine minimale Fluoreszenz aufweist.

Zur Messung der Autofluoreszenzen von NAD(P)H und FAD wurden die Zellen alternierend mit den Wellenlängen $\lambda_{exc1} = 340$ nm und $\lambda_{exc2} = 485$ nm angeregt und deren Emission bei $\lambda_{em1} = 450$ nm (für NAD(P)H) und $\lambda_{em2} = 525$ nm (für FAD) aufgezeichnet. Der Index aus den beiden Fluoreszenzsignalen NAD(P)H/FAD dient als sensibler Parameter für den Redoxstatus der Zelle.

Die Kalibrierung der einzelnen Messungen erfolgte im Anschluss an das Protokoll durch Zugabe von FCCP (5 μ M) und Cyanid (4 mM). FCCP stellt einen Entkoppler der mitochondrialen Atmungskette dar, indem es als Ionenkanal den Durchtritt von Protonen (H⁺) durch die innere Mitochondrienmembran ermöglicht und dadurch den chemiosmotischen Gradienten als Treibkraft für die ATP-Synthese abbaut.⁴⁰ Zunächst wurde durch Einspülen von FCCP der Redoxstatus der Zelle maximal oxidiert, was sich in einer Abnahme des NAD(P)H-Signals und dem gleichzeitigen Anstieg des FAD-Signals widerspiegelte. Nach Erreichen der minimalen bzw. maximalen Fluoreszenzwerte (stabiles Plateau) wurde durch Zuführen des

Atmungsketten-Inhibitors Cyanid (CN) der Redoxstatus maximal reduziert, wodurch die NAD(P)H-Fluoreszenz ihr Maximum und das FAD-Signal sein Minimum erreichte. Die Erhebung dieser Extremwerte ermöglichte die prozentuale Auswertung der einzelnen Fluoreszenzsignale im Verlauf des Experiments und damit auch einen Vergleich der Redoxzustände unterschiedlicher Zellen zu Beginn des Experiments (Abb. 8).

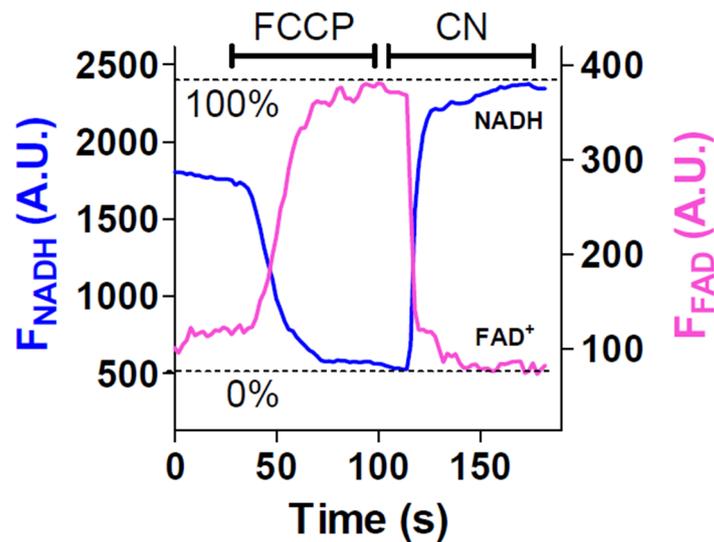


Abb. 8: Kalibrierung der Fluoreszenzsignale von NAD(P)H/FAD mit FCCP u. CN

Am Ende des Experiments wurden FCCP (5 μM) und Cyanid (4 mM) in die Zellkammer eingewaschen, um NAD(P)H und FAD maximal zu oxidieren bzw. reduzieren.

Abb. nach Kohlhaas and Maack (2010)

4.4.7 Messung des mitochondrialen Membranpotenzials ($\Delta\Psi_m$) mit TMRM

Indikator	Parameter	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)	Lok.	Bezeichn.	Spiegel (nm)	Transmission (nm)
TMRM	$\Delta\Psi_m$	540	605	FW	D540/25x	-	540±12,5
				S1	650DCXR	< 650	> 650
				S2	440DCLP	< 440	> 440
				S3	515DCXR	< 515	> 515
				F1	D405/30x	-	405±15
				F2	D485/30x	-	485±15
				F3	D605/55x	-	405±27,5

Tabelle 5: Fluoreszenzeigenschaften von TMRM sowie Filter- und Spiegel-Einstellungen zur Fluoreszenzmessung an der Messanlage

links oben: Verwendeter Fluoreszenzindikator mit Anregungswellenlänge (λ_{exc}) und Emissionswellenlänge (λ_{em}); *links unten:* schematische Darstellung der Strahlengänge von Durchlicht (rot), Anregungs- (blau) und Emissionslicht (grün) des Fluoreszenzindikators

rechts: Filter- und Spiegeleinstellungen am IonOptix-System, Lokalisationsbezeichnungen wie in Abb. 6 verwendet

Der Rhodamin-Fluoreszenzfarbstoff TMRM⁺ (tetramethylrhodamine methyl ester) ist ein lipophiles Kation, welches die Zellmembran sowie die Mitochondrienmembranen permeieren kann. Aufgrund seiner positiven Ladung akkumuliert das Molekül in der negativ geladenen Mitochondrienmatrix proportional zur Intensität des mitochondrialen Membranpotenzials $\Delta\Psi_m$. Diese mitochondriale Akkumulation führt zu einer messbaren Verschiebung des TMRM-Fluoreszenzspektrums. Im Gegensatz zu anderen Rhodaminderivaten supprimiert TMRM in niedrigen Konzentrationen nicht die mitochondriale Atmung, sodass keine TMRM-assoziierten Beeinträchtigungen des mitochondrialen Membranpotenzials oder der mitochondrialen Funktion zu erwarten sind.¹⁰⁰ FCCP stellt einen Entkoppler des mitochondrialen Membranpotenzials $\Delta\Psi_m$ dar, indem es als Ionenkanal den Durchtritt von H⁺-Ionen durch die innere Mitochondrienmembran ermöglicht und dadurch den über der Membran etablierten chemiosmotischen Gradienten abbaut.⁴⁰ Oligomycin

ist eine antibiotisch wirksame Substanz und hemmt die oxidative Phosphorylierung als Inhibitor der ATP-Synthase, indem es deren Protonenkanal blockiert.⁴⁵

Zur Messung des mitochondrialen Membranpotenzials ($\Delta\Psi_m$) wurde 1 ml der Kardiomyozyten-Suspension mit TMRM inkubiert ($0,025 \mu\text{M}$ für 10 min bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$). Nach Auswaschen der Farbstoffreste mit NT-Lösung erfolgte die Messung bei den Fluoreszenzintensitäten $\lambda_{\text{exc}} = 540 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 605 \text{ nm}$ vor und nach der vollständigen Dissipation von $\Delta\Psi_m$ durch kombinierte Applikation von FCCP ($5 \mu\text{M}$) und Oligomycin ($1,26 \mu\text{M}$).

4.4.8 Messung des mitochondrialen Superoxids $[\cdot\text{O}_2^-]_m$ mit MitoSOX

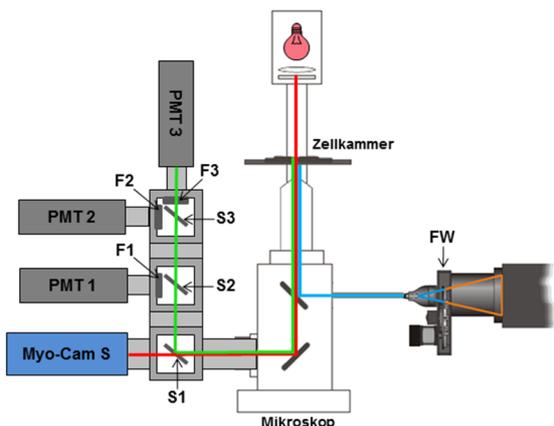
Indikator	Parameter	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)	Lok.	Bezeichn.	Spiegel (nm)	Transmission (nm)
MitoSOX	$[\cdot\text{O}_2^-]_m$	390	580	FW	D380/30x	-	380 ± 15
				S1	650DCXR	< 650	> 650
				S2	440DCLP	< 440	> 440
				S3	515DCXR	< 515	> 515
				F1	D405/30x	-	405 ± 15
				F2	D485/30x	-	485 ± 15
				F3	D605/55x	-	$405 \pm 27,5$

Tabelle 6: Fluoreszenzeigenschaften von MitoSOX sowie Filter- und Spiegel-Einstellungen zur Fluoreszenzmessung an der Messanlage

links oben: Verwendeter Fluoreszenzindikator mit Anregungswellenlänge (λ_{exc}) und Emissionswellenlänge (λ_{em}); *links unten:* schematische Darstellung der Strahlengänge von Durchlicht (rot), Anregungslicht (blau) und Emissionslicht (grün) des Fluoreszenzindikators

rechts: Filter- und Spiegeleinstellungen am IonOptix-System, Lokalisationsbezeichnungen wie in Abb. 6 verwendet

Der Fluoreszenzfarbstoff MitoSOX kann die Membranen lebender Zellen permeieren und reichert sich selektiv in Mitochondrien an, wo er durch vorhandene Superoxidradikale ($\cdot\text{O}_2^-$) schnell oxidiert wird und dadurch eine messbare rote Fluoreszenz bei $\lambda_{\text{em}} = 580 \text{ nm}$ entwickelt.⁹⁶ Zwar können auch andere reaktive Sauerstoffspezies (wie beispielsweise H_2O_2) den Farbstoff oxidieren, die für die

Messung gewählte Exzitationswellenlänge zielt allerdings auf eine Hydroxylgruppe ab, welche für die $\cdot\text{O}_2^-$ -bedingte Oxidation spezifisch ist und ihr Absorptionsmaximum bei 396 nm besitzt.⁹⁵ Da die mitochondriale Atmungskette in den meisten Geweben die Hauptquelle intrazellulärer ROS darstellt, kann der mitochondriale Superoxidgehalt als repräsentativ für das intrazelluläre ROS-Gleichgewicht angesehen werden.⁷ Antimycin A bindet an Komplex III der Atmungskette (Cytochrom c-Reduktase) und blockiert dadurch die Elektronenübertragung von Coenzym Q auf Cytochrom c. Dadurch bleiben die „upstream“ (stromaufwärts) des Komplexes III liegenden Komponenten der Atmungskette vermehrt elektronenbeladen (reduziert), die nachfolgenden oxidiert. Durch die Hemmung der Elektronenweitergabe kann an Komplex IV keine Reduktion von Sauerstoff (O_2) zu Wasser (H_2O) stattfinden, sodass der O_2 -Verbrauch sinkt und die ATP-Synthese an Komplex V zum Erliegen kommt.^{111, 112} Durch ein Ausweichen der Elektronen kommt es zu einer überschießenden Bildung von Superoxidradikalen ($\cdot\text{O}_2^-$) an den Komplexen I und III, welche über das MitoSOX-Fluoreszenzsignal gemessen werden kann.⁷⁷

Zur Messung der mitochondrialen Superoxidproduktion im Verlauf des Protokolls wurde 1 ml der Zellsuspension aus isolierten Kardiomyozyten sedimentiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit NT'-Lösung (ohne antioxidativ wirksame Substanzen) resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde mit MitoSOX (3,3 μM , gelöst in Pluronic) für insgesamt 30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. In den letzten 3 min der Farbstoffeinwirkung wurden die Zellen erneut sedimentiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml NT'-Lösung resuspendiert. Anschließend erfolgte die Messung bei den Wellenlängen $\lambda_{\text{exc}} = 380 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 580 \text{ nm}$. Zur Positivkontrolle wurde Antimycin A (150 μM) verwendet. Als Hemmstoff der Atmungskette verursacht Antimycin A eine überschießende $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion, die schließlich zum Tod der Zelle führt.

4.5 Graphische und statistische Auswertung

Die in IonWizard 6.0 erhobenen Messdaten wurden anhand der 5 Hz-Sequenz synchronisiert und mit Hilfe der Kalibrierung normiert (Fluoreszenzmessungen von NAD(P)H/FAD, MitoSOX und TMRM) bzw. einer Transientenanalyse unterzogen (Kontraktions- und $[Ca^{2+}]_c$ -Daten) und in eine Tabellenkalkulation in Microsoft Office Excel übertragen.

Die statistische Auswertung sowie graphische Aufbereitung der Ergebnisse wurde in GraphPad Prism 5.0 vorgenommen. Die statistische Signifikanz wurde über eine two-way-ANOVA-Analyse mit Bonferroni posttest bzw. einen gepaarten oder ungepaarten t-Test ermittelt. Unterschiede zwischen zwei Gruppen, welche eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ aufwiesen, wurden hierbei als signifikant gewertet. Die Daten werden als arithmetischer Mittelwert (MW) mit zugehörigem Standardfehler (engl. standard error of the mean, SEM) angegeben (MW \pm SEM).

5. Ergebnisse

5.1 Die Zellkontraktilität von Mfn2-KO-Myozyten

Um eine mögliche Beeinträchtigung der Zellkontraktilität in Mfn2-defizienten Kardiomyozyten zu untersuchen, wurden die Zellen einem Stressprotokoll unterzogen (siehe 4.4.3) und währenddessen die Sarkomerlänge im Vergleich zu Kontrollzellen aufgezeichnet. Die Auswertung der Kontraktilitätsparameter erfolgte simultan zu den Messungen in 4.4.6 an nativen ungefärbten Kardiomyozyten. Zu den Zeitpunkten I-IV (siehe Abb. 7 in 4.4.3) wurden die diastolischen und systolischen Sarkomerlängen sowie die fraktionelle Sarkomerverkürzung (fractional sarcomere shortening, FS) als Maß der Zellkontraktilität zwischen den Gruppen verglichen.

Erwartungsgemäß kam es in beiden Gruppen zum Anstieg der Zellkontraktilität unter β -adrenerger Stimulation (Isoprenalin 30 nM) bei 0,5 Hz, welche nach Erhöhung der Stimulationsfrequenz auf 5 Hz ihr Maximum erreichte. Nach Auswaschen des Isoprenalins aus der Zellkammer und Rückkehr zu einer Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz kam es zum Rückgang der Kontraktilität in Richtung der basalen Ausgangswerte. Im Verlauf des Messprotokolls wiesen Mfn2-KO-Kardiomyozyten hinsichtlich der Zellkontraktilität, bestimmt anhand des FS, keine Unterschiede im Vergleich mit den Kontrollzellen auf (Abb. 9).

Mittels Transientenanalyse der repräsentativen Kontraktionstransienten in den verschiedenen Phasen des Messprotokolls war zudem ein Vergleich der Kontraktionskinetik im systolischen (time to peak, TTP) und diastolischen Schenkel des Kontraktionstransienten (Relaxationszeiten RT 50% und RT 90%) möglich. Auch im Hinblick auf die Parameter der Kontraktionskinetik ergaben sich keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen (Abb. 10).

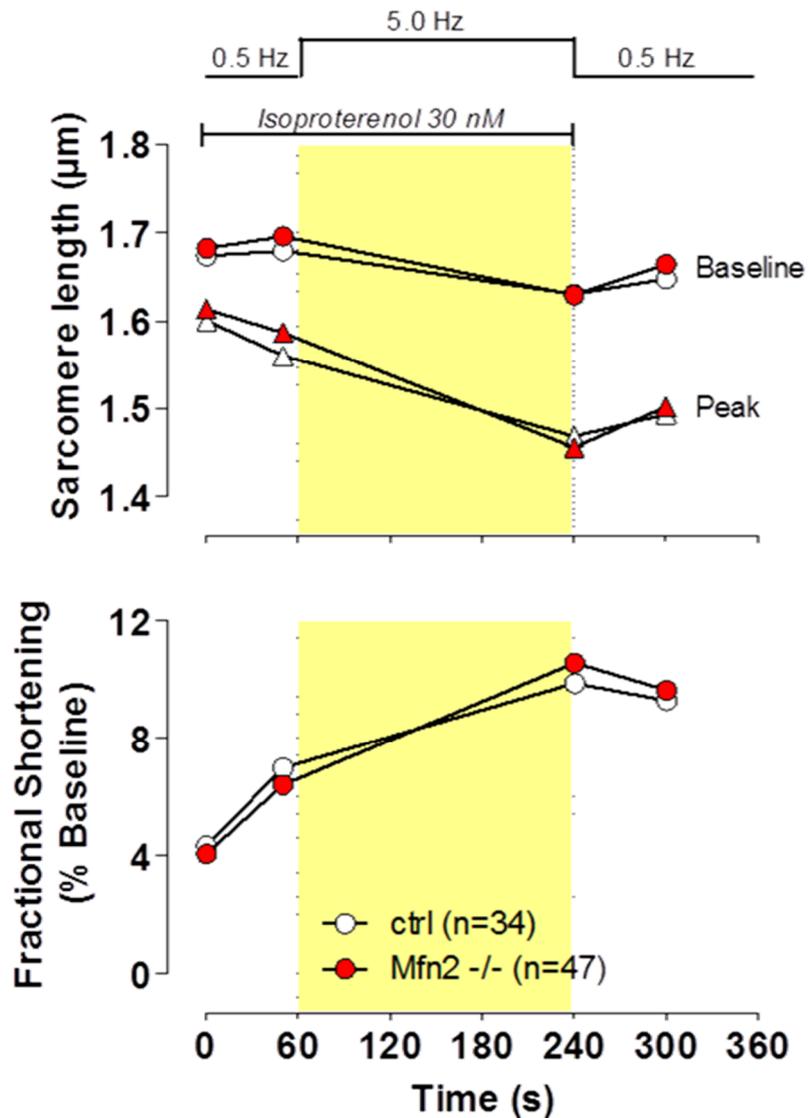


Abb. 9: Kontraktilität von Mfn2-KO-Myozyten

Adulte ventrikuläre Kardiomyozyten der Maus wurden unter elektrischer Feldstimulation mit 0,5 Hz dem β -adrenergen Agonisten Isoprenalin (30 nM) ausgesetzt und die Stimulationsfrequenz für 3 min auf 5 Hz erhöht. Anhand der Sarkomerlänge (Sarcomere length) zu vier repräsentativen Zeitpunkten des Protokolls (siehe 4.4.3) wurden die Basal-Amplitude (Baseline, BL) sowie die maximale Amplitude (Peak) bestimmt. Als Maß der Kontraktilität diente die fraktionelle Sarkomerverkürzung (Fractional Sarcomere Shortening, FS), welche die Verkürzung in Relation zur Baseline wiedergibt. Ergebnisse dargestellt als Mittelwerte. Keine signifikanten Unterschiede zwischen Mfn2-KO und WT.

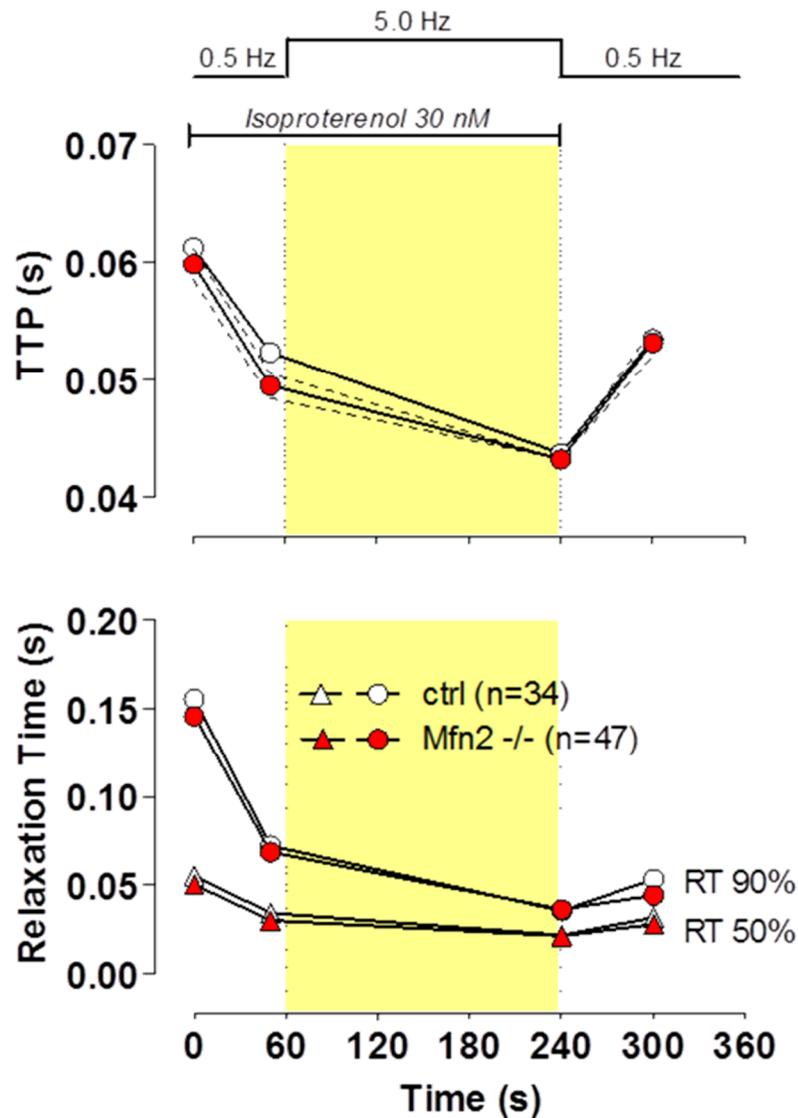


Abb. 10: Kontraktionskinetik von Mfn2-KO-Myozyten

Adulte ventrikuläre Kardiomyozyten der Maus wurden unter elektrischer Feldstimulation mit 0,5 Hz dem β -adrenergen Agonisten Isoprenalin (30 nM) ausgesetzt und die Stimulationsfrequenz für 3 min auf 5 Hz erhöht. Anhand der Auswertung einzelner Kontraktionstransienten zu vier repräsentativen Zeitpunkten des Protokolls (siehe 5.1) wurden systolische (time to peak, TTP) und diastolische (relaxation time, RT) Parameter erhoben, wobei zwischen RT bis 50% der Baseline (RT 50%) und bis 90% der Baseline (RT 90%) unterschieden wurde. Ergebnisse dargestellt als Mittelwerte. Keine signifikanten Unterschiede zwischen Mfn2-KO und WT.

5.2 Die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_c$ in Mfn2-KO-Myozyten

Eine Steigerung der Arbeitsbelastung kontrahierender Kardiomyozyten führt über β -adrenerge Stimulation zur Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Transienten. Dies erhöht einerseits die Kontraktilität der Zelle durch Rekrutierung einer größeren Anzahl von Myofibrillen im Cytosol und führt andererseits über eine effizientere mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme zur adäquaten Ca^{2+} -abhängigen Stimulation des Citratzyklus, um die im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung verbrauchten Redoxäquivalente zu regenerieren. Zur Sicherstellung einer vergleichbaren cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und damit dem Ausschluss von Ca^{2+} -Unterschieden im Gesamtcytosol als Ursache für Veränderungen der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme wurden im Verlauf des Messprotokolls die cytosolischen Ca^{2+} -Transienten mittels Indo-1AM-Färbung erfasst. Hierzu wurden die Zellen mit dem Farbstoff Indo-1AM als Cytosol-spezifischem Ca^{2+} -Indikator beladen. Über die Fluoreszenzmessung war die Aufzeichnung der cytosolischen Ca^{2+} -Transienten im Verlauf des Messprotokolls möglich.

Erwartungsgemäß kam es in beiden Gruppen zu einer Steigerung der cytosolischen Ca^{2+} -Amplituden unter der Einwirkung des β -adrenergen Agonisten Isoprenalin, welche unter erhöhter Stimulationsfrequenz von 5 Hz ihr Maximum erreichte. Nach Auswaschen des Isoprenalins aus der Zellkammer sowie Rückkehr zur 0,5 Hz-Stimulation waren die Ca^{2+} -Amplituden in beiden Gruppen wieder in Richtung der Basalwerte rückläufig.

Verglichen mit den Wildtyp-Kontrollzellen zeigten Mfn2-KO-Kardiomyozyten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der systolischen und diastolischen Ca^{2+} -Konzentrationen im Cytosol. Die Amplitude der cytosolischen Ca^{2+} -Transienten ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_c$) lag in den Mfn2-KO-Myozyten jedoch durchweg oberhalb der von Wildtypzellen, die basale Ca^{2+} -Amplitude (Zeitpunkt I, vor Isoprenalinwirkung) wies in Mfn2-KO-Myozyten eine signifikante Erhöhung auf ($0,095 \pm \text{SEM}$ in WT vs. $0,181 \pm \text{SEM}$ in Mfn2-KO, $p < 0,05$; Abb. 11).

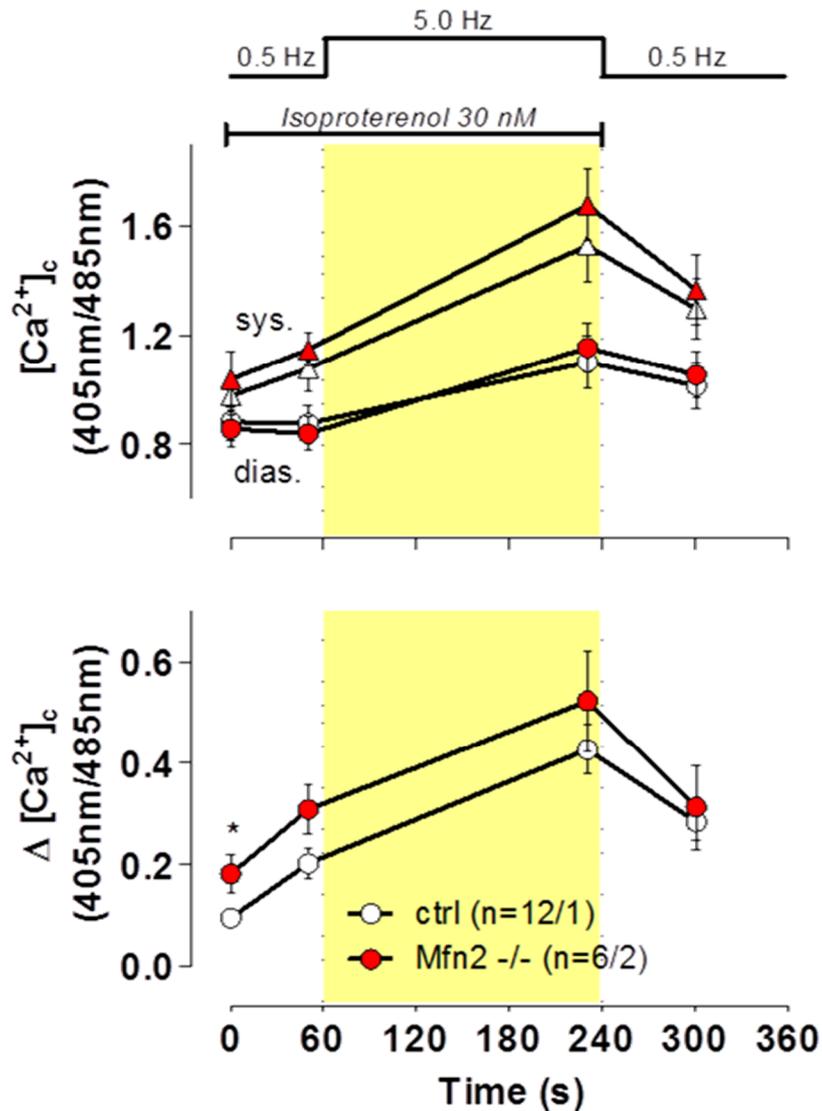


Abb. 11: Cytosolische Ca^{2+} -Konzentration in Mfn2-KO-Myozyten

Adulte ventrikuläre Kardiomyozyten der Maus wurden mit Indo-1AM inkubiert, unter elektrischer Feldstimulation mit 0,5 Hz dem β -adrenergen Agonisten Isoprenalin (30 nM) ausgesetzt und die Stimulationsfrequenz für 3 min auf 5 Hz erhöht. Anhand des Fluoreszenzsignals von Indo-1 AM erfolgte die Messung der systolischen (sys.) und diastolischen (dias.) Ca^{2+} -Konzentrationen im Cytosol. Die Auswertung der Ca^{2+} -Transienten erfolgte zu vier repräsentativen Zeitpunkten des Protokolls (siehe 5.1). Die basale Ca^{2+} -Amplitude war in Mfn2-KO-Myozyten signifikant erhöht. Ergebnisse dargestellt als Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ im Vergleich mit WT.

5.3 Der mitochondriale Redoxstatus von Mfn1-KO- und Mfn2-KO-Myozyten

Die Reduktionsäquivalente NAD(P)H und FADH₂ unterliegen als Elektronendonatoren der Atmungskette physiologischer Weise einem ständigen Zyklus aus Oxidation (Verbrauch im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung) und Reduktion (Regeneration über den Citratzyklus). In Kardiomyozyten können Veränderungen des Redoxgleichgewichtes von NAD(P)H/NAD(P)⁺ und FADH₂/FAD, insbesondere unter erhöhter Arbeitsbelastung, Anzeichen einer inadäquaten Ca²⁺-induzierten Aktivierung des mitochondrialen Citratzyklus sein. Um Veränderungen des mitochondrialen Redoxgleichgewichtes im Verlauf des Messprotokolls zu erfassen, wurde der Redoxstatus von NAD(P)H/NAD(P)⁺ und FADH₂/FAD anhand der Autofluoreszenzen von NAD(P)H und FAD erhoben.

In Mfn1-KO-Myozyten blieb der Redoxstatus von NAD(P)H und FADH₂ im Verlauf des Protokolls nahezu konstant und zeigte keine signifikanten Unterschiede im Vergleich mit den Kontrollzellen. Auch das Verhältnis von NAD(P)H zu FAD als sensitiver und ratiometrischer Index für den mitochondrialen Redoxstatus blieb unverändert (Abb. 12).

Demgegenüber kam es in den Mfn2-KO-Zellen nach Applikation von Isoprenalin bei 0,5 Hz zu einer vermehrten Oxidation der Redoxäquivalente. Diese äußerte sich in der Abnahme der Fluoreszenz von NAD(P)H bei gleichzeitiger Zunahme des FAD-Signals und zeigt sich auch im Verhältnis der beiden Fluoreszenzsignale zueinander ($p < 0,01$ verglichen mit WT; two-way-ANOVA; Abb. 13). Im weiteren Verlauf der Messung kam es unter 5 Hz-Stimulation (insbesondere innerhalb der ersten Minute unter 5 Hz) bei fortgesetzter Isoprenalinwirkung zu einer Regeneration (Reduktion) der Redoxäquivalente in Mfn2-KO-Myozyten, erkennbar am Anstieg des NAD(P)H/FAD-Index.

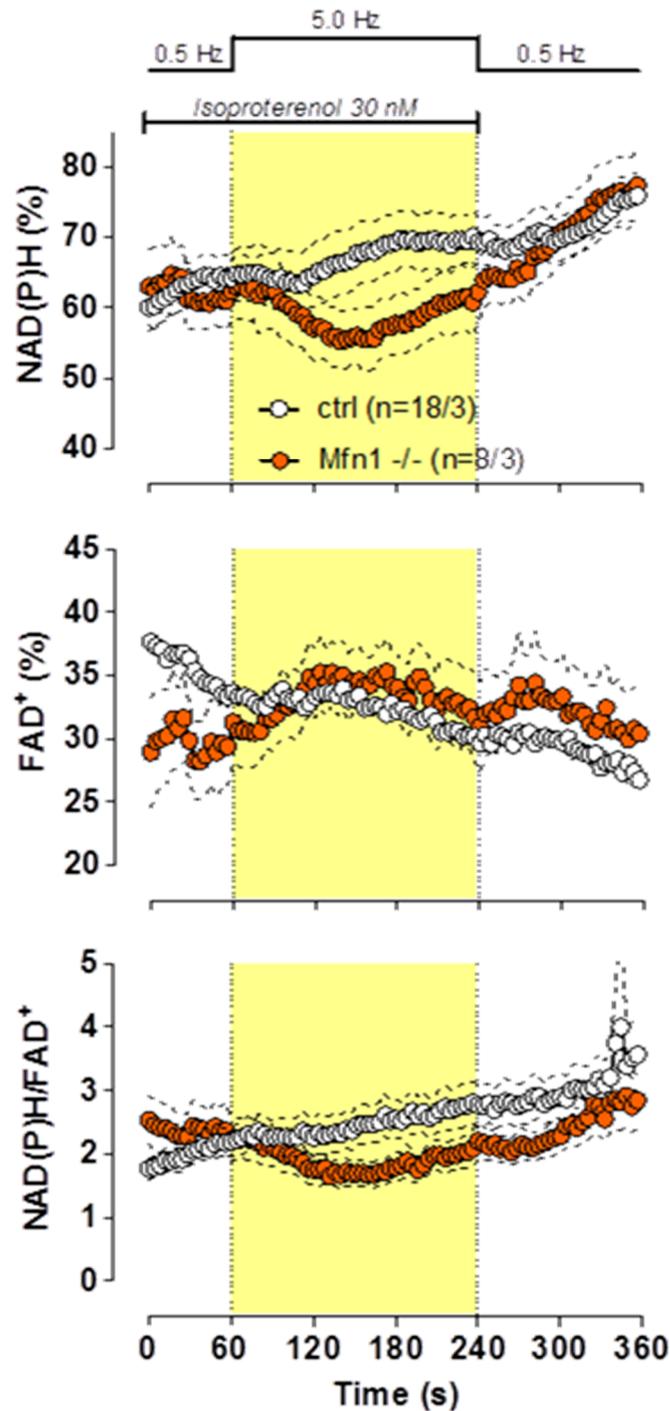


Abb. 12: Mitochondrialer Redoxstatus in Mfn1-KO-Myozyten

Adulte ventrikuläre Kardiomyozyten der Maus wurden unter elektrischer Feldstimulation mit 0,5 Hz dem β -adrenergen Agonisten Isoprenalin (30 nM) ausgesetzt und die Stimulationsfrequenz für 3 min auf 5 Hz erhöht. Es erfolgten Messungen der Autofluoreszenzen von NAD(P)H (**oben**) und FAD (**Mitte**) sowie die Bestimmung des Quotienten NAD(P)H/FAD (**unten**) als Maß für die Reduktionslage. Ergebnisse dargestellt als Mittelwerte \pm SEM. Keine signifikanten Unterschiede zwischen Mfn1-KO und WT.

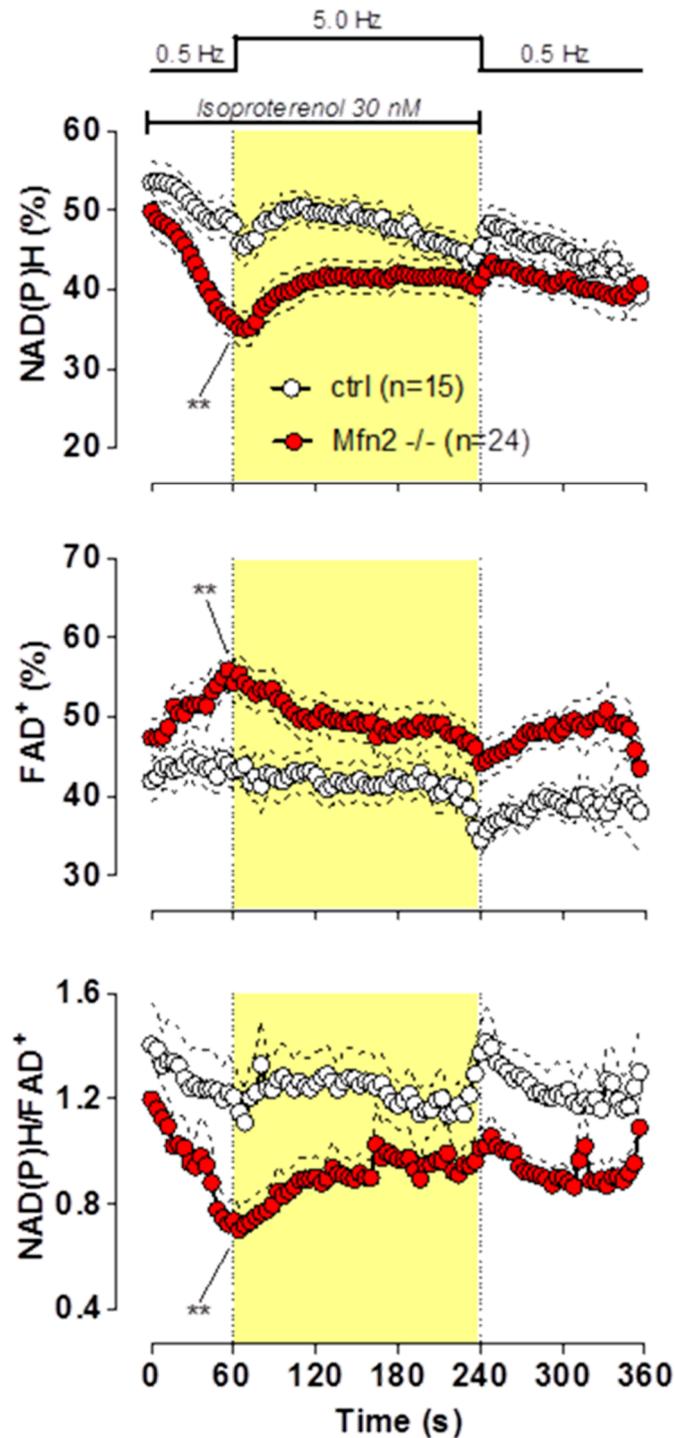


Abb. 13: Mitochondrialer Redoxstatus in Mfn2-KO-Myozyten

Adulte ventrikuläre Kardiomyozyten der Maus wurden unter elektrischer Feldstimulation mit 0,5 Hz dem β -adrenergen Agonisten Isoprenalin (30 nM) ausgesetzt und die Stimulationsfrequenz für 3 min auf 5 Hz erhöht. Es erfolgten Messungen der Autofluoreszenzen von NAD(P)H (**oben**) und FAD (**Mitte**) sowie die Bestimmung des Quotienten NAD(P)H/FAD (**unten**) als Maß für die Reduktionslage. In Mfn2-KO-Kardiomyozyten kam es unter Isoprenalinwirkung bei 0,5 Hz zu einer vermehrten Oxidation der Redoxäquivalente, was sich in einer Abnahme der Fluoreszenz von NAD(P)H bei gleichzeitiger Zunahme des FAD-Signals, aber auch im Verhältnis NAD(P)H/FAD widerspiegelt. Ergebnisse dargestellt als Mittelwerte \pm SEM. **p < 0,01 im Vergleich mit WT (two-way-ANOVA)

5.4 Das mitochondriale Membranpotenzial $\Delta\Psi_m$ von Mfn2-KO-Myozyten

Da das negative Membranpotenzial der Mitochondrien den Antrieb für die mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme liefert, muss sichergestellt werden, dass Unterschiede der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme nicht auf direkt Mfn2-assoziierte Veränderungen des mitochondrialen Membranpotenzials zurückzuführen sind. Hierzu wurden Kardiomyozyten mit TMRM⁺, einem fluoreszierenden Indikator des mitochondrialen Membranpotenzials, beladen und die Fluoreszenz von TMRM vor und nach der kompletten Dissipation des Membranpotenzials durch die kombinierte Applikation von FCCP und Oligomycin bestimmt.

Zwischen Mfn2-KO- und Kontroll-Kardiomyozyten ergaben sich keine Unterschiede im mitochondrialen Membranpotenzial, weder vor noch nach Einwirkung von FCCP und Oligomycin (Abb. 14).

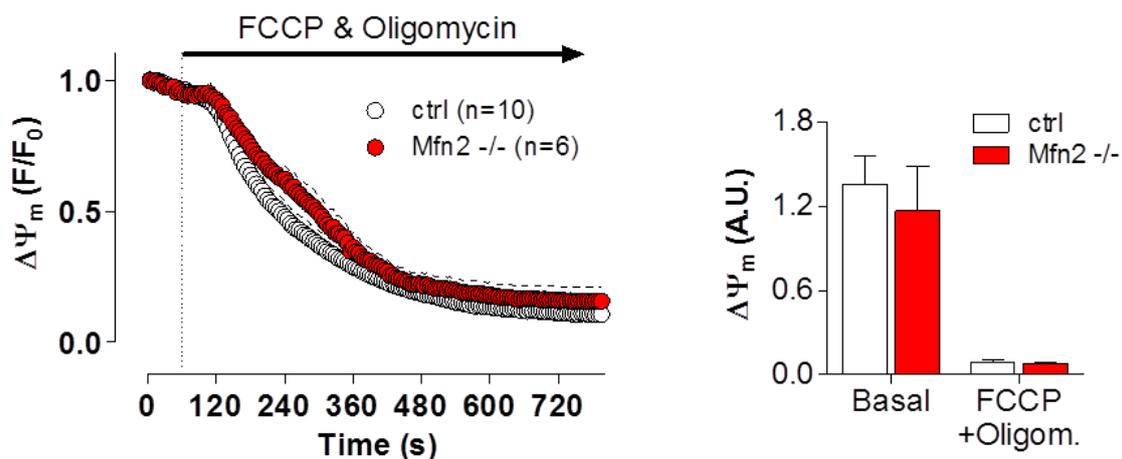


Abb. 14: Mitochondriales Membranpotenzial $\Delta\Psi_m$ in Mfn2-KO-Myozyten

links: Zeitlicher Verlauf der Dissipation des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) gemessen anhand der TMRM-Fluoreszenz (Fluoreszenzsignal F / basale Fluoreszenzintensität F_0) nach Zugabe von FCCP und Oligomycin.

rechts: Absolute TMRM-Fluoreszenz als Maß für das mitochondriale Membranpotenzial $\Delta\Psi_m$ vor (Basal) und nach Dissipation durch Zugabe von FCCP und Oligomycin. Ergebnisse dargestellt als Mittelwerte + SEM.

5.5 Die mitochondriale Superoxid-Produktion $[\cdot\text{O}_2^-]_m$ in Mfn2-KO-Myozyten

Zur Klärung der Frage, ob es in Mfn2-KO-Mäusen über eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme zu vermehrtem oxidativem Stress kommt, dienten Experimente mit dem mitochondrialen Superoxid-Indikator MitoSOX.

Innerhalb der ersten Minute der Isoprenalinwirkung bei 0,5 Hz war in Mfn2-KO-Myozyten eine transiente Zunahme der mitochondrialen Superoxid-Produktion $[\cdot\text{O}_2^-]_m$ zu verzeichnen ($p < 0,05$ verglichen mit WT), die sich im weiteren Verlauf des Protokolls bei 5 Hz unter Isoprenalin wieder normalisierte (Abb. 15, links). Dieser Anstieg in der ersten Minute entsprach etwa 10% des ROS-Anstiegs durch den Komplex-III-Inhibitor Antimycin A, der als Positivkontrolle in jeder Zelle verwendet wurde (Abb. 15, rechts).

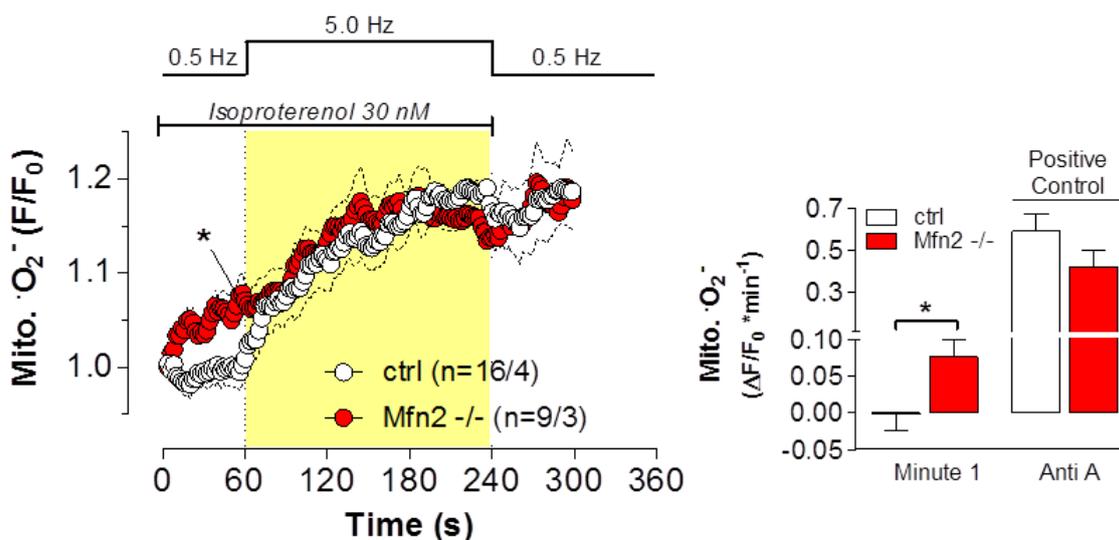


Abb. 15: Mitochondriale Superoxidproduktion $[\cdot\text{O}_2^-]_m$ in Mfn2-KO-Myozyten

links: Adulte ventrikuläre Kardiomyozyten der Maus wurden mit MitoSOX inkubiert, unter elektrischer Feldstimulation mit 0,5 Hz dem β -adrenergen Agonisten Isoprenalin (30 nM) ausgesetzt und die Stimulationsfrequenz für 3 min auf 5 Hz erhöht. Anhand des Fluoreszenzprofils von MitoSOX erfolgte die Messung des mitochondrialen Superoxids ($\text{Mito. } \cdot\text{O}_2^-$). Innerhalb der ersten Minute der Isoprenalinwirkung kam es in Mfn2-KO-Myozyten bei 0,5 Hz zu einer signifikanten Zunahme der Superoxidproduktion. * $p < 0,05$

rechts: Mitochondriale $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktionsrate 1 min nach Isoprenalinzugabe bei 0,5 Hz (Minute 1) und nach Zugabe von Antimycin A (Anti A). * $p < 0,05$

5.6 Weitere relevante Ergebnisse

An den (wie in 4.2. beschrieben) isolierten ventrikulären Kardiomyozyten wurden zudem Patch-Clamp-Experimente der Arbeitsgruppe (Versuchsdurchführung: Dr. rer. nat. Michael Kohlhaas; Methodik vgl. Maack et al. (2006)) durchgeführt, welche die simultane Messung cytosolischer (Indo-1 Salz) und mitochondrialer (Rhod-2 AM) Ca^{2+} -Transienten während des Stressprotokolls (siehe 4.4.3) in Mfn1- und Mfn2-KO-Kardiomyozyten vs. Wildtyp-Myozyten ermöglichten. Die hierbei erhobenen Befunde zeigen, dass das Verhältnis von mitochondrialer zu cytosolischer Ca^{2+} -Konzentration als Maß für die Effizienz der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme in Mfn2-KO-Myozyten in Richtung einer weniger effizienten Ca^{2+} -Aufnahme verschoben ist (Abb. 16, A). Die mitochondriale Ca^{2+} -Akkumulation unter β -adrenerger Stimulation bei 0,5 Hz war in Mfn2-KO-Myozyten im Vergleich zu Kontrollzellen vermindert (Abb. 16, B) und stimmte zeitlich genau mit der vermehrten Oxidation des Redoxstatus (siehe 5.3) überein.¹⁸

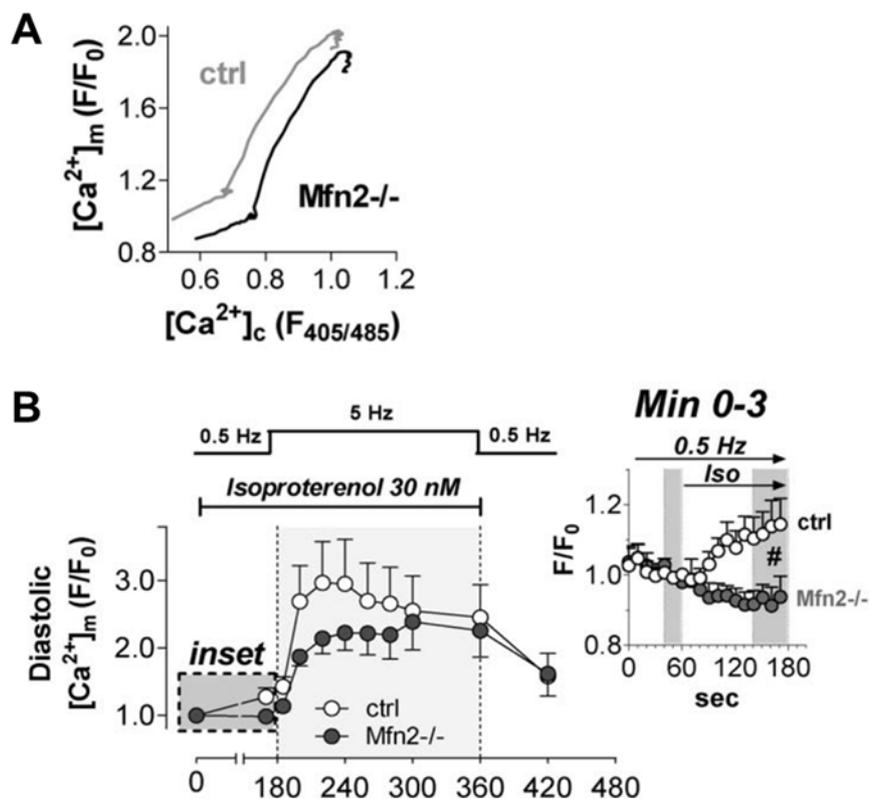


Abb. 16: Mitochondriale Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_m$ in Mfn2-KO-Myozyten

A: Dynamische Veränderungen des $[\text{Ca}^{2+}]_m$ aufgetragen gegen $[\text{Ca}^{2+}]_c$ der identischen Zelle in der ersten Minute unter Isoprenalin bei 0,5 Hz (n=14 ctrl, n=12 KO)

B: Veränderung des diastolischen $[\text{Ca}^{2+}]_m$ als Maß für die mitochondriale Ca^{2+} -Akkumulation im Verlauf des Stressprotokolls. Das Inset rechts zeigt die Veränderung des diastolischen $[\text{Ca}^{2+}]_m$ innerhalb der ersten beiden Minuten nach Isoprenalinzugabe an.

Chen et al. (2012)

In Beobachtungen der kardialen Funktion lebender Versuchstiere zeigten 6 Wochen alte Mfn1- und Mfn2-KO-Mäuse eine normale Herzgröße sowie eine normale kardiale Pumpfunktion, verglichen mit den entsprechenden Wildtyp-Geschwistertieren. Auch die elektronenmikroskopisch untersuchte Architektur von Mitochondrien und SR wies keine Veränderungen auf, allerdings war in Mfn2-KO-Myozyten die Kontaktfläche zwischen SR und benachbarten Mitochondrien durchschnittlich um 50% vermindert und der Abstand zwischen den Organellen um 38% erhöht, was in Mfn1-KO-Herzen nicht der Fall war. Im Alter von 16 Wochen wiesen Mfn2-KO-Mäuse eine progressive dilatative Kardiomyopathie auf, während sich Mfn1-KO-Mäuse normal entwickelten (Versuchsdurchführungen: Y. Chen und G. Dorn, Washington University in St. Louis, School of Medicine, St. Louis, USA; G. Csordas, Thomas Jefferson University, Department of Pathology, Anatomy and Cell Biology, Philadelphia, USA).¹⁸

6. Diskussion

6.1 Die Ergebnisse im Kontext aktueller Literatur

Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen wurden an isolierten Kardiomyozyten aus 6-8 Wochen alten Mfn2-KO- und Mfn1-KO-Mäusen sowie den Wildtyp-Geschwistertieren durchgeführt. Die intakten Myozyten wurden unter elektrischer Feldstimulation einem „Stressprotokoll“ (Isoprenalinzugabe und 5 Hz-Stimulation) unterzogen und im Verlauf des Protokolls Parameter der Zellkontraktilität (digitale Zellengeometrie) erhoben sowie die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration, der zelluläre Redoxstatus, die ROS-Produktion und das mitochondriale Membranpotenzial gemessen (Epifluoreszenzmikroskopie).

In den Experimenten kann aufgrund ähnlicher Anstiege der Sarkomerverkürzung und der cytosolischen Ca^{2+} -Transienten von einer vergleichbaren Arbeitslast in allen Gruppen ausgegangen werden. Die Unterschiede im Redoxstatus von NAD(P)H und FAD lassen daher auf Unterschiede in der Ca^{2+} -induzierten Aktivierung des Krebszyklus schließen und spiegeln ein Missverhältnis zwischen der Oxidation der Redoxäquivalente durch die Atmungskette (infolge ADP-induzierter Beschleunigung der ATP-Produktion) und deren Regeneration über den Krebszyklus in Mfn2-KO-Zellen wider. Dies steht in Einklang mit den in Patch-Clamp-Experimenten der Arbeitsgruppe erhobenen Befunden, welche für Mfn2-KO-Myozyten eine ineffektivere mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme zeigten. Die kurzfristige bioenergetische „Schuld“ im Sinne des veränderten Redoxgleichgewichtes in Mfn2-KO-Myozyten innerhalb der ersten Minute unter Isoprenalin hat zunächst keine Auswirkung auf die Parameter der Zellmotorik, was die in beiden Gruppen vergleichbaren Kontraktionseigenschaften belegen. Unter nachfolgend gesteigerter Stimulationsfrequenz mit konsekutiv erhöhter Frequenz der cytosolischen Ca^{2+} -Transienten kann über eine Verbesserung der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahmekinetik eine zur Krebszyklus-Stimulation suffiziente Ca^{2+} -Akkumulation in Mitochondrien erreicht werden, wodurch NAD(P)H und FADH_2 wieder regeneriert werden können.

Da reduziertes NADPH zur Elimination von in der Mitochondrienmatrix anfallenden ROS benötigt wird, kam es in den Mfn2-KO-Kardiomyozyten auch zum temporären

Anstieg der $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion unter der Wirkung von Isoprenalin. Der in Mfn2-KO-Zellen beobachtete veränderte Redoxstatus sowie die damit assoziierte bioenergetische Fehlanpassung sind nicht auf einen eigenständigen Defekt der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme zurückzuführen, denn das mitochondriale Membranpotenzial ($\Delta\Psi_m$) als grundlegende Treibkraft der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme weist keine Veränderung auf. Diese Beobachtungen lassen die Vermutung zu, dass Mfn2 eine Rolle in der Regulation der Ca^{2+} -Kommunikation zwischen SR und Mitochondrien spielt, ohne direkten Einfluss auf die Atmungskette (gleiche FS) oder die ATP-Produktion (gleiches $\Delta\Psi_m$) zu nehmen.

Zusammenfassend liefern die vorgestellten Ergebnisse – insbesondere in Zusammenschau mit den elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Kooperationspartner – Nachweise dafür, dass Mfn2 in Kardiomyozyten ein Linkerprotein zwischen dem SR und Mitochondrien darstellt und somit als strukturelle Komponente der mitochondrialen Ca^{2+} -Mikrodomäne die privilegierte Ca^{2+} -Transmission zwischen diesen beiden Organellen fördert. Über die Verbesserung der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme ist Mfn2 an der Regulation der bioenergetischen Adaptation des Herzens, insbesondere bei erhöhter Arbeitslast, sowie der Entgiftung von Sauerstoffradikalen beteiligt. Diese Funktion wird nur von Mfn2, aber nicht von Mfn1 eingenommen und scheint unabhängig von den Auswirkungen dieser Proteine auf die mitochondriale Fusion zu sein (da Mfn1 und Mfn2 bei der mitochondrialen Fusion redundante Rollen spielen).²⁰ Die Tatsache, dass Mfn2- im Gegensatz zu Mfn1-KO-Mäusen im Alter von 16 Wochen eine kardiale Dysfunktion und Dilatation entwickeln, könnte darauf hindeuten, dass Defekte der Ca^{2+} -Transmission zwischen SR und Mitochondrien auch eine kausale Rolle in der Entwicklung der Herzinsuffizienz spielen.

Die Konzentrationsverhältnisse sowie die kontextabhängige Freisetzung von Ca^{2+} als allgegenwärtiges Signalmolekül beeinflussen eine Vielzahl von essentiellen physiologischen, aber auch pathologischen Zellprozessen. Im Zellinnern unterliegt Ca^{2+} strengen Reglementierungen innerhalb von Speicherorganellen, vor allem im ER/SR, wodurch die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration relativ gering gehalten wird. Mit jeder Herzaktion oszilliert in Kardiomyozyten das $[\text{Ca}^{2+}]_c$ zwischen diastolischen Werten um 100 nmol/l und einem systolischen Maximum um 1 $\mu\text{mol/l}$. Ein geringer Anteil dieses Ca^{2+} gelangt über L-Typ Ca^{2+} -Kanäle ins Cytoplasma (im Menschen

~30%, in der Maus ~10%), der Großteil jedoch wird aus dem SR via RyR freigesetzt und über die SR-Ca²⁺-ATPase wieder aufgenommen (im Menschen ~70%; in der Maus ~90%).^{9, 71}

Mitochondrien sind als Quelle der ATP-Produktion unverzichtbar für die Prozesse der elektromechanischen Kopplung im Herzen, da sie den Kraftstoff für die verschiedenen Ionenpumpen sowie für die Myosin-ATPase liefern. Dementsprechend sind SR und Mitochondrien im Cytoplasma der Herzmuskelzellen durchweg in einem komplexen und intimen physikalischen Verbund organisiert. Die räumliche Nähe zwischen Mitochondrien und dem SR erleichtert die Bildung von Kompartimenten und damit den privilegierten Transport von ATP und potenziell auch von Ca²⁺. In den Mitochondrien stimuliert Ca²⁺ die geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme des Krebszyklus, welcher den Hauptproduktionsweg von NADH darstellt, und spielt damit eine Schlüsselrolle bei der Abstimmung von Energieangebot und -nachfrage.^{6, 71} Da die Regeneration von antioxidativ wirksamem NADPH ebenfalls an den Krebszyklus gekoppelt ist, kommt der mitochondrialen Ca²⁺-Aufnahme eine ebenso wichtige Bedeutung bei der Verhinderung einer übermäßigen ROS-Bildung zu.⁶¹ Allerdings limitiert die niedrige Ca²⁺-Affinität des primären mitochondrialen Ca²⁺-Importmechanismus (d.h. des MCU; EC₅₀ um 10 mM) die Fähigkeit der Mitochondrien zur Ca²⁺-Aufnahme aus dem Cytosol, wo in der Regel deutlich niedrigere Calciumkonzentrationen vorliegen.⁹⁴ Um dieses scheinbare Paradoxon zu lösen, führten Rizzuto und Pozzan die Existenz von Ca²⁺-übermittelnden „hot spots“, oder „Mikrodomänen“ zwischen ER und Mitochondrien ein.^{92, 93} Indirekte Hinweise hatten auf eine privilegierte Ca²⁺-Transmission zwischen SR und Mitochondrien in kardialen Myozyten hingedeutet^{41, 102, 107} und ein – wenn auch strukturell noch unbekanntes – Linkermolekül war im Herzen und in quergestreifter Muskulatur beobachtet worden.⁴⁸ Csordas et al. definierten strukturelle und funktionelle Verbindungen zwischen dem ER und Mitochondrien²⁴ und de Brito und Scorrano ermittelten in embryonalen Fibroblasten einen molekularen, physischen Anbindungsmechanismus von Mitochondrien an das ER über Mitofusin 2.²⁹

Unsere Ergebnisse zeigen, dass das von de Brito und Scorrano etablierte Konzept von Mfn2 als molekulare Verbindung zwischen ER und Mitochondrien²⁹ auf die andersgeartete Subzellulärstruktur und Organphysiologie des Herzens übertragbar ist, wo das SR den wichtigsten Ca²⁺-Speicher darstellt. Das Herz ist das

Mitochondrien-reichste Organ und erfordert hohe und schnell variierbare ATP-Produktionsraten, um die Pumpfunktion unter verschiedenen Arbeitsbelastungen aufrecht zu erhalten. Die elektromechanische Kopplung des Herzens ist abhängig von einer kontinuierlichen SR-Ca²⁺-Freisetzung und -wiederaufnahme.⁹ Sowohl Störungen des mitochondrialen Stoffwechsels als auch des SR-Ca²⁺-Zyklus führen zu kardialer Dysfunktion und können Herzerkrankungen verursachen.^{50, 115}

Daher kann das Herz aufgrund seiner einzigartigen Empfindlichkeit gegenüber retikulären und mitochondrialen Dysfunktionen als ideale experimentelle Plattform angesehen werden, um die molekularen Bestandteile der Kommunikation zwischen SR und Mitochondrien sowie ihre Funktion zu erforschen. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die SR-mitochondriale Verlinkung durch Mfn2 wichtig für die mitochondriale Detektion einer Stress-induzierten SR-Ca²⁺-Freisetzung ist. Auf diesem Weg erfolgt eine Verknüpfung der mitochondrialen ATP-Produktion mit dem SR-Ca²⁺-Zyklus in einem „rapid response“-System, die ein bioenergetisches Defizit bei akut erhöhter Arbeitslast des Herzens verhindert. Allerdings ist ein Beitrag weiterer Proteine – wie PACS-2 oder IP₃-Rezeptoren, welche in anderen Zelltypen zusammen mit VDAC an der ER-Mitochondrien-Interaktion beteiligt sind^{104, 106} – zur SR-mitochondrialen Ca²⁺-Kommunikation in Herzmuskelzellen nicht auszuschließen.

Obwohl die vorliegenden Ergebnisse jene von de Brito und Scorrano²⁹ bestätigen und erweitern, stehen sie im Kontrast zu denen von Papanicolaou et al.,⁸⁵ welche vor Kurzem berichteten, dass die herzspezifische Ablation von Mfn2 in Mäusen weder den engen Kontakt zwischen SR und Mitochondrien (basierend auf elektronenmikroskopischen Abstandsmessungen) beeinträchtigt, noch die Ca²⁺-Kommunikation in Kardiomyozyten zu beeinflussen scheint, und dass der Verlust von Mfn2 vor einer durch Ischämie induzierten mPTP-Öffnung schützt.⁸⁵ Allerdings gibt es wichtige Unterschiede zwischen unseren Studien und denen von Papanicolaou et al. Diese liegen zum einen im verwendeten Maus-Genmodell und dem Zeitpunkt der Mfn2-Ablation, zum anderen in Unterschieden bei der morphometrischen Auswertung der elektronenmikroskopischen Daten: Zunächst ist von der in besagter Studie verwendeten Maus-Cre-Linie bekannt, dass die im Maus-Embryo und in der adulten Maus stark erhöhte Cre-Expression bei älteren Mäusen zur Kardiotoxizität führt.⁷⁵ Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Zellkern-gerichtete Cre-Linie induziert die Genrekombination erst nach der Geburt (*vide supra*) und ist nicht als

kardiotoxisch beschrieben.⁷⁵ Die Tatsache, dass in unseren Experimenten die gleiche Cre-Exzisionsstrategie parallel sowohl für Mfn1 als auch für Mfn2 verwendet wird, unterstreicht, dass direkte Cre-Effekte keine Auswirkungen auf unsere Messergebnisse haben.

Was die kritische Frage anbelangt, ob die Ablation von Mfn2 in Herzmuskelzellen den engen räumlichen Kontakt zwischen SR und Mitochondrien verändert, also ob Mfn2 tatsächlich die beiden Organellen verlinkt, wie de Brito und Scorrano²⁹ postulierten, so könnten Unterschiede in der morphometrischen Analyse die negativen Ergebnisse Papanicolaou erklären. Hier wurde zur Abstandsmessung die Strecke zwischen dem Mittelpunkt eines T-Tubulus und der Mitochondrienmembran herangezogen, welche im Bereich von 150 nm liegt und keine signifikanten Unterschiede zwischen Mfn2-KO und Kontrolltieren aufwies.⁸⁵ Im Gegensatz dazu analysierten wir die Distanz zwischen dem jSR und den Mitochondrien, welche im Bereich von nur 15 nm liegt und einen sensitiveren Parameter zur Beurteilung der SR-Mitochondrien-Bindung darstellt. In diesen Messungen beobachteten wir eine Tendenz zur Weitung der Lücke zwischen SR- und Mitochondrienmembran in Mfn2-KO, verglichen mit Kontrolltieren.⁸⁵ Ein darüber hinaus wichtiger Parameter für die funktionelle Interaktion der beiden Organellen ist die tatsächliche Kontaktlänge zwischen jSR und Mitochondrien, welche in unseren Studien bei Mfn2-KO-Mäusen – nicht aber Mfn1-KO-Mäusen – um ca. 30% reduziert war, von Papanicolaou et al. allerdings nicht analysiert wurde. Da die SR-mitochondriale physikalische Kopplung vermutlich von mehreren Proteinspezies aufrechterhalten wird,³⁶ kann bei Ausschaltung eines dieser Linkerproteine (Mfn2) die verminderte Kontaktfläche mit oder ohne eine Spaltweitenänderung der verbleibenden Verbindungen einhergehen. Im Rahmen der Untersuchung solcher ultrastrukturellen Unterschiede deutet der wesentlich verminderte Gehalt von SR-spezifischen RyR in Mitochondrien-assoziierten Membranen (MAMs) aus Herzen von Mfn2-KO-Mäusen (verglichen mit Kontrollen und Mfn1-KO-Mäusen) auf eine mechanisch instabilere SR-mitochondriale Kopplung hin.

Die Kinetik der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme wird noch immer kontrovers diskutiert,^{21, 33, 71, 82} vorwiegend aufgrund der geringen Ca^{2+} -Affinität des MCU und diskrepanten Ergebnissen, die sich aus der Verwendung verschiedener Techniken ergeben. Während einige Autoren in Kardiomyozyten pulsatile mitochondriale Ca^{2+} -

Transienten („beat-to-beat“) beschreiben, beobachteten andere eine nur langsam ansteigende Ca^{2+} -Akkumulation während einer Amplituden- und/oder Frequenzerhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Transienten.^{19, 29, 63, 72} Die Existenz von RyR-assoziierten Ca^{2+} -Mikrodomänen und dem dadurch erleichtertem Ca^{2+} -Transfer zu Mitochondrien wurde aus Daten in permeabilisierten H9c2-Myotuben¹⁰⁷ und Kardiomyozyten¹⁰² abgeleitet. Bereits in früheren Untersuchungen verwendeten Maack et al. Computermodelle und elektrophysiologische Untersuchungen, um die Existenz von Ca^{2+} -Mikrodomänen zwischen eng verbundenen Mitochondrien und SR zu belegen. In diesen „hot spots“ kann Ca^{2+} in ausreichend hohen Konzentrationen (aufgrund begrenzter Diffusion) akkumulieren und somit trotz der geringen Affinität des MCU in Mitochondrien aufgenommen werden.^{60, 61, 69} Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Mfn2 eine kritische Strukturkomponente dieser Mikrodomänen ist und damit die Aufnahme des aus dem benachbarten jSR freigesetzten Ca^{2+} in die Mitochondrienmatrix reguliert. Die geschwächte Verbindung der beiden Organellen in Mfn2-KO-Kardiomyozyten führt zu gesteigerten cytosolischen Ca^{2+} -Amplituden, sowohl Stimulationsfrequenz- als auch Koffein-getriggert, wobei weder das Expressionsniveau am SR- Ca^{2+} -Zyklus beteiligter Proteine noch die Aktivität der Ca^{2+} -Wiederaufnahme in das SR (SERCA) oder die Ca^{2+} -Ausschleusung in den Extrazellulärraum (NCX) verändert sind.¹⁸ Die erhöhten $[\text{Ca}^{2+}]_c$ -Signale scheinen sich folglich weniger durch eine verstärkte Ca^{2+} -Akkumulation im SR oder den verminderten sarkolemmalen Ca^{2+} -Export als viel eher durch die verminderte mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme zu erklären.

Die vorrangige physiologische Bedeutung der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme besteht in der Stimulation der geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme des Krebszyklus zur Abstimmung von Energiebedarf und -angebot.^{6, 71} Tatsächlich waren in Mfn2-KO-Zellen der Redoxstatus von NAD(P)H/NAD(P)^+ und FADH_2/FAD sowie der Quotient aus NAD(P)H/FAD (als Index für das Gleichgewicht zwischen der Krebszyklus-abhängigen Reduktion und der Oxidation durch die Atmungskette) während β -adrenerger Stimulation in Richtung Oxidation verschoben, verglichen mit Kontroll-Kardiomyozyten. Darüber hinaus haben frühere Studien der Arbeitsgruppe gezeigt, dass die mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme während β -adrenerger Stimulation eine übermäßige mitochondriale ROS-Bildung verhindert, indem die NADPH-abhängige antioxidative Kapazität regeneriert wird.⁶⁰ Tatsächlich stieg die mitochondriale Superoxid-Produktion in Mfn2-KO-Myozyten innerhalb der ersten

Minute unter Isoprenalin leicht an, was mit der vermehrten Oxidation von NADPH (als Folge einer Fehlanpassung der Ca^{2+} -induzierten Reduktion an dessen ADP-induzierte Oxidation) zusammenhängen könnte.

Die Suppression des Mitofusin-Orthologs MARF in der Fruchtfliege *Drosophila* induziert eine Kardiomyopathie sowie die Fragmentierung von Mitochondrien in Kardiomyozyten.¹⁸ Die Induktion einer Kardiomyopathie kann hierbei durch die kardiale Über-Expression der Superoxiddismutase revidiert werden, die Mitochondrien-Fragmentierung jedoch nicht.³⁴ Diese Beobachtung und die Unterschiede zwischen den hier beschriebenen Mäusen mit kardialen Knockout von entweder Mfn1 oder Mfn2 und den in vorherigen Arbeiten untersuchten kardialen Mfn1/Mfn2-Doppel-Knockout-Mäusen unterstreichen die unterschiedlichen Rollen der beiden Mitofusine. Sowohl Mfn1 als auch Mfn2 fungieren als Mediatoren der mitochondrialen Fusion, allerdings besitzt nur Mfn2 eine zusätzliche Relevanz als Modulator der Ca^{2+} -Transmission zwischen SR und Mitochondrien sowie der Bioenergetik und ROS-Produktion. Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass Defekte in der räumlichen Organisation von Mitochondrien und SR, welche die mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme beeinträchtigen, auch zu myokardialen oxidativem Stress führen können.

Überalterte und geschädigte Mitochondrien sowie Mitochondrien mit morphologischen oder funktionellen Auffälligkeiten stellen eine zelluläre Quelle reaktiver Sauerstoffspezies dar. Die selektive Mitophagie dient als Form der Autophagie der Elimination solcher funktionsuntüchtiger Mitochondrien und damit dem Erhalt einer gesunden Mitochondrienpopulation innerhalb der Zelle.⁵⁷ Neuere Untersuchungen haben für Mfn2, über die Beteiligung an der mitochondrialen Fusion hinausgehend, auch eine Beteiligung an den Abbauprozessen funktionsuntüchtiger Mitochondrien gezeigt.¹⁹ Zur Einleitung des Mitophagieprozesses muss das entsprechende Mitochondrium zunächst als „irreparabel“ markiert werden (Ubiquitinierung), wofür die Interaktion der cytosolischen Ubiquitin-Ligase Parkin mit der mitochondrialen Kinase PINK1 notwendig ist. Diese PINK1-Parkin-Komplexbildung scheint Mfn2 als Protein der äußeren Mitochondrienmembran insofern zu moderieren, als Mfn2 – nach Phosphorylierung durch PINK1 – das cytosolische Parkin-Protein zu dem geschädigten Mitochondrium rekrutiert.¹⁹ In entsprechenden Experimenten führte die Ablation von Mfn2 in Mauskardiomyozyten

(postnataler kardialer Mfn2-KO wie in dieser Arbeit verwendet) über die gestörte Parkin-vermittelte Mitophagie zur Akkumulation morphologisch auffälliger Mitochondrien (elektronenmikroskopische Daten), was die funktionelle Beeinträchtigung der Zellatmung (verminderter O₂-Verbrauch) zur Folge hatte. In Myotuben der Fruchtfliege *Drosophila* führte der kardiale Mfn2-KO sogar zur Ausbildung einer dilatativen Kardiomyopathie.¹⁹ Demnach scheint Mfn2 als Parkin-Rezeptor auch für die Qualitätskontrolle innerhalb der kardialen Mitochondrienpopulation benötigt zu werden.¹⁹

Für die vorliegende Arbeit bedeuten diese Beobachtungen, dass im verwendeten Genmodell kardialer Mfn2-KO-Mäuse zwar eine Kompensation der Mfn2-Funktion im Hinblick auf die mitochondriale Fusion zu erwarten ist (durch weiterhin bestehende Expression und Funktion von Mfn1), allerdings die Mfn2-Beteiligung an Mitophagie-Prozessen von Mfn1 nicht übernommen wird. Somit könnte die vermehrte ROS-Produktion in Mfn2-KO-Myozyten auch auf der Akkumulation funktionell geschädigter (und aufgrund der reduzierten mitochondrialen Qualitätskontrolle nicht ausrangierter) Mitochondrien beruhen.

6.2 Schlussfolgerung und Ausblick

Die vorliegenden Ergebnisse stehen im Einklang mit dem Konzept, dass Mfn2 (nicht aber Mfn1) eine essentielle Komponente der physikalischen Verknüpfung zwischen den Membranen von SR und Mitochondrien in Mauskardiomyozyten darstellt. Mittels simultaner Messung des mitochondrialen und cytosolischen Ca^{2+} in „schlagenden“ Kardiomyozyten, Monitoring der Substrate für die oxidative Phosphorylierung sowie ROS-Messungen konnte gezeigt werden, dass eine Unterbrechung der SR-mitochondrialen Ca^{2+} -Kommunikation zu einer verminderten mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme führt und die bioenergetische Adaptation an eine Arbeitslasterrhöhung beeinträchtigt. Die Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass Mfn2 in Kardiomyozyten eine kritische Strukturkomponente der Kontaktpunkte zwischen SR und Mitochondrien darstellt und dass die Ca^{2+} -Mikrodomänen, welche durch eben diese Mfn2-vermittelte Anbindung aufrecht erhalten werden, im Myokard für die unmittelbare Anpassung der mitochondrialen Energieproduktion an den metabolischen Bedarf von essentieller Bedeutung sind.

Eine funktionstüchtige und effektive Ca^{2+} -Transmission zwischen SR und Mitochondrien scheint für die langfristige physiologische Organfunktion eine wichtige Rolle zu spielen. In den Zellexperimenten der vorliegenden Arbeit konnten in Mfn2-KO-Myozyten zunächst keine manifesten Funktionseinschränkungen hinsichtlich der Zellkontraktilität festgestellt werden, allerdings entwickeln Mfn2-KO-Mäuse im Alter von 16 Wochen eine dilatative Kardiomyopathie. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die erhöhte Neigung zur mitochondrialen ROS-Produktion (infolge verminderter Eliminationskapazität) bei Mfn2-KO-Mäusen liefern, denn oxidativem Stress wird eine kausale Beteiligung an der Entstehung sowie am Progress der chronischen Herzinsuffizienz zugeschrieben (siehe Kapitel 2.1.8).

In diesem Zusammenhang erscheint zur Behandlung der Herzinsuffizienz ein therapeutischer Ansatz sinnvoll, welcher auf die Stärkung antioxidativer Kapazitäten und die Hemmung prooxidativer Mechanismen abzielt. Allerdings führten klinische Studien, die kardiovaskuläre Vorteile durch Antioxidantien-Supplementation (z.B. Vitamin C und E) überprüften, bislang nicht zu befriedigenden Ergebnissen.¹¹⁹ Möglicherweise kann der ROS-Produktion in Kardiomyozyten je nach Entstehungsort, -zeitpunkt und -menge über die Aktivierung adaptiver Mechanismen

auch eine protektive Funktion zugeschrieben werden,^{58, 81, 114} was den Benefit reiner antioxidativer Wirkstoffe im Hinblick auf klinische Endpunkte schmälert.

Das synthetische Peptid SS-31 (Szeto-Schiller-Peptid 31) entfaltet seine Wirkung gezielt an der inneren Mitochondrienmembran. Dort bindet es selektiv an Cardiolipin, ein Phospholipid der IMM, welches für die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Cristaestruktur (Auffaltungen der IMM in die mitochondriale Matrix) verantwortlich ist und eine hohe Anfälligkeit für oxidativen Stress aufweist.¹⁰⁸ ROS-getriggert trägt Cardiolipin selbst zu einer vermehrten ROS-Produktion bei, indem es die Peroxidaseaktivität von Cytochrom c aktiviert. Durch die SS-31-Bindung an Cardiolipin wird diese Konversion von Cytochrom c abgewendet und der Elektronenfluss über die Atmungskette aufrechterhalten.¹¹ SS-31 verhindert also die vermehrte Bildung von ROS auf mitochondrialer Ebene und wäre als pharmakologischer Ansatzpunkt zur Progresslimitierung bei chronischer Herzinsuffizienz denkbar. In einigen experimentellen Herzinsuffizienz-Modellen erbrachte SS-31 bereits vielversprechende Ergebnisse.^{26, 27, 109} Aktuell befindet sich SS-31 (weitere Bezeichnungen: MTP-131 oder Bendavia) in der klinischen Phase-II-Erprobung bei Patienten mit ST-Hebungsinfarkt. Klinische Studien zur Wirksamkeit von SS-31 bei Herzinsuffizienz sind in Planung.¹⁰⁸

7. Literaturverzeichnis

1. Andrienko TN, Picht E, Bers DM (2009) Mitochondrial free calcium regulation during sarcoplasmic reticulum calcium release in rat cardiac myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology* 46:1027-1036
2. Aon MA, Cortassa S, Marban E, O'Rourke B (2003) Synchronized whole cell oscillations in mitochondrial metabolism triggered by a local release of reactive oxygen species in cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* 278:44735-44744
3. Aon MA, Cortassa S, O'Rourke B (2010) Redox-optimized ROS balance: a unifying hypothesis. *Biochimica et biophysica acta* 1797:865-877
4. Archer SL (2014) Mitochondrial fission and fusion in human diseases. *N Engl J Med* 370:1074
5. Archer SL (2010) The mitochondrion as a Swiss army knife: implications for cardiovascular disease. *Journal of molecular medicine* 88:963-965
6. Balaban RS (2009) Domestication of the cardiac mitochondrion for energy conversion. *Journal of molecular and cellular cardiology* 46:832-841
7. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120:483-495
8. Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, Plovanich M, Belcher-Timme CA, Sancak Y, et al. (2011) Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 476:341-345
9. Bers DM (2008) Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annual review of physiology* 70:23-49
10. Bers DM (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415:198-205
11. Birk AV, Liu S, Soong Y, Mills W, Singh P, Warren JD, et al. (2013) The mitochondrial-targeted compound SS-31 re-energizes ischemic mitochondria by interacting with cardiolipin. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 24:1250-1261

12. Bohm M, Maack C (2000) Treatment of heart failure with beta-blockers. Mechanisms and results. *Basic research in cardiology* 95 Suppl 1:115-24
13. Brookes PS (2004) Mitochondrial nitric oxide synthase. *Mitochondrion* 3:187-204
14. Campello S, Scorrano L (2010) Mitochondrial shape changes: orchestrating cell pathophysiology. *EMBO reports* 11:678-684
15. Chen H, Chan DC (2010) Physiological functions of mitochondrial fusion. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1201:21-25
16. Chen H, Chomyn A, Chan DC (2005) Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *The Journal of biological chemistry* 280:26185-26192
17. Chen H, McCaffery JM, Chan DC (2007) Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell* 130:548-562
18. Chen Y, Csordas G, Jowdy C, Schneider TG, Csordas N, Wang W, et al. (2012) Mitofusin 2-containing mitochondrial-reticular microdomains direct rapid cardiomyocyte bioenergetic responses via interorganelle Ca²⁺ crosstalk. *Circulation research* 111:863-875
19. Chen Y, Dorn GW, 2nd (2013) PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria. *Science* 340:471-475
20. Chen Y, Liu Y, Dorn GW, 2nd (2011) Mitochondrial fusion is essential for organelle function and cardiac homeostasis. *Circulation research* 109:1327-1331
21. Chikando AC, Kettlewell S, Williams GS, Smith G, Lederer WJ (2011) Ca²⁺ dynamics in the mitochondria - state of the art. *Journal of molecular and cellular cardiology* 51:627-631
22. Cortassa S, Aon MA, Marban E, Winslow RL, O'Rourke B (2003) An integrated model of cardiac mitochondrial energy metabolism and calcium dynamics. *Biophysical journal* 84:2734-2755

23. Cortassa S, O'Rourke B, Aon MA (2014) Redox-optimized ROS balance and the relationship between mitochondrial respiration and ROS. *Biochimica et biophysica acta* 1837:287-295
24. Csordas G, Renken C, Varnai P, Walter L, Weaver D, Buttle KF, et al. (2006) Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *The Journal of cell biology* 174:915-921
25. Csordas G, Varnai P, Golenar T, Roy S, Purkins G, Schneider TG, et al. (2010) Imaging interorganelle contacts and local calcium dynamics at the ER-mitochondrial interface. *Molecular cell* 39:121-132
26. Dai DF, Chen T, Szeto H, Nieves-Cintrón M, Kutyavin V, Santana LF, et al. (2011) Mitochondrial targeted antioxidant Peptide ameliorates hypertensive cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 58:73-82
27. Dai DF, Hsieh EJ, Chen T, Menendez LG, Basisty NB, Tsai L, et al. (2013) Global proteomics and pathway analysis of pressure-overload-induced heart failure and its attenuation by mitochondrial-targeted peptides. *Circulation Heart failure* 6:1067-1076
28. Dai DF, Johnson SC, Villarin JJ, Chin MT, Nieves-Cintrón M, Chen T, et al. (2011) Mitochondrial oxidative stress mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and Galphaq overexpression-induced heart failure. *Circulation research* 108:837-846
29. de Brito OM, Scorrano L (2008) Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456:605-610
30. De Stefani D, Raffaello A, Teardo E, Szabo I, Rizzuto R (2011) A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 476:336-340
31. Dedkova EN, Blatter LA (2013) Calcium signaling in cardiac mitochondria. *Journal of molecular and cellular cardiology* 58:125-133
32. Dedkova EN, Blatter LA (2009) Characteristics and function of cardiac mitochondrial nitric oxide synthase. *The Journal of physiology* 587:851-872

33. Dedkova EN, Blatter LA (2008) Mitochondrial Ca²⁺ and the heart. *Cell calcium* 44:77-91
34. Dorn GW, 2nd, Clark CF, Eschenbacher WH, Kang MY, Engelhard JT, Warner SJ, et al. (2011) MARF and Opa1 control mitochondrial and cardiac function in *Drosophila*. *Circulation research* 108:12-17
35. Dorn GW, 2nd, Maack C (2013) SR and mitochondria: calcium cross-talk between kissing cousins. *Journal of molecular and cellular cardiology* 55:42-49
36. Dorn GW, 2nd, Scorrano L (2010) Two close, too close: sarcoplasmic reticulum-mitochondrial crosstalk and cardiomyocyte fate. *Circulation research* 107:689-699
37. Drago I, De Stefani D, Rizzuto R, Pozzan T (2012) Mitochondrial Ca²⁺ uptake contributes to buffering cytoplasmic Ca²⁺ peaks in cardiomyocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:12986-12991
38. Eng J, Lynch RM, Balaban RS (1989) Nicotinamide adenine dinucleotide fluorescence spectroscopy and imaging of isolated cardiac myocytes. *Biophysical journal* 55:621-630
39. Fabiato A (1983) Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *The American journal of physiology* 245:C1-14
40. Floryk D, Houstek J (1999) Tetramethyl rhodamine methyl ester (TMRM) is suitable for cytofluorometric measurements of mitochondrial membrane potential in cells treated with digitonin. *Bioscience reports* 19:27-34
41. Garcia-Perez C, Hajnoczky G, Csordas G (2008) Physical coupling supports the local Ca²⁺ transfer between sarcoplasmic reticulum subdomains and the mitochondria in heart muscle. *The Journal of biological chemistry* 283:32771-32780
42. Garcia-Perez C, Schneider TG, Hajnoczky G, Csordas G (2011) Alignment of sarcoplasmic reticulum-mitochondrial junctions with mitochondrial contact points. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 301:H1907-1915
43. Giacomello M, Drago I, Bortolozzi M, Scorzeto M, Gianelle A, Pizzo P, et al. (2010) Ca²⁺ hot spots on the mitochondrial surface are generated by Ca²⁺

mobilization from stores, but not by activation of store-operated Ca^{2+} channels. *Molecular cell* 38:280-290

44. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of biological chemistry* 260:3440-3450

45. Guerrieri F, Lorusso M, Larosa D, Papa S (1973) [Action of oligomycin and uncouplers on proton translocation and energy transduction in the internal mitochondrial membrane]. *Bollettino della Societa italiana di biologia sperimentale* 49:959-964

46. Gunter TE, Gunter KK, Sheu SS, Gavin CE (1994) Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. *The American journal of physiology* 267:C313-339

47. Gunter TE, Pfeiffer DR (1990) Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *The American journal of physiology* 258:C755-786

48. Hayashi T, Martone ME, Yu Z, Thor A, Doi M, Holst MJ, et al. (2009) Three-dimensional electron microscopy reveals new details of membrane systems for Ca^{2+} signaling in the heart. *Journal of cell science* 122:1005-1013

49. Huser J, Blatter LA, Sheu SS (2000) Mitochondrial calcium in heart cells: beat-to-beat oscillations or slow integration of cytosolic transients? *Journal of bioenergetics and biomembranes* 32:27-33

50. Huss JM, Kelly DP (2005) Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance. *The Journal of clinical investigation* 115:547-555

51. Ingwall JS, Weiss RG (2004) Is the failing heart energy starved? On using chemical energy to support cardiac function. *Circulation research* 95:135-145

52. Ishihara N, Otera H, Oka T, Mihara K (2013) Regulation and physiologic functions of GTPases in mitochondrial fusion and fission in mammals. *Antioxidants & redox signaling* 19:389-399

53. J OU, Pan S, Sheu SS (2012) Perspectives on: SGP symposium on mitochondrial physiology and medicine: molecular identities of mitochondrial Ca^{2+}

influx mechanism: updated passwords for accessing mitochondrial Ca²⁺-linked health and disease. *The Journal of general physiology* 139:435-443

54. Kane LA, Youle RJ (2010) Mitochondrial fission and fusion and their roles in the heart. *Journal of molecular medicine* 88:971-979

55. Kass DA, Hare JM, Georgakopoulos D (1998) Murine cardiac function: a cautionary tail. *Circulation research* 82:519-522

56. Katz LA, Swain JA, Portman MA, Balaban RS (1989) Relation between phosphate metabolites and oxygen consumption of heart in vivo. *The American journal of physiology* 256:H265-274

57. Kim I, Rodriguez-Enriquez S, Lemasters JJ (2007) Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Archives of biochemistry and biophysics* 462:245-253

58. Kimura S, Zhang GX, Nishiyama A, Shokoji T, Yao L, Fan YY, et al. (2005) Role of NAD(P)H oxidase- and mitochondria-derived reactive oxygen species in cardioprotection of ischemic reperfusion injury by angiotensin II. *Hypertension* 45:860-866

59. Kirichok Y, Krapivinsky G, Clapham DE (2004) The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* 427:360-364

60. Kohlhaas M, Liu T, Knopp A, Zeller T, Ong MF, Bohm M, et al. (2010) Elevated cytosolic Na⁺ increases mitochondrial formation of reactive oxygen species in failing cardiac myocytes. *Circulation* 121:1606-1613

61. Kohlhaas M, Maack C (2010) Adverse bioenergetic consequences of Na⁺-Ca²⁺ exchanger-mediated Ca²⁺ influx in cardiac myocytes. *Circulation* 122:2273-2280

62. Kohlhaas M, Maack C (2013) Calcium release microdomains and mitochondria. *Cardiovascular research* 98:259-268

63. Kohlhaas M, Maack C (2011) Interplay of defective excitation-contraction coupling, energy starvation, and oxidative stress in heart failure. *Trends in cardiovascular medicine* 21:69-73

64. Liu T, O'Rourke B (2008) Enhancing mitochondrial Ca²⁺ uptake in myocytes from failing hearts restores energy supply and demand matching. *Circulation research* 103:279-288
65. Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, De Simone G, Ferguson TB, Flegal K, et al. (2009) Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 119:480-486
66. Lonn E, Yusuf S, Hoogwerf B, Pogue J, Yi Q, Zinman B, et al. (2002) Effects of vitamin E on cardiovascular and microvascular outcomes in high-risk patients with diabetes: results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy. *Diabetes care* 25:1919-1927
67. Lu X, Ginsburg KS, Kettlewell S, Bossuyt J, Smith GL, Bers DM (2013) Measuring local gradients of intramitochondrial [Ca²⁺] in cardiac myocytes during sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release. *Circulation research* 112:424-431
68. Lygate CA, Aksenitjevic D, Dawson D, ten Hove M, Phillips D, de Bono JP, et al. (2013) Living without creatine: unchanged exercise capacity and response to chronic myocardial infarction in creatine-deficient mice. *Circulation research* 112:945-955
69. Maack C, Cortassa S, Aon MA, Ganesan AN, Liu T, O'Rourke B (2006) Elevated cytosolic Na⁺ decreases mitochondrial Ca²⁺ uptake during excitation-contraction coupling and impairs energetic adaptation in cardiac myocytes. *Circ Res* 99:172-182
70. Maack C, Kartes T, Kilter H, Schafers HJ, Nickenig G, Bohm M, et al. (2003) Oxygen free radical release in human failing myocardium is associated with increased activity of rac1-GTPase and represents a target for statin treatment. *Circulation* 108:1567-1574
71. Maack C, O'Rourke B (2007) Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics. *Basic research in cardiology* 102:369-392
72. Mallat Z, Philip I, Lebreton M, Chatel D, Maclouf J, Tedgui A (1998) Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F₂α in pericardial fluid of patients with heart failure:

a potential role for in vivo oxidant stress in ventricular dilatation and progression to heart failure. *Circulation* 97:1536-1539

73. Michels G, Khan IF, Endres-Becker J, Rottlaender D, Herzig S, Ruhparwar A, et al. (2009) Regulation of the human cardiac mitochondrial Ca²⁺ uptake by 2 different voltage-gated Ca²⁺ channels. *Circulation* 119:2435-2443

74. Miyata H, Silverman HS, Sollott SJ, Lakatta EG, Stern MD, Hansford RG (1991) Measurement of mitochondrial free Ca²⁺ concentration in living single rat cardiac myocytes. *The American journal of physiology* 261:H1123-1134

75. Molkenkin JD, Robbins J (2009) With great power comes great responsibility: using mouse genetics to study cardiac hypertrophy and failure. *Journal of molecular and cellular cardiology* 46:130-136

76. Muftuoglu M, Mori MP, de Souza-Pinto NC (2014) Formation and repair of oxidative damage in the mitochondrial DNA. *Mitochondrion* 17:164-181

77. Mukhopadhyay P, Rajesh M, Yoshihiro K, Hasko G, Pacher P (2007) Simple quantitative detection of mitochondrial superoxide production in live cells. *Biochemical and biophysical research communications* 358:203-208

78. Murgia M, Giorgi C, Pinton P, Rizzuto R (2009) Controlling metabolism and cell death: at the heart of mitochondrial calcium signalling. *Journal of molecular and cellular cardiology* 46:781-788

79. Nakamura R, Egashira K, Machida Y, Hayashidani S, Takeya M, Utsumi H, et al. (2002) Probucol attenuates left ventricular dysfunction and remodeling in tachycardia-induced heart failure: roles of oxidative stress and inflammation. *Circulation* 106:362-367

80. Neubauer S, Horn M, Cramer M, Harre K, Newell JB, Peters W, et al. (1997) Myocardial phosphocreatine-to-ATP ratio is a predictor of mortality in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation* 96:2190-2196

81. Nickel A, Loffler J, Maack C (2013) Myocardial energetics in heart failure. *Basic research in cardiology* 108:358

82. O'Rourke B, Blatter LA (2009) Mitochondrial Ca²⁺ uptake: tortoise or hare? *Journal of molecular and cellular cardiology* 46:767-774
83. O'Rourke B, Cortassa S, Aon MA (2005) Mitochondrial ion channels: gatekeepers of life and death. *Physiology (Bethesda)* 20:303-315
84. Packer M, Coats AJ, Fowler MB, Katus HA, Krum H, Mohacsi P, et al. (2001) Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 344:1651-1658
85. Papanicolaou KN, Khairallah RJ, Ngoh GA, Chikando A, Luptak I, O'Shea KM, et al. (2011) Mitofusin-2 maintains mitochondrial structure and contributes to stress-induced permeability transition in cardiac myocytes. *Mol Cell Biol* 31:1309-1328
86. Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W, Lechleiter JD (2008) Chemical calcium indicators. *Methods* 46:143-151
87. Paucek P, Jaburek M (2004) Kinetics and ion specificity of Na⁽⁺⁾/Ca⁽²⁺⁾ exchange mediated by the reconstituted beef heart mitochondrial Na⁽⁺⁾/Ca⁽²⁺⁾ antiporter. *Biochimica et biophysica acta* 1659:83-91
88. Perocchi F, Gohil VM, Girgis HS, Bao XR, McCombs JE, Palmer AE, et al. (2010) MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca⁽²⁺⁾ uptake. *Nature* 467:291-296
89. Peskoff A, Langer GA (1998) Calcium concentration and movement in the ventricular cardiac cell during an excitation-contraction cycle. *Biophysical journal* 74:153-174
90. Ranieri M, Brajkovic S, Riboldi G, Ronchi D, Rizzo F, Bresolin N, et al. (2013) Mitochondrial fusion proteins and human diseases. *Neurology research international* 2013:293893
91. Ristow M, Zarse K (2010) How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: The concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis). *Experimental gerontology* 45:410-418

92. Rizzuto R, Brini M, Murgia M, Pozzan T (1993) Microdomains with high Ca²⁺ close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science* 262:744-747
93. Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, Fay FS, Fogarty KE, Lifshitz LM, et al. (1998) Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science* 280:1763-1766
94. Rizzuto R, Pozzan T (2006) Microdomains of intracellular Ca²⁺: molecular determinants and functional consequences. *Physiological reviews* 86:369-408
95. Robinson KM, Janes MS, Beckman JS (2008) The selective detection of mitochondrial superoxide by live cell imaging. *Nature protocols* 3:941-947
96. Robinson KM, Janes MS, Pehar M, Monette JS, Ross MF, Hagen TM, et al. (2006) Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:15038-15043
97. Rodrigo R, Prieto JC, Castillo R (2013) Cardioprotection against ischaemia/reperfusion by vitamins C and E plus n-3 fatty acids: molecular mechanisms and potential clinical applications. *Clinical science* 124:1-15
98. Sabbah HN, Sharov V, Riddle JM, Kono T, Lesch M, Goldstein S (1992) Mitochondrial abnormalities in myocardium of dogs with chronic heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology* 24:1333-1347
99. Sagan L (1967) On the origin of mitosing cells. *Journal of theoretical biology* 14:255-274
100. Scaduto RC, Jr., Grotyohann LW (1999) Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophysical journal* 76:469-477
101. Sedova M, Dedkova EN, Blatter LA (2006) Integration of rapid cytosolic Ca²⁺ signals by mitochondria in cat ventricular myocytes. *American journal of physiology Cell physiology* 291:C840-850

102. Sharma VK, Ramesh V, Franzini-Armstrong C, Sheu SS (2000) Transport of Ca²⁺ from sarcoplasmic reticulum to mitochondria in rat ventricular myocytes. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 32:97-104
103. Shintani-Ishida K, Inui M, Yoshida K (2012) Ischemia-reperfusion induces myocardial infarction through mitochondrial Ca²⁺ overload. *Journal of molecular and cellular cardiology* 53:233-239
104. Simmen T, Aslan JE, Blagoveshchenskaya AD, Thomas L, Wan L, Xiang Y, et al. (2005) PACS-2 controls endoplasmic reticulum-mitochondria communication and Bid-mediated apoptosis. *The EMBO journal* 24:717-729
105. Starling RC, Hammer DF, Altschuld RA (1998) Human myocardial ATP content and in vivo contractile function. *Molecular and cellular biochemistry* 180:171-177
106. Szabadkai G, Bianchi K, Varnai P, De Stefani D, Wieckowski MR, Cavagna D, et al. (2006) Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *J Cell Biol* 175:901-911
107. Szalai G, Csordas G, Hantash BM, Thomas AP, Hajnoczky G (2000) Calcium signal transmission between ryanodine receptors and mitochondria. *The Journal of biological chemistry* 275:15305-15313
108. Szeto HH (2014) First-in-class cardiolipin-protective compound as a therapeutic agent to restore mitochondrial bioenergetics. *British journal of pharmacology* 171:2029-2050
109. Szeto HH, Birk AV (2014) Serendipity and the discovery of novel compounds that restore mitochondrial plasticity. *Clinical pharmacology and therapeutics* 96:672-683
110. Takahashi A, Camacho P, Lechleiter JD, Herman B (1999) Measurement of intracellular calcium. *Physiological reviews* 79:1089-1125
111. Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology* 552:335-344

112. Turrens JF, Alexandre A, Lehninger AL (1985) Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Archives of biochemistry and biophysics* 237:408-414
113. van Berlo JH, Elrod JW, van den Hoogenhof MM, York AJ, Aronow BJ, Duncan SA, et al. (2010) The transcription factor GATA-6 regulates pathological cardiac hypertrophy. *Circulation research* 107:1032-1040
114. Vanden Hoek TL, Becker LB, Shao Z, Li C, Schumacker PT (1998) Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes. *The Journal of biological chemistry* 273:18092-18098
115. Wehrens XH, Marks AR (2004) Novel therapeutic approaches for heart failure by normalizing calcium cycling. *Nature reviews Drug discovery* 3:565-573
116. Wei AC, Liu T, Winslow RL, O'Rourke B (2012) Dynamics of matrix-free Ca²⁺ in cardiac mitochondria: two components of Ca²⁺ uptake and role of phosphate buffering. *The Journal of general physiology* 139:465-478
117. Weisser-Thomas J, Piacentino V, 3rd, Gaughan JP, Margulies K, Houser SR (2003) Calcium entry via Na/Ca exchange during the action potential directly contributes to contraction of failing human ventricular myocytes. *Cardiovascular research* 57:974-985
118. Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P (2000) Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 342:154-160
119. Zhang PY, Xu X, Li XC (2014) Cardiovascular diseases: oxidative damage and antioxidant protection. *European review for medical and pharmacological sciences* 18:3091-3096

8. Publikationen und Preise

Publikationen

Chen Y, Csordas G, Jowdy C, Schneider TG, Csordas N, Wang W, Liu Y, Kohlhaas M, **Meiser M**, Bergem S, Nerbonne JM, Dorn GW 2nd, Maack C (2012) ***Mitofusin 2-containing mitochondrial-reticular microdomains direct rapid cardiomyocyte bioenergetic responses via interorganelle Ca²⁺ crosstalk.*** Circulation research 111:863-875

Vorträge

“Mitofusin 2 tethers mitochondria to the sarcoplasmic reticulum and controls calcium transmission and mitochondrial redox state”

DGK-Jahrestagung, Mannheim (04/2012)

Frontiers in Cardiovascular Biology, ESC, London (03/2012)

Preise

Young Investigator Award

der European Society of Cardiology

Frontiers in Cardiovascular Biology, ESC, London (03/2012)

Rudi-Busse-Young Investigator Award

der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie

DGK-Jahrestagung, Mannheim (04/2012)

9. Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle denjenigen danken, die mir die Erstellung dieser Dissertation möglich gemacht haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Christoph Maack für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Beratung bei der Auswahl des Themas und die hervorragende Betreuung. Mit seiner Fähigkeit Begeisterung für wissenschaftliches Arbeiten zu wecken, ehrlichem Interesse am Fortschritt des Projektes und zahlreichen fachlichen Anregungen hat er meine Arbeit wesentlich vorangebracht.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. med. Michael Böhm für die Bereitstellung des kardiologischen Forschungslabors sowie die engagierte Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses.

Herrn Dr. rer. nat. Michael Kohlhaas danke ich für die Einarbeitung in die Methodik und die fachliche Hilfestellung bei der Durchführung und Auswertung der Experimente. Ebenso danke ich Frau Michelle Gulentz für die technische Unterstützung bei der Arbeit im Labor.

Mein Dank gilt ebenfalls den Kolleginnen und Kollegen der AG Maack für die stets gute Zusammenarbeit und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Schließlich möchte ich auch meiner Familie und besonders meinem Verlobten für die liebevolle Bestärkung und das Vertrauen in mich und meine Arbeit danken, welche maßgeblich zur Fertigstellung der vorliegenden Dissertation beigetragen haben.