

**Aus der medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Stefan Frantz

**Effekt von Mitofusin 2 Defizienz auf die IP₃-induzierte mitochondriale
Calciumregulation in Kardiomyozyten**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Christine Maria Gabriele Mages
aus Hof

Würzburg, November 2020

Referent: Prof. Dr. med. Christoph Maack

Koreferentin: Prof. Dr. rer. nat. Kristina Lorenz

Dekan: Prof. Dr. med. Mathias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 28.04.2021

Die Promovendin ist Ärztin

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Herzinsuffizienz.....	1
1.2 Physiologie der elektromechanischen Kopplung	3
1.3 Mitochondrialer Energiehaushalt	6
1.4 Die Entstehung und Elimination reaktiver Sauerstoffspezies.....	9
1.5 IP₃-Signalweg, Aufbau und Funktion des IP₃-Rezeptors	10
1.6 Calcium im Mitochondrium als Regulator zellulärer Funktionen	13
1.7 Mitochondriale Calcium-Mikrodomänen.....	16
1.8 Mitofusin 2 als Strukturprotein zwischen SR und Mitochondrium	18
1.9 Pathophysiologische Veränderungen bei Herzinsuffizienz.....	20
1.10 Zielsetzung der Arbeit.....	23
2 Materialien und Methoden	25
2.1 Geräte	25
2.2 Materialien	26
2.3 Puffer und Lösungen	31
2.3.1 Myozytenisolation.....	31
2.3.2 PCR-Lösungen.....	34
2.3.3 Proteinanalytische -Lösungen.....	35
2.3.4 Lösungen für Kofokalmikroskopie	37
2.4 Kardiomyozytenisolation.....	38
2.4.1 Versuchstiere	38
2.4.2 Herzisolation- und Perfusion an dem Langendorff-Apparat	39
2.4.3 Arbeitsplatz mit Langendorff-Apparatur.....	40
2.5 Molekularbiologischen Methoden	41
2.5.1 Genotypisierung mittels Polymerasekettenreaktion	41

2.5.2	Real Time PCR	44
2.5.3	Proteinanalytischer Nachweis des Knock-outs	45
2.6	Live Cell Imaging am Konfokalmikroskop.....	47
2.7	Graphische und statistische Auswertung.....	49
3	Ergebnisse.....	50
3.1	Molekularbiologischer Nachweis des Mfn2 KO im Tiermodell	50
3.2	Mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme in WT und Mfn2 KO Kardiomyozyten	51
3.3	Mitochondriale Membranpotential $\Delta\Psi_m$ in WT und Mfn2 KO Kardiomyozyten.....	53
3.4	Mitochondriale Superoxidproduktion $\bullet\text{O}_2^-$ in WT und Mfn2 KO Kardiomyozyten.....	57
3.5	Mitochondriale ATP-Gehalt in WT und Mfn2 KO Kardiomyozyten.....	59
4	Diskussion	62
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse und Modell des metabolischen IP_3 Signalwegs	62
4.2	Einordnung der Ergebnisse in den aktuellen Forschungskontext	64
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	75
6	Literaturverzeichnis	77
	Danksagung.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
	Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
$\cdot\text{O}^{\cdot-}$	Superoxidradikal
$\Delta\Psi_m$	Mitochondriales Membranpotenzial
2-APB	2-Aminodetoxydiphenylboturat
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AR	Adrenorezeptor
Ang II	Angiotensin II
ANT	Adenin Nukleotid Translokator
ATP	Adenosintriphosphat
Ca^{2+}	Calcium-Ion
CHF	engl. chronic heart failure (chronische Herzinsuffizienz)
CK	Creatinkinase
Cre	engl. cyclization recombination (Rekombinase)
CVD	engl. cardiovascular disease (Herz-Kreislauf-Erkrankungen)
DNA	engl. deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
ECC	engl. excitation-contraction coupling (elektromechanische Kopplung)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ET-1	Endothelin 1
ETC	engl. electron transport chain (Atmungskette)
FAD	Flavinadenindinukleotid (oxidierte Form)
FADH_2	Flavinadenindinukleotid (reduzierte Form)
FUNDC1	engl. FUN14 Domain containing 1
GTPase	Guanosintriphosphatase
grp75	engl. glucose related peptide 75
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
IP_3R	Inositoltriphosphat Rezeptor
ISO	Isoprenalin
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)
M	Molar
MAM	engl. mitochondria associated membranes
MCU	Mitochondrialer Ca^{2+} -Uniporter
mDNA	mitochondriale DNA
Mfn	Mitofusin
Myh6	engl. myosin heavy chain 6 (Myosin schwere Kette 6)
min	Minute
Mn^{2+}	Mangan-Ion
mNHE	mitochondrialer Na^{+} - H^{+} -Austauscher
mRyR1	mitochondrialer Ryanodinrezeptor 1
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
eNOS	endotheliale NO-Synthase
Nnt	mitochondriale NAD(P)-Transhydrogenase

nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
OMM	engl. outer mitochondrial membrane (äußere Mitochondrienmembran)
PACS-2	engl. phosphofurin acidic cluster sorting protein 2
PCr	Phosphokreatin
PCR	engl. polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PTPIP51	engl. Protein tyrosin phosphatase interacting protein 51
ROS	engl. reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
RT	Raumtemperatur
Ru360	Ruthenium Red 360
RyR2	Ryanodinrezeptor 2
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
TSPO	engl. transporter protein
VAPB	engl. vesicle-associated membrane protein associated protein B
VDAC	engl. voltage-dependent anion channel
vs.	versus
WHO	engl. world health organisation (Weltgesundheitsorganisation)
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Ätiologie der Herzinsuffizienz.....	2
Abb. 2: Mechanismen der elektromechanischen Kopplung und mitochondrialen Energetik in Herzmuskelzellen.....	4
Abb. 3: Überblick Interaktion elektromechanische Kopplung, mitochondriale Energetik und ROS-Produktion/Elimination.....	7
Abb. 4: Pathophysiologische Veränderungen bei Herzinsuffizienz und pharmakologische Ansatzpunkte	21
Abb. 5: Modifizierte Langendorff Perfusionsanlage zur enzymatischen Myozytenisolation	41
Abb. 6: Mfn2 Expressionslevel in WT und Mfn2 KO Myokardgewebe.....	50
Abb. 7: Mitochondriale Ca ²⁺ -Aufnahme in WT und Mfn2 KO Kardiomyozyten	52
Abb. 8: Mitochondriale Membranpotenzial $\Delta\Psi_m$ in WT und Mfn2 KO Kardiomyozyten	55
Abb. 9: Basale TMRM Fluoreszenz in WT und Mfn2 KO Kardiomyozyten	56
Abb. 10: Mitochondriale Superoxidproduktion in WT und Mfn2 KO Kardiomyozyten	58
Abb. 11: Mitochondriale ATP-Gehalt in WT und Mfn2 KO Kardiomyozyten.....	60
Abb. 12: Zusammenfassendes Modell des metabolischen IP ₃ Signalwegs.....	63
Abb. 13: Mitochondrialer Redoxstatus in Mfn2 KO Kardiomyozyten	73

1 Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz entwickelt sich zu einer modernen Epidemie. Kardiovaskuläre Erkrankungen (cardiovascular diseases, CVD) verursachten in einer weltweiten Betrachtung der Weltgesundheitsorganisation im Jahr 2015 schätzungsweise 17,7 Millionen Todesfälle, was etwa 31% aller globalen Todesfällen entspricht (WHO | Cardiovascular diseases (CVDs), 2017.). Bei Hochrechnungen der WHO auf das Jahr 2030 zeichnet sich ein steigender Trend dieser Zahlen bis auf über 23,6 Millionen Todesfällen pro Jahr ab. Sie stellen somit aktuell und wohl auch zukünftig die global führende Todesursache dar (Mendis *et al.*, 2011). Während bei vielen CVD die Prognose in den letzten Jahren deutlich verbessert werden konnte, sind die Fortschritte bei der Herzinsuffizienz ernüchternd (Braunwald, 2013). Mit einer Prävalenz von etwa 1-2% und einer Inzidenz von 5-10 pro 1000 Einwohnern pro Jahr ist die Herzinsuffizienz eine häufige Erkrankung und eine der häufigsten pathophysiologischen Entitäten der CVD (Ponikowski *et al.*, 2016; Roger, 2013; Roth *et al.*, 2015). Mit einer altersabhängig ansteigende Prävalenz der Herzinsuffizienz auf über 10% in der Altersgruppe über 70 Jahren stellt sie eine der häufigsten chronischen Erkrankungen der alternden Bevölkerung dar (Ponikowski *et al.*, 2016; van Riet *et al.*, 2016).

Bei einer krankheitsbezogenen Sterblichkeit von etwa 50% innerhalb von 5 Jahren nach Diagnosestellung ist die Prognose der Patienten mit Herzinsuffizienz schlecht und übertrifft damit viele maligne Tumorleiden (Farmakis *et al.*, 2016; Virani *et al.*, 2020). Zusätzlich wird die Herzinsuffizienz zukünftig durch den demographischen Wandel, längeres Leben mit der kardialen Grunderkrankung, verbesserte Sekundärprävention und effektivere Therapien an Relevanz gewinnen.

Die Herzinsuffizienz ist definiert als ein klinisches Syndrom, bei dem das Herz nicht mehr in der Lage ist, den Sauerstoffbedarf des Organismus zu decken (Kemp & Conte, 2012; Tanai & Frantz, 2015). Klinisch zeigen die Patienten oft den Symptomkomplex Dyspnoe, Leistungsminderung und eine Volumenüberladung, welche sich durch erhöhten Jugularvenendruck und periphere Ödeme zeigt.

Die Entstehungsmechanismen der Herzinsuffizienz sind vielfältig (Abbildung 1). Langjähriger Bluthochdruck (Hypertonus) führt oft in Kombinationen mit weiteren Risikofaktoren, wie etwa Diabetes mellitus, Übergewicht und Rauchen, zu der Entwicklung einer Koronaren Herzkrankheit (KHK) und wiederum in deren Folge zu einer Herzinsuffizienz. Diese pathogenetische Sequenz von Hypertonie und KHK ist in bis zu 66% aller Fälle festzustellen und die häufigste Ursache einer Herzinsuffizienz (Dunlay *et al.*, 2009; Lala & Desai, 2014). Daneben sind weitere kardiale Pathologien wie etwa Klappenerkrankungen oder verschiedene Formen der Myokarditis prädisponierend. Neben den kausalen Ursachen gibt es idiopathische Formen, deren Ursachen bislang nicht identifiziert werden konnten.

Myokardschaden	Extramyokardiale Ursachen
Ischämisch	Hypertension
Toxisch	Strukturelle Klappen- und Myokarddefekte
Immunologisch und Infektiös	Peri- und Endokardpathologien
Infiltrativ	O ₂ -Mangelzustände
Metabolisch	Volumenüberladung
Genetisch	Arrhythmien und Reizleitungsstörungen

Abb. 1: Ätiologie der Herzinsuffizienz

modifiziert nach (Ponikowski *et al.*, 2016)

Pathophysiologisch kommt es zu einer absoluten oder relativen Reduktion des Herzzeitvolumens oder zu dessen pathologischer Verteilung (Kemp & Conte, 2012; Tanai & Frantz, 2015). Unabhängig von der Ursache der Herzinsuffizienz erfolgen zunächst zahlreiche komplexe makro- und mikrostrukturelle, zelluläre und molekulare adaptative Veränderungen (kardiales Remodelling) (Heusch *et al.*, 2014). Diese erhalten die Herzfunktion initial aufrecht (kompensierte Herzinsuffizienz), münden aber schließlich in einen zunehmenden Verlust von Herzmuskelzellen und Fibrosierung des

Herzmuskelgewebes. Dies wiederum führt zu einer progredienten Beeinträchtigung der kardialen Pumpfunktion (dekompensierte Herzinsuffizienz)(Kemp & Conte, 2012; Tanai & Frantz, 2015).

Die zellulären und molekularen Mechanismen, die zur kardialen Dysfunktion und damit letztlich zur terminalen Herzinsuffizienz führen, sind trotz intensiver Forschungsarbeit der letzten Jahrzehnte nicht ausreichend verstanden.

1.2 Physiologie der elektromechanischen Kopplung

Das Herz besteht auf zellulärer Ebene aus einem komplexen, hoch-organisierten Verbund von verschiedenen Zellen, von denen die Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) die kontraktile Einheit darstellen (Abbildung 2). Ebenso ist die subzelluläre Architektur der Kardiomyozyten an die speziellen funktionellen Anforderungen angepasst. Im Zytosol der Kardiomyozyten liegen neben den zahlreichen kontraktile Myofilamenten eine große Anzahl von Mitochondrien, die in humanen Zellen ~35% des gesamten Zellvolumens ausmachen (Barth *et al.*, 1992; Pape *et al.*, 2014). Das sarkoplasmatische Retikulum (SR), als interner Calciumspeicher der Kardiomyozyten, formt ein durchgehendes Netzwerk durch die gesamte Herzmuskelzelle und besteht aus 2 Teilen: dem longitudinalen SR, welches die Myofilamente umgibt, und dem junktionalen SR (jSR), welches in enger Assoziation mit transversalen Einstülpungen des Sarkolemms (sog. T-Tubuli) spezielle Kompartimente bildet, die als Diaden bezeichnet werden. In den Diaden entstehen enge räumliche Kontaktstellen zwischen jSR, T-Tubuli und Myofilamenten, und diese stellen somit das strukturelle Korrelat der elektromechanischen Kopplung (excitation-contraction coupling, ECC) dar (Bers, 2001; Pape *et al.*, 2014).

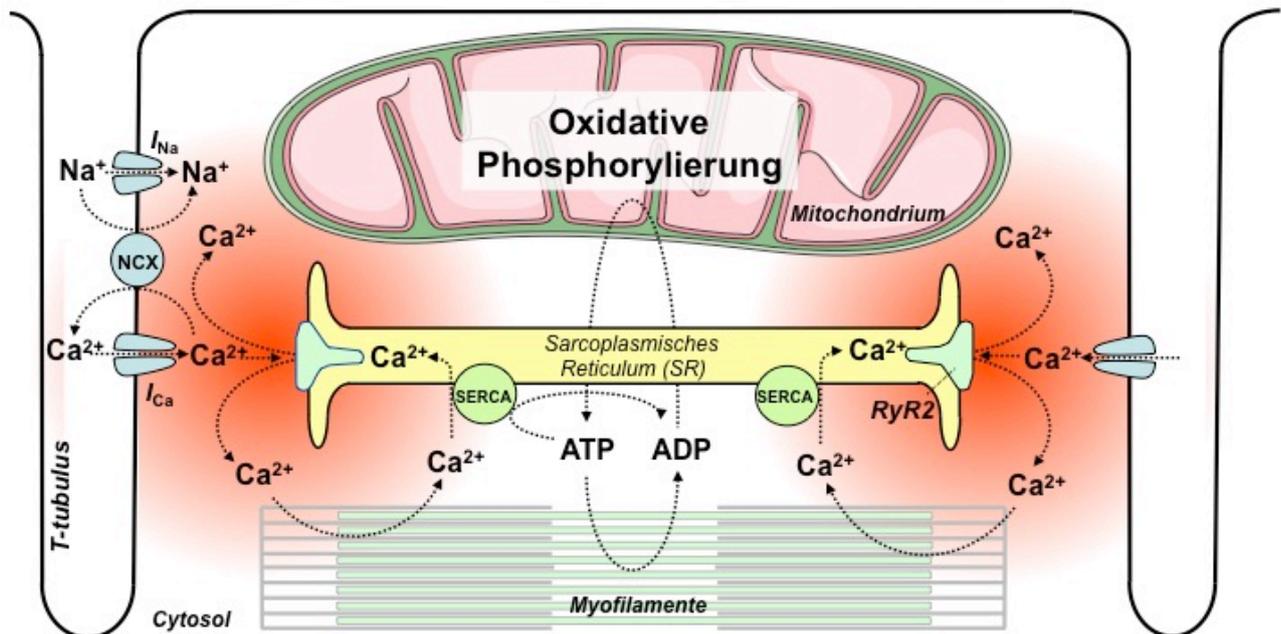


Abb. 2: Mechanismen der elektromechanischen Kopplung und mitochondrialen Energetik in Herzmuskelzellen

Transversal(T)-Tubulus, spannungsabhängiger Ca²⁺-(*I_{Ca}*) und Na⁺-Einstrom (*I_{Na}*), Sarkoplasmatisches Retikulum (SR), SR-Ca²⁺-ATPase (SERCA), Ryanodinrezeptor 2 (RyR2), Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP), modifiziert nach (Maack & O'Rourke, 2007)

Der Prozess der ECC beschreibt die Konversion eines elektrischen Stimulus in mechanische Kontraktion und die nachfolgende Relaxation (Abbildung 2). Calciumionen (Ca²⁺) übernehmen dabei eine zentrale Vermittlerrolle (Bers, 2001). Von den Erregungsleitungszellen des Herzens ausgehend breitet sich das Aktionspotenzial an der Zellmembran einer Herzmuskelzelle entlang in die T-Tubuli aus. Dort kommt es zunächst zur Aktivierung von spannungsabhängigen Natrium (Na⁺) Kanälen und einem frühen Natriumeinstrom (*I_{Na}*). Diese Depolarisation des Sarkolems wiederum führt zur Erregung spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle vom L-Typ (Dihydropyridinrezeptoren, LTCC) und es kommt zum Ca²⁺-Einstrom (*I_{Ca}*) aus dem Extrazellularraum. Durch diesen Einstrom von Ca²⁺ erfolgt die Öffnung der in direkter räumlicher Nähe liegenden Ca²⁺-sensitiven Ryanodinrezeptoren 2 (RyR2) auf dem SR. Über die RyR2 wird schließlich Ca²⁺ aus dem SR in das Zytosol freigesetzt, was auch als Ca²⁺-abhängige-Ca²⁺-Freisetzung bezeichnet wird („Calcium-induced Calcium release“, CICR) (Fabiato,

1983). Das so freigesetzte Ca^{2+} diffundiert an die spezifischen Bindungsstellen der Myofilamente und führt über das Auslösen einer Aktin-Myosin-Interaktion zu einer Kontraktion (Bers, 2001, 2002; Pape *et al.*, 2014).

Durch die CICR wird das externe Signal um ein vielfaches multipliziert und die globale zytosolische Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_c$ steigt von diastolischen Werten von ~ 100 nM auf systolische Spitzenwerte um $\sim 1-2$ μM an. Um die Öffnungsstellen der RyR2 steigt die $[\text{Ca}^{2+}]_c$ lokal auf bis zu 10 μM und bildet so Ca^{2+} -Mikrodomänen (Kohlhaas & Maack, 2013; Konstantinidis *et al.*, 2012; Rizzuto & Pozzan, 2006). Die Diaden sind das am besten beschriebene Beispiel solcher räumlich und zeitlich heterogener Verteilungen des zytosolischen Ca^{2+} innerhalb verschiedener Zellkompartimente (Maack & O'Rourke, 2007; Rizzuto & Pozzan, 2006).

Für die Relaxation in der Diastole muss die $[\text{Ca}^{2+}]_c$ wieder auf den Ausgangswert sinken, sodass Ca^{2+} von seinen Bindungsstellen abdiffundieren kann (Abbildung 2). Es existieren vier Wege, das Ca^{2+} aus dem Zytosol zu entfernen, die speziesspezifische Unterschiede in ihrer jeweiligen Beteiligung aufweisen (Bers, 2006). Zum einen erfolgt ein Großteil der Elimination (im Menschen $\sim 70\%$) durch energieabhängige Wiederaufnahme in das SR mittels einer Phospholamban-regulierten Ca^{2+} -ATPase (SERCA). Zum anderen kann das Ca^{2+} durch den sarkolemmalen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX; zu etwa 28%) bzw. energieabhängig die sarkolemmale Ca^{2+} -ATPase (ca. $1-2\%$) nach extrazellulär transportiert werden (Bers, 2001).

Während in früheren Arbeiten die Aufnahme von Ca^{2+} in Mitochondrien als diastolische Ca^{2+} Elimination betrachtet wurde (Beitrag: ca. 1%), wurde in späteren Arbeiten zunehmend klar, dass Mitochondrien Ca^{2+} während des Anstiegs des cytosolischen Ca^{2+} Transienten in der Systole aufnehmen (Maack & O'Rourke, 2007; Bertero & Maack, 2018). Über die Kinetik der Ca^{2+} -Aufnahme in das Mitochondrium in diesen Kontraktions-Relaxationszyklen ist in den letzten Jahren kontrovers diskutiert worden (Bers, 2001; Dedkova & Blatter, 2013; O'Rourke & Blatter, 2009).

Die Kontraktionskraft wird physiologisch über zwei Mechanismen reguliert: zum einen über eine Veränderung der Myofilamentsensitivität für Ca^{2+} oder zum anderen über eine

Beeinflussung der Höhe und/oder Dauer des zytosolischen Ca^{2+} Transienten (Bers, 2001, 2002). Um eine physiologische Anpassung der Herzmuskelleistung an Belastungssituationen zu gewährleisten, kommt es zu einer Ausschüttung der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin, die an β_1 -Adrenorezeptoren (AR) wirken. Am Sinusknoten führt diese β -adrenerge Stimulation zu einer Steigerung der Herzfrequenz (Chronotropie). In Ventrikelkardiomyozyten führt die β -adrenerge Stimulation dagegen über komplexe Phosphorylierungsprozesse gleichzeitig zu einer Steigerung des sarkolemmalen Ca^{2+} -Influx über die LTCC und einer Beschleunigung der Ca^{2+} -Effluxmechanismen über SERCA und NCX. Dies führt sowohl zu einer verbesserten Relaxation der Myofibrillen (Lusitropie) als auch zu einer verstärkten Kontraktionskraft (Inotropie) über eine erhöhte Amplitude des Ca^{2+} Transienten (Bers, 2001, 2002).

1.3 Mitochondrialer Energiehaushalt

Die Kardiomyozyten bringen 60-80% ihrer gesamten Stoffwechselaktivität für mechanische Arbeit auf (Nagoshi *et al.*, 2011; Pape *et al.*, 2014). Für die zyklisch ablaufenden Prozesse der ECC benötigen die Myokardzellen kontinuierlich große Mengen an Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP). Diese Energie wird zu über 90% durch oxidative Phosphorylierung innerhalb der Mitochondrien gewonnen (Gunter & Sheu, 2009; Weiss & Maslov, 2004). Daher spielen Mitochondrien im Myokard eine herausragende Rolle, indem sie diesen hohen energetischen Bedarf decken.

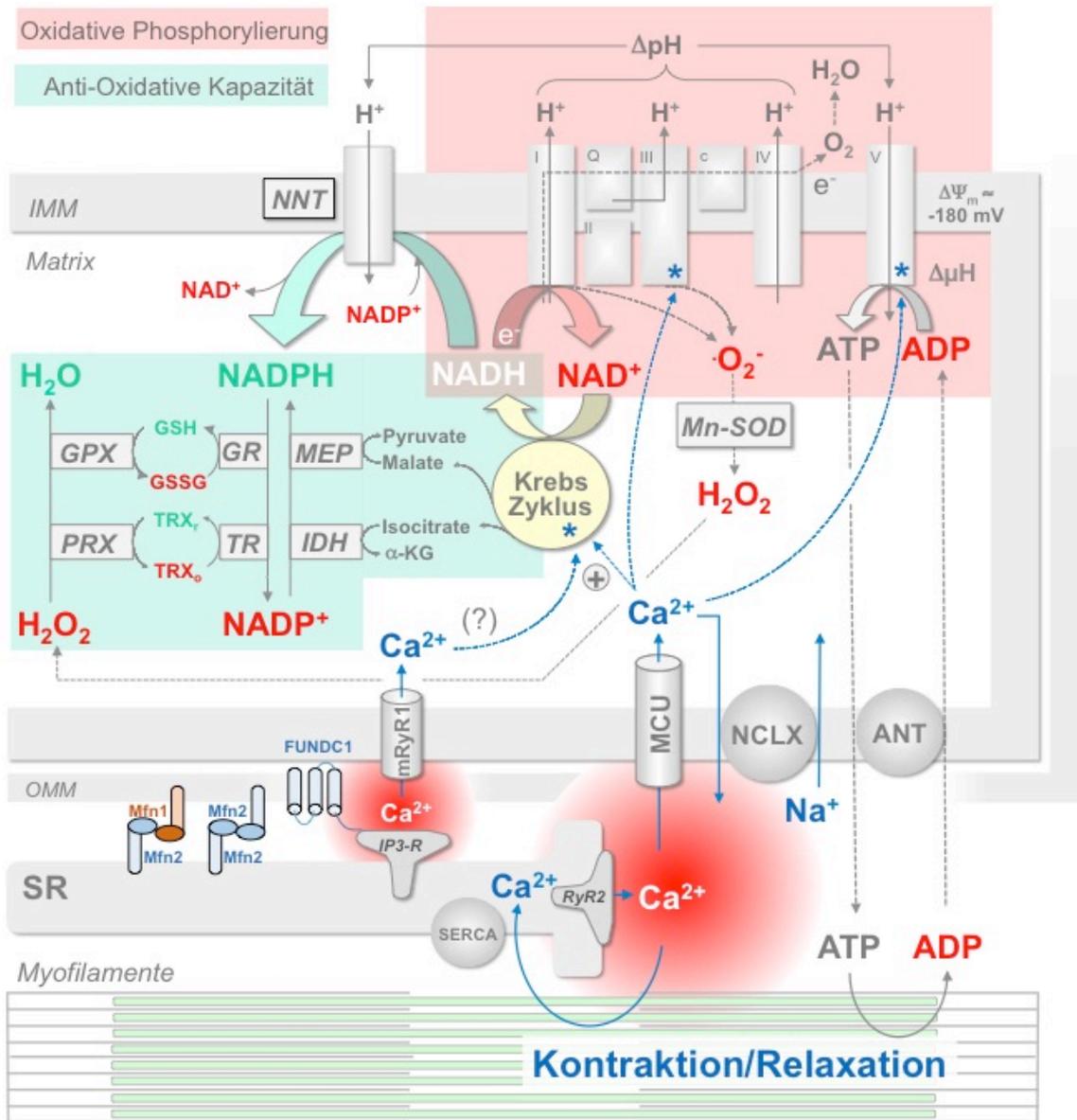


Abb. 3: Überblick Interaktion elektromechanische Kopplung, mitochondriale Energetik und ROS-Produktion/Elimination

Die Ca^{2+} -Aufnahme in das Mitochondrium geschieht über den mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter (MCU) sowie über den mitochondrialen Ryanodinrezeptor 1 (mRyR1). Ca^{2+} steigert den Metabolismus über die Stimulation von vier Schlüsselenzyme des in der Matrix gelegenen Krebszyklus (auch Zitratzyklus), sowie die Atmungskettenkomplexe III und IV der inneren Mitochondrienmembran (IMM). Der Krebszyklus regeneriert NADH für die oxidative Phosphorylierung der Atmungskette und NADPH für die Regeneration der an der ROS-Elimination beteiligten Enzyme. Mitofusin 1 bzw. 2 (Mfn1/Mfn2) in der äusseren Mitochondrienmembran (OMM) interagiert mit Mfn2 des sarkoplasmatischen Retikulum (SR) und stellt so die räumliche Verbindung her um eine Ca^{2+} Mikrodomäne (roter Bereich) zwischen den beiden Organellen entstehen zu lassen. α -Ketoglutarat (α -KG), Adenin Nukleotid Translokator (ANT), FUN14 domain containing 1 (FUNDC1), Glutathionperoxidase (GPX); Glutathionreduktase (GR), reduziertes/oxidiertes Glutathion (GSH/GSSG), Isocitratdehydrogenase (IDH), Malatdehydrogenase (MEP), Mn^{2+} -abhängige Superoxiddismutase (Mn-SOD), mitochondriale NAD(P)-Transhydrogenase

(NnT), $\text{N}^+/\text{Ca}^{2+}\text{Li}^{2+}$ permeable Austauscher (NCLX), Peroxiredoxin (PRX), reduziertes/oxidiertes Thioredoxin (TRXr/TRXo), Thioredoxinreduktase (TR), modifiziert nach (Bertero & Maack, 2018a)

In ihrer Matrix generieren die Mitochondrien mittels des Krebszyklus (auch Zitratzyklus genannt) die Redoxäquivalente NADH und FADH_2 (Abbildung 3). Diese geben ihre aufgenommenen Elektronen an den Komplexen I und III der Atmungskette (engl. Electron transport chain, ETC) der inneren Mitochondrienmembran (IMM) ab und führen so über eine Reihe nachgeschalteter Reduktions-/Oxidationsreaktionen zur Translokation von Protonen in den Intermembranraum (IMR). Dadurch wird ein Protonengradient (ΔpH) erzeugt, welcher zusammen mit dem elektrochemischen mitochondrialen Membranpotenzial ($\Delta\Psi_m$) die Triebkraft für die oxidative Phosphorylierung von Adenosindiphosphat (ADP) zu ATP durch die F_1/F_0 -ATP-Synthase darstellt (Kohlhaas *et al.*, 2017; Maack & O'Rourke, 2007; Pape *et al.*, 2014; Rich & Maréchal, 2010).

Bezogen auf das Organgewicht hat das Herz den höchsten metabolischen Umsatz des gesamten Körpers (Wang *et al.*, 2010). Abhängig von verschiedenen körperlichen und psychischen Belastungen ändert sich der kardiale Energiebedarf teilweise dramatisch und die Produktion muss stets dem aktuellen Bedarf angepasst werden. Deshalb ist für eine physiologische Herzfunktion ein koordiniertes intrazelluläres Energiemanagement von essentieller Bedeutung. Wichtige regulatorische Funktionen übernehmen dabei Ca^{2+} und ADP (Balaban, 2009a; Denton, 2009; Hüttemann *et al.*, 2007; Kohlhaas *et al.*, 2017; Maack & O'Rourke, 2007).

Bei einer physiologischen Arbeitslasterrhöhung durch β -adrenerge Stimulation verbrauchen die enzymatischen Vorgänge der ECC und die Transportprozesse am SR und dem Sarkolemm vermehrt Energie und beeinflussen damit die ATP/ADP-Homöostase in Richtung ADP. Das vermehrt anfallende ADP bewirkt eine Beschleunigung der ATP-Produktion an der F_1F_0 -ATP-Synthase unter Ausnutzung des ΔpH . Kompensatorisch kommt es zu einer vermehrten Elektronenabgabe durch die Redoxäquivalente NADH und FADH_2 an die Atmungskette, was die Regeneration von ΔpH und die Netto-Oxidation von NADH und FADH_2 zur Folge hat (Bertero & Maack, 2018a; Kohlhaas *et al.*, 2017; Maack & O'Rourke, 2007). Ein weiterer Effekt der β -adrenergen Stimulation ist der

Amplituden- und Frequenzanstieg des zytosolischen Ca^{2+} -Transienten, welcher eine vermehrte Aufnahme von Ca^{2+} in das Mitochondrium zur Folge hat. Ca^{2+} hat in der mitochondrialen Matrix einen stimulierenden Effekt auf wichtige Schrittmacherenzyme des Krebszyklus und aktiviert zudem die F_1/F_0 -ATPase (Balaban, 2009b; Denton, 2009; Denton & McCormack, 1980; Tarasov *et al.*, 2012; Territo *et al.*, 2000). Durch die Aktivierung des Krebszyklus kommt es zur Regeneration des oxidierten NAD^+ zu NADH und führt so zu einem Gleichgewicht im Redoxstatus von NADH/NAD^+ und FADH_2/FAD auch unter erhöhter Arbeitslast.

Diese Zusammenhänge zeigen, welche elementare Rolle Ca^{2+} als Signalmolekül im Mitochondrium in der Regulation des kardialen Energiehaushaltes übernimmt. Deshalb sind auch die Mechanismen und die Kinetik der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme entscheidend für das Verständnis des zellulären Energiehaushalts.

1.4 Die Entstehung und Elimination reaktiver Sauerstoffspezies

Mitochondrien sind zusätzlich die Hauptproduzenten reaktiver Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species, ROS), welche als Nebenprodukt der oxidativen Phosphorylierung an den Atmungskettenkomplexen I und III anfallen (Murphy, 2009) (Abbildung 3). ROS umfassen alle toxischen Zwischenprodukte bei der Reduktion von Sauerstoff (O_2) zu Wasser (H_2O), wie etwa Superoxidanionen ($\bullet\text{O}_2^-$) oder Hydrogenperoxid (H_2O_2). ROS sind in einem gewissen Maß physiologisch und können durch komplexe enzymatische Schritte entgiftet werden. Bei übermäßiger Produktion oder verminderter Elimination resultiert oxidativer Stress, wobei es zu oxidativen Schäden an Proteinen und Enzymen der Matrix sowie der mitochondrialen DNA kommt (Bertero & Maack, 2018a; Kohlhaas *et al.*, 2017; Murgia *et al.*, 2009; Murphy, 2009; Shadel & Horvath, 2015).

Zur Entgiftung dieser potenziell zellschädigenden Substanzen verfügen Zellen über eine Reihe verschiedener Enzyme, die jeweils Reduktionsäquivalente bereitstellen. $\bullet\text{O}_2^-$, als initial anfallende ROS, werden von der Mangan-abhängigen Superoxid-Dismutase (Mn-SOD) zu H_2O_2 umgesetzt, was wiederum durch Peroxiredoxin und die Thioredoxinreduktase weiter zu Wasser entgiftet wird. Als Redoxäquivalente dient dazu

NADPH, welches durch Enzyme des Krebszyklus (Isocitratdehydrogenase und NADP⁺-abhängiges Malatenzym) aus NADP⁺ regeneriert wird. Zusätzlich wird reduziertes NADPH durch die Nicotinamid-Nucleotid-Transhydrogenase (NNT) aus NADH hergestellt (Bertero & Maack, 2018a; Kohlhaas & Maack, 2011).

Der Krebszyklus übernimmt also zusätzlich eine Drehscheibenfunktion zur Regeneration von NADPH. Somit ist die Stimulation des Krebszyklus durch mitochondriales Ca²⁺ neben der Anpassung an Änderungen des Energiebedarfs, auch für die Vermeidung von oxidativem Stress relevant. Das Konzept des „Redox-optimierten ROS Gleichgewichts“ (engl. redox-optimized ROS balance), vorgeschlagen von Aon et al. (Aon *et al.*, 2010) stellt dabei das Redoxmilieu als zentrales Bindeglied zwischen mitochondrialer Zellatmung und ROS-Produktion. Ein ausgeglichener mitochondrialer Redoxstatus ist demzufolge essentiell, um eine optimale Energieausschöpfung zu gewährleisten und gleichzeitig oxidativen Stress zu vermeiden (Aon *et al.*, 2010; Bertero & Maack, 2018a; Cortassa *et al.*, 2014).

1.5 IP₃-Signalweg, Aufbau und Funktion des IP₃-Rezeptors

Der ECC liegt die Ca²⁺-Freisetzung aus dem SR über den RyR2 zu Grunde. Ein zusätzlicher Weg, Ca²⁺ aus dem SR ins Zytosol freizusetzen, führt über den Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor (IP₃R) (Foskett *et al.*, 2007; Kockskämper *et al.*, 2008). Dieser führt nach Bindung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) zum Ca²⁺-Ausstrom aus dem SR. IP₃ entsteht durch die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) durch das Enzym Phospholipase C (PLC). Externe Stimuli, die die PLC aktivieren, sind unter anderem die G_q-gekoppelte Membranrezeptoren von Hormonen wie Endothelin-1 (ET-1) oder Angiotensin II (AngII) (Kockskämper *et al.*, 2008).

Es existieren drei verschiedene Isoformen des IP₃R (1-3), deren Expression zwischen unterschiedlichen Spezies, Geweben und Zellkompartimenten variiert (Bezprozvanny, 2005; Foskett *et al.*, 2007). Im Ventrikelmyokard werden alle drei Isoformen exprimiert, mit einem Überwiegen des Typ 2 IP₃R (Bers, 2001; Kockskämper *et al.*, 2008; Seidlmayer *et al.*, 2016). Warum es zu der Expression verschiedener Formen kommt und ob die Isoformen unterschiedliche Funktionen haben, ist allerdings unklar.

In nicht erregbaren Zellen stellen die IP₃R die häufigsten Ca²⁺-Freisetzungskanäle dar. In erregbaren Zellen, wie Kardiomyozyten, kommen die IP₃R auf dem SR ca. 5-80 mal (die große Spanne erklärt sich aus spezieabhängigen Unterschieden) seltener vor als die RyR2 (Kockskämper *et al.*, 2008). Somit sind die IP₃ vermittelten Ca²⁺ Signale im Vergleich zu den RyR2 vermittelten Signalen bei der ECC sehr klein, ca. 20 bis 25% eines durchschnittlichen ECC Ca²⁺-Signals. Diese Ca²⁺-Freisetzungen aus einzelnen IP₃R („Ca²⁺-blips“) oder IP₃R-Gruppen („Ca²⁺-puffs“) haben eine gänzlich andere Kinetik als die RyR2-vermittelten Ca²⁺-Signale („Ca²⁺-sparks“). Die IP₃R vermittelten Signale zeigen eine etwa halb so schnelle Anstiegsgeschwindigkeit, eine geringere Amplitude und sind etwa dreimal langanhaltender (Kockskämper *et al.*, 2008; Zima & Blatter, 2004). Zwar konnten sowohl in atrialen Kardiomyozyten als auch in Ventrikelmyozyten funktionelle IP₃R vermittelte Signale nachgewiesen werden (Domeier *et al.*, 2008; Kockskämper *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2005; Lipp *et al.*, 2000; Zima & Blatter, 2004), diese wurden allerdings oft mit pathologischen Situationen assoziiert. Die physiologische Funktion dieser IP₃-medierten Ca²⁺-Signale des SR ist in ventrikulären Herzmuskelzellen bislang nicht vollständig geklärt.

Da die IP₃R Ca²⁺ aus dem SR freisetzen, beeinflussen sie die zelluläre Ca²⁺-Homöostase. Das geschieht differenziert in verschiedenen Zellkompartimenten. Zum einen steigern sie im Zytoplasma den systolischen Calciumtransienten langfristig durch die zusätzliche Freisetzung von Ca²⁺ aus dem SR, allerdings ohne dabei den SR Calciumgehalt zu reduzieren (Domeier *et al.*, 2008; Kockskämper *et al.*, 2008; Lipp *et al.*, 2000; Proven *et al.*, 2006). Dadurch hat die Aktivierung der IP₃R eine von der β -adrenergen Stimulation unabhängige positiv inotrope Wirkung (Li *et al.*, 2005; Lipp *et al.*, 2000). Zum anderen kamen eine Vielzahl von Studien zu dem Schluss, dass die IP₃R-vermittelten Signale eher pathologische Funktionen haben und arrhythmogen wirken (Kockskämper *et al.*, 2008). So können diese IP₃ vermittelten Signale wahrscheinlich über eine unkoordinierte Aktivierung von in Nachbarschaft gelegenen RYR2 das Risiko für Arrhythmien steigern (Kockskämper *et al.*, 2008; Proven *et al.*, 2006; Wullschleger *et al.*, 2017). In einem mathematischen Modell von murinen Vorhofkardiomyozyten wurde bei Stimulation mit ET-1 eine basale IP₃-Konzentration von ~15 nM bis auf ein Maximum von ~35 nM innerhalb von ~400 sec berechnet, welche nach Beendigung der Stimulation innerhalb 30

min etwa auf das Ausgangsniveau zurückkehrte (Cooling *et al.*, 2007). Diese Berechnungen deckten sich auch mit Beobachtungen aus tierexperimentellen Messungen (Jiang *et al.*, 1996). Die relativ langsame Kinetik, sowohl von IP₃-Signalen als auch den daraus resultierenden Ca²⁺-Signalen in erregbaren Zellen, zusammen mit den multiplen Mechanismen zur Erhöhung der IP₃-Konzentration legt die Vermutung nahe, dass die IP₃-vermittelten Signale neben einer modulierenden Funktion auf die systolischen und diastolischen Ca²⁺-Transienten der ECC (Lipp *et al.*, 2000) eine andere physiologische Funktion übernehmen.

Die IP₃R vermittelten Ca²⁺-Signale wirken auch auf benachbarte Mitochondrien. In nichterregbaren Zellen ist diese Interaktion gut untersucht und es konnte eine IP₃R-vermittelte Steigerung des mitochondrialen Metabolismus gezeigt werden (Cárdenas *et al.*, 2010; Kockskämper *et al.*, 2008; Rapizzi *et al.*, 2002; Rizzuto *et al.*, 1993; Rizzuto & Pozzan, 2006). In kardialen Myozyten ist die Bedeutung von IP₃-vermittelten Ca²⁺-Signalen auf die Mitochondrien hingegen aktuell unklar. Lu *et al.* (Lu *et al.*, 2010) untersuchte den Einfluss von IP₃R vermittelten Ca²⁺ Signalen in permeabilisierten neonatalen Kardiomyozyten der Ratte in einem Hypoxie/Reperfusionsmodell. Hier führte eine Aktivierung der IP₃R zu einem Anstieg des mitochondrialen Ca²⁺, allerdings auch gleichzeitig zu einer Abnahme des mitochondrialen Membranpotenzials und einer Aktivierung von apoptotischen Stimuli (Lu *et al.*, 2010). Dies deutet auf eine IP₃R vermittelte Signalkaskade im Rahmen von kardialen Pathologien hin, aber lässt auch auf eine privilegierte Kommunikation zwischen SR und Mitochondrien schließen. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnten zur Klärung dieser Frage entscheidend beitragen, indem die Verbindung von IP₃R-vermittelten Signalen mit einem gesteigerten mitochondrialen Metabolismus in kardialen Ventrikelmiozyten gezeigt werden konnte (Seidlmayer *et al.*, 2016).

IP₃R formen in nicht-erregbaren Zellen makromolekulare Komplexe mit einer Vielzahl von Interaktionspartnern, welche regulativen Einfluss auf die Funktion besitzen (Foskett *et al.*, 2007; Kockskämper *et al.*, 2008; Prole & Taylor, 2016; Rapizzi *et al.*, 2002). In Kardiomyozyten konnte bislang lediglich die CaMKII (Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Protein Kinase II) und FUNDC1 (FUN14 domain containing 1) als solcher Interaktionspartner identifiziert werden (Bare *et al.*, 2005; Kockskämper *et al.*, 2008; Wu

et al., 2017). Diese Beobachtung legt aber nahe, dass es in Kardiomyozyten mit den verhältnismäßig kleinen IP₃R-vermittelten Ca²⁺-Signalen im Vergleich zu den Ca²⁺-sparks der ECC weitere Mechanismen gibt, die zu einer räumlich-zeitlichen Differenzierung beitragen.

1.6 Calcium im Mitochondrium als Regulator zellulärer Funktionen

Der streng regulierte Calciumhaushalt der Kardiomyozyten ergibt sich durch die zahlreichen verschiedenen Funktionen der Ca²⁺-Signale. Neben der ECC übernimmt Ca²⁺ als „second messenger“ (sekundärer Botschafter) eine Rolle als Signalmolekül und reguliert entscheidend zelluläre Funktionen wie etwa Enzymaktivitäten, Metabolismus, Wachstum, Differenzierung, Zelltod und nukleäre Gentranskription und –translation (Berridge *et al.*, 2000). Die Mitochondrien übernehmen eine Schlüsselrolle vor allem bei Metabolismus und Zelltod (Bers & Guo, 2005; Ljubojevic & Bers, 2015; McBride *et al.*, 2006).

Im Mitochondrium bewirkt Ca²⁺ über die Stimulation der Krebszyklus-Dehydrogenase einerseits eine gesteigerte NADH und FADH₂ Verfügbarkeit für die Atmungskette und reguliert die oxidative Phosphorylierung. Funktionell entsteht somit über die mitochondriale Ca²⁺-Aufnahme die Kopplung des aktuellen Energiebedarfs an die Energieproduktion. Andererseits erhält mitochondriales Ca²⁺ über die Krebszyklus-abhängigen Regeneration von NADPH die antioxidative Kapazität der Herzmuskelzellen (Kohlhaas *et al.*, 2017).

Exzessive mitochondriale Ca²⁺-Aufnahme und Akkumulation birgt jedoch das Risiko der Aktivierung der mPTP (engl. mitochondrial Permeability Transition Pore). Die Öffnung dieser Pore kann zu einer irreversiblen Dissipation des $\Delta\Psi_m$, Behinderung der mitochondrialen Energieproduktion und schlussendlich zum Zelltod führen. Weiterer Aktivator der mPTP sind etwa oxidativer Stress und anorganische Polyphosphate (Dedkova & Blatter, 2013; O'Rourke *et al.*, 2005; Seidlmayer *et al.*, 2012). Um die Aktivierung der mPTP durch mitochondriale Ca²⁺-Überladung hinauszuzögern, existieren eine Reihe statische und dynamische Phosphat-abhängige Ca²⁺-Puffersysteme (Wei *et al.*, 2012). Mitochondrien stehen also im Zentrum der Regulation zellulärer

Funktionen und sind essentiell für das Leben und Überleben der gesamten Zelle (Bers & Guo, 2005; McBride *et al.*, 2006; Murgia *et al.*, 2009).

Die mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme über die IMM geschieht passiv unter Ausnutzung des elektrochemischen Gradienten des mitochondrialen Membranpotenzials ($\Delta\Psi_m \approx -180\text{mV}$). Inwiefern sich die Ca^{2+} -Aufnahme und -abgabe des Mitochondriums in ihrer Kinetik während der ECC gestaltet, d.h., langsam/kumulativ oder schnell/pulsatil, ist Gegenstand aktueller Diskussionen (Dedkova & Blatter, 2013; Gunter & Sheu, 2009; O'Rourke & Blatter, 2009).

Um in die mitochondriale Matrix zu gelangen, passiert Ca^{2+} zunächst einen unselektiven Aufnahmekanal der äußeren Mitochondrienmembran, den VDAC (Voltage dependent Anion Chanel) (Dedkova & Blatter, 2013; Shoshan-Barmatz *et al.*, 2008; Williams *et al.*, 2013). Bislang wurden eine Vielzahl von mitochondrialen Aufnahmemechanismen über die IMM beschrieben (Dedkova & Blatter, 2013; Williams *et al.*, 2013). Der mitochondriale Calcium Uniporter Komplex (MCU) ist davon der am besten charakterisierte Mechanismus der Ca^{2+} -Aufnahme und wird als primärer Mechanismus der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme angesehen (Bertero & Maack, 2018a; Dedkova & Blatter, 2013; Gunter & Sheu, 2009; Kirichok *et al.*, 2004; Mishra *et al.*, 2017). Der MCU besitzt trotz einer hohen Spezifität eine geringe Affinität zu Ca^{2+} und eine hohe Halbaktivierungskonstante (K_m) von $\sim 19\text{ mM Ca}^{2+}$ (Kirichok *et al.*, 2004). Um diese relativ unvorteilhaften Eigenschaften in Bezug auf die systolischen/diastolische $[\text{Ca}^{2+}]_c$ mit der nötigen Aufnahme von Ca^{2+} in das Mitochondrium zu erklären, etablierte sich die Theorie der Mikrodomäne, also lokalisierten Arealen mit höherer $[\text{Ca}^{2+}]$ (Chen *et al.*, 2012; Giacomello *et al.*, 2010; Kohlhaas & Maack, 2013; Rizzuto *et al.*, 1993; Rizzuto & Pozzan, 2006). Obwohl der MCU als Weg des Ca^{2+} -Influx in das Mitochondrium lange bekannt ist, herrscht weiterhin Uneinigkeit über seine genaue Zusammensetzung, seinen physiologischen Nutzen und die Kinetik der Ca^{2+} -Aufnahme (Bertero & Maack, 2018a; Mishra *et al.*, 2017). Es existieren eine Reihe von verschiedenen MCU KO Modellen, allerdings zeigen diese Tiere unter basalen Bedingungen überraschenderweise keinen pathologischen Phänotyp (Bertero & Maack, 2018a; Kwong *et al.*, 2015; Luongo *et al.*, 2015; Pan *et al.*, 2013). Unter β -adrenerger Stimulation mit Isoproterenol (ISO) zeigte

sich im Vergleich mit Wildtypen lediglich eine verzögerte metabolische Reaktion und eine initial verminderte Kontraktilität (Luongo *et al.*, 2015). In einem anderen murinen MCU KO Modell zeigten die Tiere ebenfalls unter Ruhebedingungen keine Auffälligkeiten, konnten aber in einem experimentellen Aufbau erst nach einer deutlich verlängerten Aufwärmphase die gleichen Leistungen im Sprintversuch erbringen als die Kontrolltiere und wiesen bioenergetische Defizite auf (Kwong *et al.*, 2015). Sowohl in computergestützten Simulationen (Tewari *et al.*, 2014), als auch in Patch-Clamp Untersuchungen an isolierten humanen Mitochondrienmembranen (Wei *et al.*, 2012) wurden mindestens zwei verschiedene Ca^{2+} -Aufnahmewege detektiert, die unterschiedliche kinetische, biochemische und pharmakologische Eigenschaften haben. Zusammen genommen lässt das vermuten, dass das via MCU aufgenommene Ca^{2+} eine Rolle für die metabolische Anpassung an akute Belastungssituationen hat, es darüber hinaus aber noch weitere mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahmemechanismen geben muss.

Ein weiterer mitochondrialer Ca^{2+} -Aufnahmekanal ist der mitochondriale Ryanodinrezeptor (mRyR1) (Altschafel *et al.*, 2007; Beutner *et al.*, 2001, 2005; Dedkova & Blatter, 2013; Gunter & Sheu, 2009). Seine biochemischen, pharmakologischen und funktionellen Eigenschaften ähneln dem Ryanodinrezeptor 1 (RyR1) des Skelettmuskels (Beutner *et al.*, 2001, 2005). Der mRyR1 (wie auch der RyR1) wird bei geringen $[\text{Ca}^{2+}]_c$ von 1-10 μM aktiviert und durch Konzentrationen von 1-10 mM inaktiviert (Fill & Copello, 2002). In Untersuchungen an kardialen Mitochondrien von RyR1-defizienten Mäusen zeigte sich ein deutlich reduzierter respiratorischer Quotient (Respiratory Control Index) als Indikator der verminderten mitochondrialen Funktion (Beutner *et al.*, 2005). In einer Arbeit von O-Uchi *et al.* (O-Uchi *et al.*, 2013) in kardialen H9c2 Myoblasten führte eine Überexpression von mRyR1 zur vermehrten mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme mit konsekutiv erhöhter ATP Produktion. Zusammengenommen sind dies Hinweise auf eine Beteiligung des mRyR1 an der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme, wobei die physiologische Funktion und Relevanz weiterhin unklar bleiben. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass dem mRyR1 eine Rolle in der metabolischen Kopplung der Herzmuskelzellen an ihren basalen Energiebedarf zukommt (Seidlmayer *et al.*, 2016).

Der mitochondriale Ca^{2+} Efflux über die IMM erfolgt primär über den Natrium/Calcium-Lithium permeablen Austauscher (NCLX) (Bertero & Maack, 2018a; Dedkova & Blatter, 2013; Palty *et al.*, 2012). Der NCLX arbeitet elektrogen, das bedeutet, um ein Ca^{2+} -Ion aus der mitochondrialen Matrix auszuschleusen, werden drei Na^+ -Ionen aufgenommen. Da die Na^+ -Ausschleusung über die IMM durch den Na^+/H^+ -Austauscher (mNHE) im Austausch gegen H^+ erfolgt, kommt es zur Abschwächung von ΔpH . Daher ist die Ausschleusung von Ca^{2+} aus dem Mitochondrium energetisch ungünstig, da dies durch vermehrte Atmungskettenaktivität kompensiert werden muss. Durch die langsamere Kinetik des NCLX im Vergleich zu den Ca^{2+} -Aufnahmemechanismen kommt es bei β -adrenerger Stimulation zur Akkumulation von Ca^{2+} im Mitochondrium (Bertero & Maack, 2018a; Maack *et al.*, 2006). In Situationen mit erhöhtem intrazellulärem Na^+ , wie etwa bei Herzinsuffizienz, wird über den NCLX eine Ausschleusung von Ca^{2+} aus dem Mitochondrium begünstigt (Kohlhaas *et al.*, 2010; Maack *et al.*, 2006).

1.7 Mitochondriale Calcium-Mikrodomänen

Durch die hochorganisierte subzelluläre Architektur von Herzmuskelzellen entstehen strukturelle und funktionelle Beziehungen zwischen den verschiedenen Zellbestandteilen wie SR und Mitochondrien. Mitochondrien machen etwa 35% des Zellvolumens aus und sind dicht zwischen das tubuläre Netzwerk des SR gepackt, sodass enge Kontaktstellen zwischen SR und Mitochondrien entstehen (Barth *et al.*, 1992; Pape *et al.*, 2014). Die Breite dieser Kontaktstellen zwischen den Mitochondrien und dem SR wird auf Werte zwischen 10 und 50 nm geschätzt (Franzini-Armstrong, 2007; Sharma *et al.*, 2000). In neueren 3D-elektronentomographischen Auswertungen im Bereich der Diaden geht man sogar lediglich von einer Breite von 10-20 nm aus (Beikoghli Kalkhoran *et al.*, 2017).

Aufgrund dieser engen räumlichen Beziehung beeinflussen sich die beiden Organellen gegenseitig und es entsteht eine Ca^{2+} -Mikrodomäne, die die Kommunikation erleichtert (Dorn & Maack, 2013; Giacomello *et al.*, 2010; Hayashi *et al.*, 2009; Kohlhaas & Maack, 2013; Lu *et al.*, 2013; Pinali *et al.*, 2013; Rizzuto & Pozzan, 2006). Dabei scheinen die Ca^{2+} Signale durch die Amplitude und Kinetik der Ca^{2+} Transienten sowie ihr lokalzeitliches Auftreten kodiert zu sein (Bers & Guo, 2005; Lederer *et al.*, 2013) und es

kommt durch die lokale Erhöhung von $[Ca^{2+}]_c$ von ~ 100 nM auf ~ 30 μ M (sog. „ Ca^{2+} hot spots“) zur mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme (Dedkova & Blatter, 2013; Dorn & Maack, 2013). Diese Beobachtungen dienen als Erklärung, die niedrige Affinität des MCU zu überwinden und einen Teil der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme zu gewährleisten (Bertero & Maack, 2018a; Chen *et al.*, 2012; Kohlhaas & Maack, 2013; Sharma *et al.*, 2000).

Initial wurden das Konzept der Mikrodomäne an Nicht-Kardiomyozyten etabliert und für die IP_3R vermittelten Signale postuliert (Berridge *et al.*, 2000; Csordás *et al.*, 2006; Giacomello *et al.*, 2010; Rizzuto *et al.*, 1993; Rizzuto & Pozzan, 2006). Dabei wurde der Anteil an Mitochondrien, die an solchen Mikrodomänen teilnehmen, auf 30% geschätzt (Rizzuto *et al.*, 1998). Da aber in Kardiomyozyten durch den dynamischen Calciumhaushalt der ECC die IP_3R vermittelten Signale quantitativ in den Hintergrund treten, ist die physiologische Funktion dort unklar (Kockskämper *et al.*, 2008). Gerade in Kardiomyozyten ist deshalb die Vermutung naheliegend, dass auch hier die Mikrodomänen relevanten Einfluss nehmen, um zwischen den RyR2 und IP_3R vermittelten Signalen zu differenzieren.

Es gibt drei verschiedene Subpopulationen von Mitochondrien, die anhand ihrer Nähe zu den Ca^{2+} Freisetzungstellen eingeteilt werden. Die verschiedenen Subpopulationen sind von den Ca^{2+} -Signalen unterschiedlich stark betroffen und zeigen Unterschiede in Enzymaktivität, Form und Funktionalität (Hatano *et al.*, 2015; Hollander *et al.*, 2014; Lukyanenko *et al.*, 2009; Matlib *et al.*, 1978; McMillin-Wood *et al.*, 1980; Palmer *et al.*, 1985; Suh *et al.*, 2003). Um den Zellkern herum angeordnet befinden sich die perinukleären Mitochondrien (PNM). Direkt unterhalb der Zellmembran liegen die subsarkolemmalen Mitochondrien (SSM) und interfibrilläre Mitochondrien (IFM) liegen dicht gepackt zwischen den Myofilamenten.

In Ergänzung dieser rein örtlichen Nähe zwischen SR und Mitochondrien zeigten sich in verschiedenen elektronenmikroskopischen Aufnahmen wiederholt strukturelle Kopplungen, deren molekulare Identität nicht abschließend geklärt ist (Csordás *et al.*, 2006; García-Pérez *et al.*, 2011; Hayashi *et al.*, 2009).

1.8 Mitofusin 2 als Strukturprotein zwischen SR und Mitochondrium

In nicht-erregbaren Zellen ist die Erleichterung der Kommunikation durch eine physikalische Kopplung von ER (endoplasmatisches Retikulum, Ca^{2+} -Speicher in Nicht-Kardiomyozyten) und Mitochondrien bereits gut etabliert (Bravo-Sagua *et al.*, 2013; Csordás *et al.*, 2006; Giorgi *et al.*, 2009; Lopez-Crisosto *et al.*, 2017). Es konnten dort eine Reihe von Strukturelementen identifiziert werden, die in den Mitochondrien-assoziierten Membranen (MAM) des SR lokalisiert sind und eine Verbindung mit der OMM eingehen (Csordás *et al.*, 2018; Lopez-Crisosto *et al.*, 2017; Rizzuto *et al.*, 2012; Wu & Zou, 2019). Dazu zählen etwa IP_3R , die chaperon vermittelt mit VDAC1 interagieren (Hayashi & Su, 2007; Szabadkai *et al.*, 2006), PACS-2 (phosphofurin acidic cluster sorting protein 2) (Simmen *et al.*, 2005) oder VAPB (vesicle-associated membrane protein associated protein B) und PTPIP51 (Protein tyrosin phosphatase interacting protein 51) (Gomez-Suaga *et al.*, 2017; Stoica *et al.*, 2014).

Auch in Kardiomyozyten wurde in den letzten Jahren der relevante Einfluss auf den Erhalt der mitochondrialen Funktion, eines ausgeglichenen zellulären Metabolismus und der Ca^{2+} Homöostase deutlich (Bravo-Sagua *et al.*, 2013; Lopez-Crisosto *et al.*, 2017). Hier konnte kürzlich FUNDC1 (FUN14 domain containing 1) als struktureller Koppler mit den IP_3R identifiziert werden (Wu *et al.*, 2017).

Eine weiteres Proteine, das eine Kopplung zwischen dem SR und der OMM der Mitochondrien herstellt, ist Mitofusin 2 (Mfn2) (Abbildung 2) (de Brito & Scorrano, 2008; Dorn & Maack, 2013; Naon *et al.*, 2016). Mfn2 gehört zu einer Gruppe von GTPasen (Enzymen, die Guanositriphosphat spalten), die initial als Mediator mitochondrialer Dynamik entdeckt wurden (Chen *et al.*, 2003). Im Herzen spielt die mitochondriale Dynamik eine untergeordnete Rolle, da es in den hochorganisierten Zellen nicht zu Zellteilung kommt und die Zyklen dieser mitochondrialen Teilung von etwa 2 Wochen sehr lang zu sein scheinen (Chen *et al.*, 2011; Dorn, 2013; Dorn & Maack, 2013). Die physiologischen Teilungsprozesse von Mitochondrien im Herzen scheint dagegen eher für die Elimination von schadhafte oder funktionsunfähigen Mitochondrien, der sogenannten Mitophagie, eine Rolle zu spielen (Dorn, 2013, 2015; Schrepfer & Scorrano, 2016).

Mfn2 konnte sowohl in den Membranen des SR als auch in der OMM nachgewiesen werden (de Brito & Scorrano, 2008). Mit seinem Strukturanalogen Mitofusin 1 (Mfn1), welches nur in der OMM lokalisiert ist, bildet es entweder heterotypische oder homotypische dimere Kopplungen aus (Abbildung 2) (de Brito & Scorrano, 2008; Naon *et al.*, 2016). Obwohl Mfn1 und Mfn2 Strukturhomologe sind, übernehmen beide jeweils unterschiedliche Rollen, und nur Mfn2 scheint funktionelle Relevanz für die Kopplung von SR und Mitochondrien zu besitzen (de Brito & Scorrano, 2008; Chen *et al.*, 2011; Naon *et al.*, 2016; Schrepfer & Scorrano, 2016). Durch die fein regulierte physische Kopplung der beiden Organellen unterstützt man zusätzlich die Ausbildung einer lokalen Ca^{2+} -Mikrodomäne (Csordás *et al.*, 2010; Giacomello *et al.*, 2010).

In verschiedenen Modellen konnte bereits wiederholt der Einfluss von Mfn2 auf die intakte Morphologie der Mitochondrien gezeigt werden. Bei Mfn2 Ablation kam es zu einer Größenzunahme und Dysproportionierung der Mitochondrien, und die subzelluläre Architektur zeigte sich insgesamt gestört (Beikoghli Kalkhoran *et al.*, 2017; de Brito & Scorrano, 2008; Chen *et al.*, 2012; Chen & Dorn, 2013; Naon *et al.*, 2016; Papanicolaou *et al.*, 2011). Zusätzlich vergrößerte sich die Distanz zwischen SR und Mitochondrien, und es kam zur verminderten SR-mitochondrialen Ca^{2+} Interaktion (de Brito & Scorrano, 2008; Chen *et al.*, 2012; Naon *et al.*, 2016; Papanicolaou *et al.*, 2011). Die physiologische Funktion dieser Kopplung im Herzen wird in Mfn2 KO Mäusen deutlich. In den herzspezifischen Mfn2 KO Mäusen von Papanicolaou *et al.* (Papanicolaou *et al.*, 2011) zeigte sich unter Ruhebedingungen kardiale Hypertrophie und eine moderate diastolische Dysfunktion. Erst unter β -adrenerger Stimulation zeigte sich auch eine systolische Dysfunktion. Chen *et al.* (Chen *et al.*, 2012) konnte einen Einfluss dieser Verbindung auf die Ca^{2+} -Signale zwischen SR und Mitochondrium der Herzmuskelzelle nachweisen. Herzspezifische Mfn2 KO Mäuse zeigten nach 6 Wochen zwar keinen kardialen Phänotyp, aber reduzierte Kontaktlängen zwischen jSR und Mitochondrien um etwa 30% (Chen *et al.*, 2012). In der Konsequenz kam es zur verminderten Ca^{2+} -abhängigen Stimulation von Krebszyklusenzymen unter Steigerung der Arbeitslast und einer vermehrten Oxidation von NAD(P)H und FADH_2 unter β -adrenerger Stimulation (Chen *et al.*, 2012). Im späteren Lebensalter entwickeln diese Mfn2 KO Mäuse eine dilatative Kardiomyopathie, die durch eine gestörte Mitophagie mit Akkumulation von

dysfunktionalen Mitochondrien verursacht zu sein scheint (Chen & Dorn, 2013). Zusammengenommen zeigen diese Studien einen Effekt von Mfn2 auf die kardiale (Patho)physiologie. Ausgehend in diesen Ergebnissen war der Einfluss anderer Signalkaskaden und –interaktionen, wie etwa des IP₃R- VDAC Komplexes.

Von einigen Autoren wird die Hypothese, dass Mfn2 SR und die OMM koppelt, angezweifelt und postuliert, dass Mfn2 eher eine Funktion als „Abstandshalter“ hat und vor pathologischer Calciumüberladung schützt (Cosson *et al.*, 2012; Filadi *et al.*, 2015, 2017, 2018). Durch die Kopplung von SR und Mitochondrien über Mfn2 würde die Calciumsignalgebung nicht nur in physiologischen Situationen erleichtert werden, sondern könnte ebenfalls als Antwort auf pathologische Stimuli einer Calciumüberladung des Mitochondriums den Weg ebnen und zum Auslösen von Zelltodprogrammen führen (Dorn & Maack, 2013; Papanicolaou *et al.*, 2011).

1.9 Pathophysiologische Veränderungen bei Herzinsuffizienz

Zur Pathogenese der Herzinsuffizienz tragen eine Reihe von komplexen Veränderungen bei, die als kardiales Remodelling zusammengefasst werden (Abbildung 4) (Braunwald, 2013; Heusch *et al.*, 2014; Tanai & Frantz, 2015). Einer der pathophysiologischen Kompensationsmechanismen der Herzinsuffizienz ist die generelle neurohumorale Aktivierung, die das sympathischen Nervensystem, das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und das Endothelin-System betreffen (Kockskämper *et al.*, 2008; Tanai & Frantz, 2015). Dadurch erhöhen sich die zirkulierenden Hormonspiegel etwa von ET-1 oder Ang II, die an ihren Rezeptoren als IP₃ Agonisten wirken und zu erhöhten intrazellulären IP₃-Konzentrationen führen (Kockskämper *et al.*, 2008). Zusätzlich konnte eine verstärkte Expression von IP₃R im Rahmen von kardialer Hypertrophie, Herzinsuffizienz und kardialen Arrhythmien nachgewiesen werden (Go *et al.*, 1995; Harzheim *et al.*, 2010; Proven *et al.*, 2006; Signore *et al.*, 2013).

Auf der Ebene der Herzmuskelzellen kommt es bei der Herzinsuffizienz zu einer Reihe von miteinander verzahnten Veränderungen der ECC, der zellulären Elektrolythomöostase, der Redox-Balance und des Metabolismus (Bers, 2006; Bertero & Maack, 2018a; Kohlhaas & Maack, 2011). Beeinträchtigungen der ECC äußern sich primär als Veränderungen der Ca^{2+} -Transienten mit verringerter Amplitude und scheinen insbesondere auf eine geringerer SR Ca^{2+} Beladung zurück zu gehen (Bers, 2006; Bertero & Maack, 2018a). Dies beruht vornehmlich auf einer verminderter Aktivität der SERCA und eines „ Ca^{2+} Leaks“ über RyR2 (Bers, 2006). Außerdem kommt es zu erhöhten zytosolischen $[\text{Na}^+]$ Werten, was während eines Aktionspotenzials zu einer Umkehr der Ionentransportrichtung des (vermehrt exprimierten) NCX (sog. „reverse mode“) führt (Armoundas *et al.*, 2003). Dieser sarkolemmale NCX-vermittelte Ca^{2+} Einstrom kompensiert geringfügig den verminderten Ca^{2+} -Gehalt des SR (Weisser-Thomas *et al.*, 2003), führt aber nicht zur Steigerung des mitochondrialen Ca^{2+} (Kohlhaas & Maack, 2010). Zusätzlich kommt es durch das erhöhte $[\text{Na}^+]$ sogar zu verstärktem mitochondrialen Ca^{2+} Efflux über den NCLX (Kohlhaas *et al.*, 2010; Liu & O’Rourke, 2008; Maack *et al.*, 2006). Durch diese Kombination fehlt die Ca^{2+} induzierte Aktivierung des Krebszyklus und die mitochondriale ROS Elimination wird reduziert (Kohlhaas *et al.*, 2010; Kohlhaas & Maack, 2010; Liu & O’Rourke, 2008). Aufgrund des fein regulierten Zusammenspiels zwischen ECC, mitochondrialem Redoxstatus und Regulation der ROS-Produktion kommt es bei Defekten der ECC zur Entwicklung eines energetischen Defizits und oxidativem Stress (Bertero & Maack, 2018b,a; Kohlhaas *et al.*, 2017).

Neben den zellphysiologischen Veränderungen kommt es zu einem strukturellen Umbau der Kardiomyozyten, bei dem die Mitochondrien morphologisch und funktionell betroffen sind (Rosca & Hoppel, 2013; Su *et al.*, 2000). Die Anzahl der Mitochondrien nimmt zu, die Mitochondrien werden disproportioniert und es zeigt sich ein Verlust mitochondrialer Strukturen wie der Cristae der IMM (Rosca & Hoppel, 2013). Diese Veränderungen betreffen die verschiedenen mitochondrialen Subpopulationen in unterschiedlichem Ausmaß (Hollander *et al.*, 2014). Die mitochondrialen morphologischen Veränderungen ziehen auch funktionelle Beeinträchtigungen nach sich.

Die Mitochondrien von Patienten mit Herzinsuffizienz zeigen Defekte der oxidativen Phosphorylierung und eine deutlich verminderte Atmungskettenaktivität (Rosca *et al.*, 2008; Schwarzer *et al.*, 2013; Ventura-Clapier *et al.*, 2004). Durch zelluläres Remodelling vermindert sich außerdem die SR-mitochondriale Interaktion (Ide *et al.*, 2001; Ruiz-Meana *et al.*, 2010). Das kann zu einer desynchronisierten ECC beitragen und einen Mechanismus für die Entstehung von Arrhythmien darstellen (Ruiz-Meana *et al.*, 2010).

Die diversen pathophysiologischen Mechanismen kardialer Pathologien wie der Herzinsuffizienz greifen auf komplexe Weise ineinander. Die Mitochondrien spielen in vielen dieser Prozesse eine Schlüsselrolle und sind daher auch zukünftig potenzielle Zielstrukturen von neuen Therapien (Murphy *et al.*, 2016). Es bedarf allerdings weiterer Untersuchungen, die kausalen Zusammenhänge aufzuklären.

1.10 Zielsetzung der Arbeit

Für den dauerhaften Erhalt der kardialen Funktion, zur Vermeidung von oxidativem Stress und zur Adaptation an rasch wechselnde Belastungssituationen ist ein fein abgestimmtes Zusammenspiel der ECC, des Energiehaushaltes und des Redoxstatus mit ausreichender antioxidativen Kapazität nötig. In Nicht-Kardiomyozyten ist der IP₃R der primäre Ca²⁺ Freisetzungskanal des ER und führt unter Bildung von Mikrodomänen zur Aufnahme von Ca²⁺ ins Mitochondrium. Die Ca²⁺-Transmission zwischen SR und Mitochondrien wird in Kardiomyozyten durch Mfn2 beeinflusst, welches eine kritische Strukturkomponente darstellt.

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte in murinen quieszenten und feldstimulierten Kardiomyozyten für die IP₃R vermittelten Signale eine Funktion für den basalen Metabolismus gezeigt werden (Seidlmayer *et al.*, 2016). Bei Stimulation mit ET-1 und dem β -Agonisten ISO zeigte sich eine vermehrte Aufnahme von Ca²⁺ in die mitochondriale Matrix, allerdings führte nur ET-1 zu einer Steigerung des ATP-Gehalts. Die ET-1 induzierte mitochondriale Ca²⁺-Aufnahme konnte durch den IP₃R Blocker 2-APB (2-Aminodetoxidiphenylboturat) verhindert werden und war auch in funktionellen IP₃R KO Mäusen (sog. IP₃-Sponge Mäuse) nicht nachzuweisen. Zusätzlich wurde das

IP₃R vermittelte Signal durch Ru360 (ein Blocker des MCU) nicht beeinflusst, aber bei Behandlung mit Dantrolene (ein Blocker des mRyR1) abgeschwächt. So konnte auf eine Beteiligung des mRyR1 der IMM an der mitochondrialen Ca²⁺-Aufnahme geschlossen werden, welche in einer Steigerung des indirekt bestimmten ATP-Gehalts resultierte (Seidlmayer *et al.*, 2016).

Wir spekulieren, dass die kleinen IP₃R-vermittelten Ca²⁺-Signale von dem Verlust der SR-mitochondrialen-Kopplung durch Mfn2 verstärkt betroffen sind, da es hier zum Wegfall der Mikrodomäne kommen würde und die Signale im RyR2 vermittelten „Hintergrund“ verloren gehen könnten. Die in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe gezeigte metabolische Calciumsignalachse zwischen SR und Mitochondrien von IP₃R und dem mRyR1 schlägt bereits eine enge räumliche Verbindung zwischen den beiden Organellen vor (Seidlmayer *et al.*, 2016). Es ist allerdings unklar, ob die räumliche Nähe alleine ausreichend ist oder ob es zusätzlich eine Verbindung über proteinhaltige Koppler bedarf, wie die Ergebnisse von de Brito und Scorrano in Fibroblasten (de Brito & Scorrano, 2008) oder von Chen *et al.* in murinen Kardiomyozyten (Chen *et al.*, 2012) suggerieren. Daraus ergibt sich die Frage, welchen Einfluss eine solche proteinhaltige Verbindung zwischen SR und Mitochondrien über Mfn2 für den physiologischen IP₃R-mRyR1 Signalweg in Kardiomyozyten auf den Metabolismus und den mitochondrialen Redoxstatus hat. Die Zielsetzung dieser Arbeit war es daher, die Hypothese zu prüfen, dass eine intakte SR-mitochondriale Kopplung durch Mfn2 für die basale metabolische Kontrolle durch die IP₃-induzierte Ca²⁺ Freisetzung in Ventrikelkardiomyozyten nötig ist.

2 Materialien und Methoden

2.1 Geräte

Gerät	Firma	Gerätebezeichnung
Absaugpumpe	Hartenstein	Flask Trap Aspirator
Autoklav	Systec	V150
Binokularmikroskop	Leica	Wild M3B
Elektrischer Stimulator	Hugo Sachs	Electronic Stimulator CS
Eismaschine	Scotsman	AF 200
Feinwaage	Kern	ABT 120-4M
Fotodrucker	Canon	Selfy CP800
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr	Economy, öko super
Gefrierschrank (-20 °C)	Bosch	Sport line
Gefrierschrank (-80 °C)	Forma Scientific	-86 Freezer
Gefrierschrank (-80 °C)	Heraeus	Hera freeze
Heizblock	Eppendorf	ThermostatC
Homogenisator	Qiagen	Tissue Ruptor
Inkubator (37°C)	Thermo Scientific	Hera therm
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr	Comfort
Langendorff Perfusionssystem	Universität Würzburg	
Lichtquelle	SCHOTT	KL 1500 electronic
Magnetrührer	Labinco	Magnetic Stirrer L-71
Perfusoren	BRAUN	Perfusor fm
Perfusor Konfokalmikroskop	Warner	VC-6
pH-Meter	HANNA	HI 991000

Gerät	Firma	Gerätebezeichnung
Thermocycler	Biometra	T300
Thermomixer	UVP	HB500 Minidizer
Transfergerät	BioRad	TransBlot Turbo
UV-Transluminator	AlphaInnotech	Red
UV-Vis Spectrophotometer	Thermo Scientific	NanoDrop 2000
Vortexer	LMS	VTX-300 L
Vortexer	Lab 4 you	Bio Vortex V1
Waage	Kern	EW 2200-2NM
Wasserbad	LAUDA	Alpha
X-Ray Film Processor	Protec	ECOMAX
Zentrifuge	Hettich	Mikro 220 R
RT-PCR Detection System (iCycler)	BioRad	CFX96 Touch

2.2 Materialien

Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Firma	Bestellnummer
NaCl	Sigma	31434
KCl	Merck	104.936
KH ₂ PO ₄	Merck	104.873
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	Merck	106.346
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	Merck	106.580
MgSO ₄ *7H ₂ O	Merck	105.886
HEPES	Sigma	H3375
Taurin	Sigma	T0625

Substanz	Firma	Bestellnummer
NaOH	Merck	109137
Glucose	Sigma	G7528
BDM	Sigma	B0753
FCS	Bio Chrom	S0615
CaCl ₂	Sigma	21115
MgCl ₂	Sigma	M1028
NaOH	Merck	109137
CoCl ₂	Roth	70951
Laminin	Sigma	L2020
Endothelin 1	Sigma	E7764
Isoprenalin	Sigma	I5627
Tris	Sigma	T6066
Essigsäure	J.T. Baker	6052
EDTA (0,5M)	Sigma	E6758
PCR Buffer E	Genaxxon	M3456
Yellow Sub	Geneo	FL120
Agarose	Genaxxon	M3044.0500
Ethidiumbromid	Sigma	46067
dATP	Promega	U120A
dGTP	Promega	U121A
dCTP	Promega	U122A
dTTP	Promega	U123A
Glycin	AppliChem	131340
Laemmli 2x	BioRad	161-0737
2-Mercaptoethanol	Sigma	M3148
MgCl*6H ₂ O	Merck	105.833

Substanz	Firma	Bestellnummer
Na ₄ P ₂ O ₇	Sigma	P8010
NaFl	Sigma	S1504
Na-Ortovanadate	Sigma	S6508
Methanol	Sigma	32213
PMSF	Sigma	P7626
Tween 20	Roth	9127
Magermilchpulver	AppliChem	A0830
Pyruvat	Sigma	P2256
Glutamat	Sigma	G8415
Maleat	Sigma	M0375
EGTA	Sigma	E4378
KOH	Sigma	P1767

Enzyme und Enzyminhibitoren

Name	Firma	Bestellnummer
Trypsin	Gibco	15090
Liberase TH	Roche	5401151001
DF Taq DNA Polymerase	Genaxxon	M3185
Proteinaseinhibitor	Roche	10711400

Farbstoffe und zugehörige Chemikalien

Substanz	Hersteller	Bestellnummer
X-Rhod-1/AM	Life Technologie	X14210
MagFluo4	Life Technologie	M14206

Substanz	Hersteller	Bestellnummer
DMSO	ROTH	A9942
MitoSOX	Life Technologie	M36008
Pluronic	Life Technologie	P3000MP
TMRM	Invitrogen	T668
FCCP	Sigma	C2920

Kommerzielle Kits

Kits	Hersteller	Bestellnummer
Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (250)	Qiagen GmbH	69506
Amersham ECL Western blotting detection	GE Healthcare Life Sciences	RPN 2108
Qiagen RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH	74104
DNase I	Sigma	AMPD1
iScript cDNA Synthesis Kit	BioRad	1708891

Primer

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller
Forward Primer Genotypisierung PCR Cre-Cre1	5'-CAA TTT ACT GAC CGT ACA CC-3'	Eurofins
Reverse Primer Genotypisierung PCR Cre-Cre 2	5'- TAG TTA CCC CCA GGC TAA GT-3'	Eurofins

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller
Forward Primer Genotypisierungs PCR MFN2 -HC 106	5'-GAA GTA GGC AGT CTC CAT CG-3'	Eurofins
Reverse Primer Genotypisierungs PCR MFN2 -HC 107	5'-AAC ATC GCT CAG CCTGAA CC-3'	Eurofins

Primärantikörper

Primärantikörper	Hersteller	Bestellnummer	Verdünnung
Anti-Mitofusin 2 Antibody (Mouse)	Abcam	AB56889	1:2000
GAPDH Rabbit mAb (HRP Conjugated) (14C10)	Cell Signaling Technology	3683S	1:2000

Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Hersteller	Bestellnummer	Verdünnung
Rabbit IGG HRP Linked F(AB') ₂	GE Healthcare Life Sciences	NA93401ML	1:5000

Real Time PCR

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
TaqMan Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems	4309155
TaqMan Gene Expression Assay GAPDH	Applied Biosystems	4453320 Mm9999999915_g1
TaqMan Gene Expression Assay Mfn2	Applied Biosystems	4453320 Mm0050012_m1

Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Alle allgemeinen Verbrauchsmaterialien wie etwa Pipettenspitzen, Nitrilhandschuhe, lichtdichte Eppendorf Tubes oder Falcons wurden über die Universitätsklinik Würzburg

(Medizinische Fakultät, Zentrallager), die Firma A.Hartenstein Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik mbH (Würzburg, Deutschland) oder die Firma Weckert Labor-, Röntgen- und Medizintechnik (Kitzingen, Deutschland) bezogen.

2.3 Puffer und Lösungen

Alle beschriebenen Lösungen und Puffer wurden nach bereits in der Arbeitsgruppe etablierten Protokollen hergestellt.

2.3.1 Myozytenisolation

Perfusions STOCK Lösung

Chemikalie	Molekulargewicht [g/mol]	Verwendete Menge Ad 1000ml H ₂ O	Endkonzentration [mM]
NaCl	58,4	7,884 g	135
KCl	74,6	0,35062g	4,7
KH ₂ PO ₄	136,1	0,08166g	0,6
Na ₂ HPO ₄ *H ₂ O	138	0,0828g	0,6
MgSO ₄ *7H ₂ O	246,5	0,2958g	1,2
HEPES	238,31	4,07662g	20
Taurin	125,1	3,753g	30

Mit NaOH wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

Perfusionslösung

Inhaltsstoffe	Molekulargewicht [g/mol]	Verwendete Menge	Endkonzentration [mM]
Perfusions STOCK Lösung		333ml	
D-Glucose	101,1	0,6g	5,9
BDM	180,16	0,35g	1,9

Die Lösung wurde für 20 min auf dem Magnetrührer gelöst.

Die nachfolgend beschriebenen Lösungen (Verdaulösung, Stopplösung 1 und 2) leiten sich von der Perfusionslösung ab.

Verdaulösung

Inhaltsstoffe	Verwendete Menge
Perfusionslösung	60ml
Liberase TH	150µl
Trypsin	300µl
CaCl ₂ (10mM)	67µl

Stopplösung 1 und 2

Inhaltsstoffe	Verwendete Menge Stopplösung 1	Verwendete Menge Stopplösung 2
Perfusionslösung	2,25ml	19ml
FCS	250µl	1ml
CaCl ₂ (10mM)	3,125µl	25µl

Die Calciumlösungen 1-3 leiten sich wiederum von der Stopplösung 2 ab.

Calciumlösungen 1-3

Inhaltsstoffe	Verwendete Menge Calciumlösung 1 [0,125mM]	Verwendete Menge Calciumlösung 2 [0,25mM]	Verwendete Menge Calciumlösung 3 [0,5mM]
Stoplösung 2	4ml	4ml	4ml
CaCl ₂ (0,1 M)	5 µl	10 µl	20 µl

Tyrode

Chemikalie	Molekulargewicht [g/mol]	Verwendete Menge Ad 1000ml H ₂ O	Endkonzentration [mM]
NaCl	238,3	7,89g	135
KCl	74,6	0,298g	4
Glucose	180,16	1,8g	10
HEPES	283,3	2,38g	10
MgCl ₂	95,21	1ml	1
CaCl ₂	110,98	1ml	1

Mit NaOH wurde der pH auf 7,3 eingestellt.

Intrazelluläre Lösung

Chemikalie	Molekulargewicht [g/mol]	Verwendete Menge Ad 1000ml H ₂ O	Endkonzentration [mM]
KCl	74,6	10,6g	135
NaCl	58,4	0,5844g	10
HEPES	238,31	4,766g	20
Pyruvat	88,1	0,55g	5
Glutamat	147,1	0,2942g	2
Maleat	116,1	0,232g	2
KH ₂ PO ₄	136,1	87,1g	0,5
MgCl ₂	95,21	1ml	1
EGTA	380,35	1,902g	5
CaCl ₂	110,98	1,858ml	100nM
BDM	101,1	1,516	15

Mit KOH wurde der pH auf 7,2 eingestellt.

2.3.2 PCR-Lösungen**TAE****50xTAE**

Chemikalie	Molekulargewicht [g/mol]	Verwendete Menge Ad 1000ml H ₂ O
Tris	121,14	242g
Essigsäure		57,1ml
0,5 M EDTA (pH 8,0)	292,24	100ml

1x TAE

Die Lösung leitet sich durch die Verdünnung der 50xTAE ab. (20ml 50xTAE ad 1000ml H₂O)

dNTP Stammlösung (10mM)

Nukleotid	Verwendete Menge 1ml H ₂ O	Ad	Endkonzentration [mM]
dATP (100mM)	25 µl		2,5
dCTP (100mM)	25 µl		2,5
dGTP (100mM)	25 µl		2,5
dTTP (100mM)	25 µl		2,5

2.3.3 Proteinanalytische -Lösungen**MHC –Puffer**

Chemikalie	Molekulargewicht [g/mol]	Verwendete Menge Ad 200ml H ₂ O	Endkonzentration [mM]
NaCl	238,3	3,5g	14,68
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	137,99	2,76g	20
Na ₂ HPO ₄	177,99	1,42g	7,9
MgCl*6H ₂ O	203,3	0,04g	0,2
Na ₄ P ₂ O ₇	265,90	0,54g	2
EDTA	292,24	0,74g	2,5
NaFl	41,99	1,6796g	40
Na-Ortovanadate	183,9	0,3778g	2

5x Elektrophoresepuffer (pH 8,3)

Inhaltsstoff	Molekulargewicht [g/mol]	Verwendete Menge ad1L H ₂ O	Endkonzentration [mM]
Tris	121,14	15g	124
Glycin	75,07	72g	960
SDS	288,38	5g	1,73

Der Transferpuffer leitet sich von dem Elektrophoresepuffer ab.

Transfer Puffer (pH 8,3)

Inhaltsstoff	Verwendete Menge ad1L H ₂ O	Endkonzentration
5x Elektrophoresepuffer (pH 8,3)	200ml	1x
Methanol	200ml	20%

5xPBS pH 7,4

Inhaltsstoff	Molekulargewicht [g/mol]	Verwendete Menge ad1L H ₂ O	Endkonzentration [mM]
Na ₂ HPO ₄	141,96	41,17g	290
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	137,99	11,73g	85
NaCl	58,44	20,0g	342

Von PBS leitet sich die PBS-T Lösung ab.

PBS-T

Inhaltsstoff	Verwendete Menge ad1L H ₂ O	Endkonzentration
5x PBS	200ml	1x
Tween20	500 µl	0,05%

Von der PBS-T Lösung leitet sich wiederum die Blocklösung ab.

Blocklösung

Inhaltsstoff	Verwendete Menge	Endkonzentration
PBS-T	100ml	1x
Magermilchpulver	5g	5%

2.3.4 Lösungen für Kofokalmikroskopie**Farbstoffe**

MagFluo4 (10 μ M): Zur Herstellung der Stocklösung wurden 1 Vial von MagFluo4 mit 61,2 μ l DMSO gemischt. Zur Färbung wurden dann 10 μ l der Stocklösung in 990 μ l Tyrode gegeben.

MitoSOX (0,5 μ M): Die Stocklösung setzte sich aus einem Vial MitoSOX mit 58,796 μ l Pluronic und 600 μ l Tyrode zusammen. Zur Färbung wurden 10 μ l der Stocklösung in 990 μ l Tyrode gegeben.

X-Rhod-1/AM(5 μ M): Die Stocklösung bestand aus 1 Vial X-Rhod-1/AM mit 50 μ l Pluronic und 357,1 μ l Tyrode. Zur Färbung wurden 50 μ l Stocklösung in 950 μ l Tyrode gegeben.

TMRM (5 μ M): Die Herstellung der Stocklösung erfolgte durch Lösung von 2,5mg TMRM in 99,81ml DMSO. Zur Färbung wurde 1 μ l Stocklösung in 100ml Tyrode gegeben.

FCCP (5 μ M): Die Stocklösung bestand aus 10 mg FCCP in 3,93 ml DMSO. Zur Zugabe im Anschluss an die TMRM Messungen, wurde 50 μ l der FCCP Stocklösung in 50 ml Intrazellulärlösung, 0,5 μ l TMRM sowie 92,9 μ l CaCl₂ (100nM) gegeben.

2.4 Kardiomyozytenisolation

Alle nachfolgend beschriebenen Experimente wurden an zuvor isolierten lebenden adulten Kardiomyozyten der Maus durchgeführt.

2.4.1 Versuchstiere

Die F0-Generation der Versuchstiere (*Mus musculus*) stammen aus der Arbeitsgruppe von Prof. Gerald W. Dorn II M.D. (Washington University, Division of Biology and Biomedical Sciences, St. Louis)(Chen *et al.*, 2011).

Die Tiere haben einen B6 Hintergrund und nutzen das Cre/loxP- System um einen konditionellen herzspezifischen Knock-out (KO) des Mitofusin 2 zu erzielen. Cre ist eine durch Bakteriophagen eingebrachte Rekombinase, die hier ligandenspezifisch mittels Tamoxifen aktivierbar ist. Ihre Aufgabe ist es durch loxP Markierung(^{loxP/loxP}) kenntlich gemachte DNA Abschnitte (gewünschte Zielgene) zu erkennen und auszuschneiden.

Myh6 (Myosin Heavy Chain 6) ist das Gen eines herzspezifisch exprimierten Protein des kontraktiven Apparates. Durch die Kopplung der Cre-Sequenz an die unmittelbarer Nähe des *Myh6* fällt das Cre unter den gleichen Promotor und wird so nur im Herzen transkribiert und in der Folge translatiert. Durch die Kreuzung von heterozygoten *Myh6*-Cre Mäusen mit homozygoten „gefloxten“ (durch beidseits loxP markierten DNA Abschnitte des MFN2 Gens) *Mfn2* Mäusen, erhält man in der F1 Generation so, bei sowohl Cre als auch MFN2^{loxP/loxP} positiven Tieren, eine durch Tamoxifen induzierbaren Knock out. Durch die Heterozygotie des *Myh6*-Cre Genotyps können sowohl doppeltransgene als auch einfach transgene Mäuse entstehen. Der jeweilige Genotyp wurde mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) nachgewiesen. Die nur für eines der Eigenschaften transgenen Mäuse wurden als Kontrolltiere verwendet (Wildtypen, WT), die doppeltransgenen Mäuse gingen nach der Verabreichung von 20 mg Tamoxifen/kg Körpergewicht/Tag (Ssniff Spezialdiäten GmbH) für 7 Tage als KO Mäuse in die Versuche (*Mfn2* KO). Die Konzentration des Futters (210mg/kg) wurde so gewählt, dass eine Menge von ca. 20 mg Tamoxifen/kg Körpergewicht pro Tag über eine Woche verabreicht wurde. Die Aufnahme des Futters wurde über regelmäßige Gewichtskontrolle des Futters und der Mäuse sichergestellt. Für die Versuche wurden männliche und weibliche Tiere im Alter von 10 bis 31 Wochen verwendet. Die Tiere wurden

entsprechend der aktuellen deutschen Tierschutzrichtlinien für Labortiere gehalten. Sie waren in Standardlaborkäfigen zu maximal 5 Tieren, bei einer Raumtemperatur von 22°C und einer Luftfeuchtigkeit von 52% untergebracht und hatten stets Futter und Wasser zur freien Verfügung. Außerdem wurden sie einem kontinuierlichem 12 stündigem Tag-Nacht-Rhythmus unterworfen. Die Genehmigung der Regierung von Unterfranken für die Versuchsdurchführung lag vor.

2.4.2 Herzisolation- und Perfusion an dem Langendorff-Apparat

Vor der Herzentnahme bekamen die Versuchstiere 125 µl Heparin (ratiopharm) i.m. injiziert. Nach 20minütiger Einwirkzeit erfolgte die Anästhesie der Tiere durch die Inhalation von 1 ml Isofluran CP (cp-pharma) in einer Inhalationskammer bis zum völligen Verschwinden aller Reflexe. Anschließend wurde die Maus mittels cervikaler Dislokation getötet und mit Klebestreifen auf einer Präparationsunterlage befestigt. Durch einen medianen Längsschnitt wurde zuerst das Abdomen eröffnet. Durch Anhebung des Xyphoids wurde das Zwerchfell gespannt, welches danach rechts- und links-lateral inzidiert und von der unteren Thoraxapertur abpräpariert wurde. Zusätzlich wurden die unteren Rippen von kaudal durchtrennt um ein Wegklappen des vorderen Thoraxschildes nach kranial zu ermöglichen und einen Blick auf das vordere Mediastinum zu gewähren. Danach wurde das noch schlagende Herz vorsichtig aus dem umgebenden Gewebe mobilisiert und das Perikard eröffnet. Es wurde besonders darauf geachtet, einen möglichst langen Anteil der Aorta ascendens freizulegen. Anschließend wurde das Herz durch Absetzen an den großen Gefäßen entnommen und sofort in gekühlte Perfusionslösung in einer kleinen Plastikschaale gelegt.

Unter dem Binokularmikroskop erfolgte die Kanülierung der Aorta mit einer Knopfkanüle (1,5x 80mm) und die Befestigung mittels eines vorgelegten Seidenfadens (Vömel, Art.No. 14699). Danach wurde das Herz kurz vorsichtig retrograd mit gekühlter Perfusionslösung gespült und darauf geachtet, dass die Koronargefäße sichtbar blutleer wurden. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass die Kanülierung erfolgreich und eine Perfusion des gesamten Herzens möglich war. Anschließend wurde das Herz sofort in die modifizierte Langendorff-Apparatur eingebaut und begonnen mit nun auf 37 °C angewärmter Perfusionslösung für 3 min zu perfundieren (100ml/h).

Als nächsten Schritt wurde das Herz mit der enzymhaltigen Verdauung für 11:30 min perfundiert (100,8 ml/h). Das verdaute Herz wurde danach von der Langendorff-Apparatur genommen und in Stop1-Lösung gelegt. Nach einer groben Zerkleinerung des Herzens mittels Schere wurde in verschiedenen Schritten mit immer feiner werdenden Pipetten versucht, die einzelnen lebenden Kardiomyozyten vorsichtig mechanisch aus ihrem Zellverband zu lösen. Unter Zugabe der Stop2-Lösung erfolgte eine Filtrierung (Filtergewebe aus Polyamid, Hartenstein) der Zelllösung in einen Falcontube. Danach wurde drauf gewartet, dass sich die Myozyten durch die am Boden des Behältnisses absetzten. Dem entstehenden Myozytenpellett wurde im Anschluss der Flüssigkeitsüberstand abgenommen, das Pellet in mehreren Schritte nacheinander jeweils in die Calciumlösungen 1-3 resuspendiert und jeweils 10 min auf das erneute Absinken der Zellen gewartet.

Zuletzt wurden die Zellen in Zellkulturschalen (Cellview, Greiner Bio-one) mit Glasboden ausplattiert, die vorher mit Laminin (50 µl Laminin in 950 µl Tyrode) beschichtet wurden. Bevor die Färbungen durchgeführt wurden, erhielten die Zellen eine Stunde Zeit sich mittels Laminins an den Glasboden anzuheften.

2.4.3 Arbeitsplatz mit Langendorff-Apparatur

Das System der Langendorff-Apparatur wurde in modifizierter Weise nach dem bereits 1895 beschriebenen Versuchsaufbau von O. Langendorff verwendet (Dhein *et al.*, 2004) (Abbildung 5). Der Grundgedanke dabei ist die retrograde Perfusion des Herzens über die Aorta und die Koronarien.

Der Arbeitsplatz bestand aus einem Glasrohr in einer Aufhängevorrichtung, zwei Perfusoren mit entsprechenden Spritzen (für Verdau- und Perfusionslösungen) und einem Wasserbad. Das Glasrohr besaß Zu- und Ablauf zum Wasserbad und wurde dadurch von warmem Wasser durchströmt. Die Lösungen zum Perfundieren des Herzens wurden, von den Perfusoren kommend, in Schläuchen durch das Glasrohr geleitet und mittels Gegenstromprinzip auf Körpertemperatur von 37°C erwärmt. Die Schläuche mündeten gemeinsam am unteren Ende in einen Dreiwegehahn mit Blasenfalle, an dem das an der Aorta kanülierte Herz befestigt wurde.



Abb. 5: Modifizierte Langendorff Perfusionsanlage zur enzymatischen Myozytenisolation

2.5 Molekularbiologischen Methoden

2.5.1 Genotypisierung mittels Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode, die es erlaubt, DNA Abschnitte zu vervielfältigen. Sie besteht aus den Schritten der DNA Denaturierung, der Primerhybridisierung und der Elongation, die 30 bzw 35x wiederholt werden. Wie oben

beschrieben konnte es durch die Zucht zwei verschiedene Genotypen der Mauslinie B6.Mfn2-cre geben: einfach- und doppeltransgen. So mussten alle Nachkommen der Elterntiere anhand ihrer genetischen Eigenschaften typisiert werden. Dazu musste zunächst die DNA aus Typisierungsproben (Ohrstanzen) isoliert, dann mittels PCR amplifiziert und schließlich durch Gelelektrophorese aufgetrennt werden.

DNA-Isolierung

Die DNA Isolierung wurde mittels eines Kommerziellen Kits (Qiagen, DNeasy Blood& Tissue Kit (250)) anhand des enthaltenen Protokolls durchgeführt.

Polymerasekettenreaktion

Die PCR wurde jeweils für die Eigenschaften Mfn2 und Cre gemacht. Ein Standardansatz für eine PCR setzte sich wie folgt zusammen:

- 4 µl isolierte DNA
- 5 µl PCR Buffer E
- 1 µl dNTP Stammlösung (10mM)
- 1 µl Forward Primer
- 1 µl Reverse Primer
- 0,5 µl DF Taq DNA-Polymerase
- 5 µl Yellow Sub
- 32,5 µl destilliertes H₂O

Der Thermocycler mit dem Reaktionsgemisch durchlief die folgenden Reaktionsbedingungen

Cre-PCR:

Initiale Denaturierung	94°C	5 min
Denaturierung	94°C	30 sec 30x
Primerhybridisierung	55°C	30 sec 30x
Elongation	72°C	1 min 30x
Finale Elongation	72°C	5 min

MFN2-PCR:

Initiale Denaturierung	94°C	30 sec
Denaturierung	94°C	30 sec 35x
Primerhybridisierung	58°C	1 min 35x
Elongation	72°C	1 min 35x
Finale Elongation	72°C	1 min

Gelelektrophorese

Um den Genotyp bestimmen zu können, müssen die in der PCR erhaltenen Genprodukte mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und dargestellt werden. Dazu wurde ein 3% Agarosegel hergestellt, indem 3g Agarose in 100ml 1xTAE gelöst und danach in der Mikrowelle aufgeköcht wurden. Das Gemisch wurde anschließend auf dem Rührer auf ca 50°C abgekühlt. Nach Zugabe von 7,5 µl Ethidiumbromid-Lösung wurde es möglichst luftblasenfrei in eine Gelkammer mit zuvor eingesetzten Kämmen gegossen. Nach fertiger Auspolymerisation des Agarosegels wurden es in einer Gelelektrophoresekammer plaziert und mit 1xTAE überschichtet. Danach wurden die Kämmen vorsichtig entfernt und in die entstehenden Ladetaschen 20 µl der PCR-Produkte pipetiert. Zur genauen Bestimmung der DNA Fragmente wurden entweder eine 100bp DNA-Ladder (Cre) oder eine 50bp DNA-Ladder (MFN2), sowie jeweils positiv und negativ Kontrollen des zu untersuchenden Gens aufgetragen. Im Anschluss wurde das Gel für 1h an eine Spannung von 100 V angeschlossen. Durch die Interkalation des Ethidiumbromids mit der DNA werden die aufgetragenen DNA-Fragmente unter UV-

Licht sichtbar. Auf diese Weise wurde die genetischen Eigenschaften der zu untersuchenden Versuchstiere bestimmt.

2.5.2 Real Time PCR

Die real time PCR (RT PCR) dient der relativen Quantifizierung der Mfn2 mRNA. Die Methode basiert auf dem Prinzip der PCR, kann aber durch den Einsatz spezieller Fluoreszenzsonden zu einer zeitgenauen Aussage über die vorhandene mRNA Menge genutzt werden. Es wurden jeweils 3 Tiere der Wildtypen und der Tamoxifen-induzierten Mfn2 KO Tieren verwendet. Alle Ergebnisse wurden auf ein ubiquitär exprimiertes Haushaltsprotein (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, GAPDH) normalisiert.

RNA Isolation

Die RNA Isolation aus dem Herzgewebe erfolgte mittels eines kommerziellen Kits (Qiagen, RNeasy Mini Kit) nach dem enthaltenen Protokoll. Im Anschluss wurde die RNA Konzentrationen der Proben gemessen.

Herstellung von cDNA

Zunächst erfolgte der Verdau der enthaltenen DNA mittels eines kommerziellen Kits (Sigma, DNase 1) nach enthaltenem Protokoll unter Einsetzen von jeweils 1µg RNA.

Zur Synthese der cDNA aus der RNA wurde ebenfalls ein kommerzielles Kit (BioRad, iScript cDNA Synthesis Kit) genutzt und den Herstellerangaben entsprechend ausgeführt.

RT PCR

Im Vorversuch erfolgte eine Positiv- und Negativkontrolle, sowie eine Kalibrierung der Sonden mittels Verdünnungsreihe. Die Versuche wurden jeweils für Mfn2 und GAPDH mit unterschiedlichen Sonden durchgeführt.

Ein Standardansatz setzte sich wie folgt zusammen:

12,5 µl TaqMan Gene Expression Master Mix (2x)

1,25 µl TaqMan Gene Expression Assay

6,25 µl RNase freies H₂O

5 µl cDNA

Der iCycler mit dem Reaktionsgemisch durchlief folgende Reaktionsschritte:

50°C	2 min
95°C	10 min
95°C	15 sec 40x
60°C	1 min 40x

Die erhobenen Werte wurden in Microsoft Excel 2011 exportiert und nach der $\Delta\Delta CT$ Methode analysiert und normalisiert. Die Ergebnisse werden als x-fache Veränderung (fold change expression) im Vergleich zur unbehandelten Wildtypen wiedergegeben.

2.5.3 Proteinanalytischer Nachweis des Knock-outs

Zum Nachweis und zur Quantifizierung des durch Tamoxifen induzierten KO des Mfn2 wurde vor Beginn der Versuchsreihen an einigen Tieren eine Bestimmung des Mfn2 mittels Westernblot und nachfolgender Proteinanalyse durchgeführt.

Proteinextraktion aus dem Myokard

Zunächst mussten die Proteine aus dem Herzgewebe der Versuchstiere isoliert und homogenisiert werden. Dazu wurde das zu untersuchende Gewebe gewogen und entsprechend dem Gewicht (Gewebe [mg] / 0,06 [µl /mg]) MHC-Puffer, 1:25 Proteinaseinhibitor und 1:1000 PMSF hinzugefügt. Danach erfolgte die Homogenisierung der Gewebeprobe mittels Homogenisator (Qiagen, TissueRuptor) und entsprechend passendem Aufsatz, bis makroskopisch keine Gewebestücke mehr erkennbar waren. Im Anschluss erfolgte die Proteinkonzentrationsbestimmung spectrophotometrisch bei 280nm an zuvor auf MHC-Puffer geeichtem Photospectrometer. Um eine Vergleichbarkeit herzustellen, musste etwa die gleiche Menge an Proteinen jeder Probe für die nachfolgenden Schritte verwendet werden. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Proben im Verhältnis 1:1 mit

2xLaemmli-Puffer und Mercaptoethanol (50 µl Mercaptoethanol in 950 µl Laemmli-Puffer) vermischt und bei 95°C für 5 min gekocht. Durch diesen Schritt wurden die Proteine denaturiert und unabhängig von ihrer Eigenladung negativ geladen, um eine Auftrennung der reinen Größe nach möglich zu machen.

Western Blot

Um das erhaltene Proteinlysate entsprechend der Größe der Proteine nach aufzutrennen, wurde jeweils 30 µg auf ein fertiges 10% SDS-Gel (Mini Protean TGX, BioRad) in die Probentaschen im Sammelgel aufgetragen. Zusätzlich wurde zur späteren Größenbestimmung ein Komigrationsstandard aufgetragen. Anschließend wurde das mit den Proben beladene Gel in eine Elektrophoresekammer gestellt, mit Elektrophorese-Puffer überschichtet und für ca. 3 Stunden an eine Spannung von 80V angeschlossen. Nach der so erhaltenen Trennung der Proteine wurden sie ebenfalls durch elektrophoretischen Transfer unter Verwendung des Transferpuffers auf eine Nitrocellulosemembran (Trans Blot Turbo Transfer, BioRad) übertragen. Dieser Schritt erfolgte mittels eines Schnelltransfers für 10min bei 25V. Im Anschluss wurde sie mit Blocklösung für mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu blockieren. Die Inkubation des Primärantikörpers, der gegen das zu untersuchende Protein gerichtet ist, erfolgte über Nacht bei 4°C in der Kühlkammer. Danach wurde die Membran gründlich mit PBS-T gewaschen (mind. 3x für je 10min) und mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper erneut für mind. 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend erfolgten erneut ausführliche Waschschriffe mit PBS-T (mind. 3x für je 10min).

Um die aufgetragenen Proteine nun sichtbar zu machen, wurde die enzymatische Elektrochemilumineszenzmethode (ECL) angewandt, bei der eine durch HRP katalysierte Enzymreaktion röntgenologisch nachgewiesen wird. Dabei wurde ein ECL-Kit (Amersham, GE) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Durch die bei der densitometrischen Auswertung durchgeführte Normalisierung auf GAPDH konnte die Quantifizierung des KO erfolgen. Diese Ladekontrolle von GAPDH wurde durchgeführt,

um sicherzustellen, dass unterschiedlich starke Proteinbanden tatsächlich aus einer spezifischen Proteinexpression resultierten.

Zur Auswertung wurde die Software ScanPack3.0 (Biometra) verwendet.

2.6 Live Cell Imaging am Konfokalmikroskop

Färbung

Es wurden die Fluoreszenzfarbstoffe TMRM, X-Rhod-1/AM, MitoSOX und MagFluo4 verwendet (Thermo Fisher Scientific, 2010).

TMRM (Tetramethylrhodamin Methyl Ester) ist ein membranpermeabler kationischer Farbstoff, mit dem man das mitochondriale Membranpotential $\Delta\Psi_m$ messen kann (Thermo Fisher Scientific, 2010). Er wurde in einer Konzentration von 5nM auf die Zelle aufgebracht und für 15 min bei 37°C inkubiert. Um ein Auswaschen des Farbstoffes im Laufe des Experiments zu verhindern enthielten alle verwendeten Lösungen 5nM TMRM. Zur Kalibrierung von $\Delta\Psi_m$ wurde im Anschluss an jedes Experiment 5 μ M FCCP verwendet. Die Fluoreszenzanregung erfolgte mittels des 561nm Lasers.

X-Rhod-1/AM ist ein membranpermeabler Farbstoff, der genutzt wird um mitochondriale Ca^{2+} -Konzentrationsänderungen zu messen (Thermo Fisher Scientific, 2010). Er wurde in einer Konzentration von 5 μ M in Tyrode auf die Myozyten aufgebracht und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde für 10 min eine 1mM CoCl_2 haltige Tyrode Lösung aufgetragen um zytosolischen Ca^{2+} Signale zu unterdrücken. Die Fluoreszenzanregung erfolgte mittels des 561nm Lasers.

MitoSOX ist ein für Mitochondrien hochselektiver Farbstoff und detektiert dort Superoxide (Thermo Fisher Scientific, 2010). Er wurde in einer Konzentration von 0,5 μ M aufgebracht und für 30 min bei 37°C inkubiert. Hier erfolgt die Fluoreszenzanregung mittels des 514nm Lasers.

MagFluo4 ist ein Farbstoff mit dessen Hilfe man indirekt den mitochondrialen ATP

Gehalt messen kann (Garfinkel *et al.*, 1986; Seidlmayer *et al.*, 2016; Thermo Fisher Scientific, 2010). Auch hier erfolgte die Färbung für 30 min bei 37 °C gefolgt von einer 10min Inkubation mit 1mM CoCl₂ haltiger Tyrode. Die Fluoreszenzanregung erfolgte bei 488nm.

Fluoreszenzfarbstoff	Exzitationswellenlänge λ_{ex}	Emissionswellenlänge λ_{em}
TMRM	543nm	565-605nm
X-Rhod-1/AM	543nm	552-617nm
MitoSOX	543nm	555-617nm
MagFluo4	488nm	565-605nm

Messungen

Um das Ausmaß des KO von Mfn2 auf die Regulation der physiologischen Abläufe zwischen sarkoplasmatischem Retikulum und Mitochondrien abschätzen zu können, wurden die nachfolgend beschriebenen Messungen jeweils einmal in tamoxifeninduzierten Mfn2 KO Tieren sowie einfachtransgenen Kontrolltieren (WT) gemessen. Zur Kontrolle des Ausmaßes der Stimulation der verschiedenen Signalwege mittels Endothelin-1 oder Isoprenalin wurden ebenfalls Kontrollen ohne Stimulation gemessen. Alle Messungen wurden an elektrisch stimulierten Myozyten (34,4 V bei 0,5Hz für 2msec) bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Die Zellen wurden stetig durch einen Perfusor (Tropfgeschwindigkeit ca. 1/sec) über eine in dem Zellgefäß hängenden Nadelkanüle mit Tyrode bzw. den chemischen Stimulantien in Tyrode umspült. In lebenden Kardiomyozyten wurden durch jeweils spezifische Farbstoffe die mitochondrialen Ca²⁺ Konzentration, die Produktion von Superoxidanione, das mitochondriale Membranpotenzial und der mitochondriale ATP-Gehalt im zeitlichen Verlauf verfolgt. Dazu wurde ein konfokales Laser-scanning-Mikroskop (Zeiss LSM 780) mit dem Objektiv C-Apochromat x63 verwendet. Durch die hohe Punktauflösung in genau einer Ebene eignet es sich besonders für diese Fragestellung, da hierdurch die

Aussagekraft der erhaltenen Daten der Fluoreszenzsignale steigt. Es wurden über 720 Zyklen alle zwei Sekunden Bilder aufgenommen.

Für jede Messung wurden zunächst eine Messung unter Standardbedingungen (elektrische Stimulation, Tyrode) für 3min durchgeführt. Im Anschluss daran wurden sie mit ET-1 oder ISO behandelt oder als unbehandelte Kontrollen gewertet. Dazu wurde über die Perfusionsapparatur die entsprechende Lösung kontinuierlich in die Zellschale geleitet.

2.7 Graphische und statistische Auswertung

Mittels des Programmes Igor Pro 6.37 wurden die Daten zunächst Hintergrundkorrigiert. Danach wurde auf die für jede Messung durchgeführte initiale Fluoreszenzmessung unter Ruhebedingungen normalisiert (F/F_0) und die Werte zu den Zeitpunkten 5 min , 10 min, 15 min und 20 min bestimmt.

Das Erstellen der Graphen und die statistische Auswertung erfolgte mit den Programmen GraphPad Prism 7.03, Microsoft Excel 2011 sowie Inkscape 0.91. Die statistische Signifikanz wurde mittels einer two-way-ANOVA-Analyse mit Bonferroni Posttest bzw. einen gepaarten oder ungepaarten t-Test ermittelt. Von einer statistischen Signifikanz wurde ausgegangen, wenn * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ bzw. **** $p < 0,0001$ war.

Die Ergebnisse werden als arithmetischer Mittelwert \pm ihrer jeweiligen Standardabweichung ($SEM = \text{Varianz} / \sqrt{n}$; $n = \text{Anzahl der Experimente}$) dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Molekularbiologischer Nachweis des Mfn2 KO im Tiermodell

Zur Überprüfung des Mfn2 KO Mausmodells erfolgten molekularbiologische Nachweise für Mfn2 auf Ebene der Proteinexpression und mRNA.

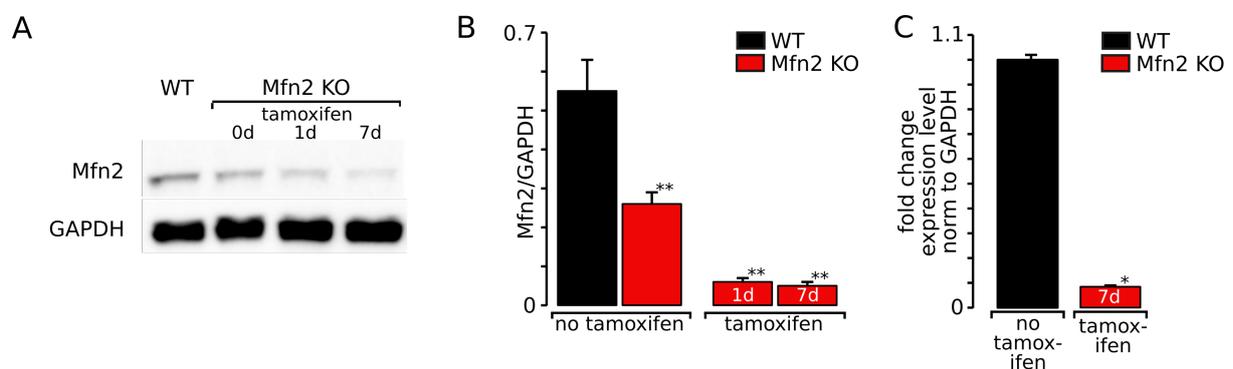


Abb. 6: Mfn2 Expressionslevel in WT und Mfn2 KO Myokardgewebe

(A) Western Blot von Herzmuskelgewebe aus WT und Mfn2 KO Mäusen ohne und nach Gabe von Tamoxifen. Gezeigt sind die Proteinexpressionslevel für Mfn2 (oben) und GAPDH (unten). (B) Proteinexpressionslevel von (auf GAPDH normalisiertem) Mfn2 von WT (schwarz) und Mfn2 KO Mäusen (rot) an Tag 0, 1 und 7 nach Tamoxifen. $**p < 0,01$ (ungepaarter t-Test) (C) RT PCR auf Mfn2 mRNA (normalisiert auf GAPDH mRNA) von Mfn2 KO Tieren (rot) unter Tamoxifen im Vergleich mit WT (schwarz). $*p < 0,05$ (ungepaarter t-Test).

Mittels Western Blot wurde die Proteinexpression von Mfn2 und GAPDH der Mfn2 KO Tiere unter Tamoxifen an Tag 0, 1 und 7 mit der von Wildtypen verglichen (Abbildung 6A, B). Nach einem Tag Tamoxifengabe zeigte sich eine signifikante Reduktion der Mfn2 Expression um 88,9% des Ausgangswertes im Vergleich zu den Wildtypen (WT $0,55 \pm 0,08$, $n=3$; Mfn2 KO $0,06 \pm 0,01$, $n=3$). Durch eine fortgesetzte Gabe von Tamoxifen über das Futter über insgesamt 7 Tage zeigte sich dieser Effekt noch verstärkt auf 90,4% Reduktion im Vergleich zu den Wildtypen (Tag 7 Reduktion von Mfn2 auf $0,05 \pm 0,01$ des Ausgangswertes; $n=7$; Abbildung 6B).

Zur Quantifizierung der vorhandenen Mfn2 mRNA Konzentration wurde eine RT PCR durchgeführt und Mfn2 KO Tiere, welche seit 7 Tagen Tamoxifen erhielten, mit Wildtypen verglichen. Hier zeigten sich eine um 91,5% reduzierte Genexpression für Mfn2 mRNA ($0,09 \pm 0,07$, $n=3$) im Vergleich zu Wildtypen ($1,0 \pm 0,37$, $n=4$) (Abbildung 6C).

3.2 Mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme in WT und Mfn2 KO Kardiomyozyten

Die Messung der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes X-Rhod-1/AM (Thermo Fisher Scientific, 2010). Da mit diesem Farbstoff keine absoluten Ca^{2+} -Konzentration gemessen werden kann, wurde die Fluoreszenzänderung im zeitlichen Verlauf erfasst und wiedergegeben. Zur Vereinfachung wird nachfolgend von dem „ Ca^{2+} -Signal“ gesprochen.

In Abbildung 7A sind repräsentative originale Kurvenverläufe der mitochondrialen Ca^{2+} -Messungen am Konfokalmikroskop zu sehen, bei denen die unbehandelten Kontrollen oder entweder die Behandlung mit 10 nM ET-1 oder 500 nM ISO erfolgte. Alle Messungen wurden an elektrisch stimulierten Zellen (0,5 Hz) durchgeführt. Es wurden immer jeweils mehrere Zellen (n) aus mindestens 3 Tieren gemessen. Die Ergebnisse werden als Mittelwert des F/F_0 nach 5, 10, 15 und 20 min mit dem SEM dargestellt.

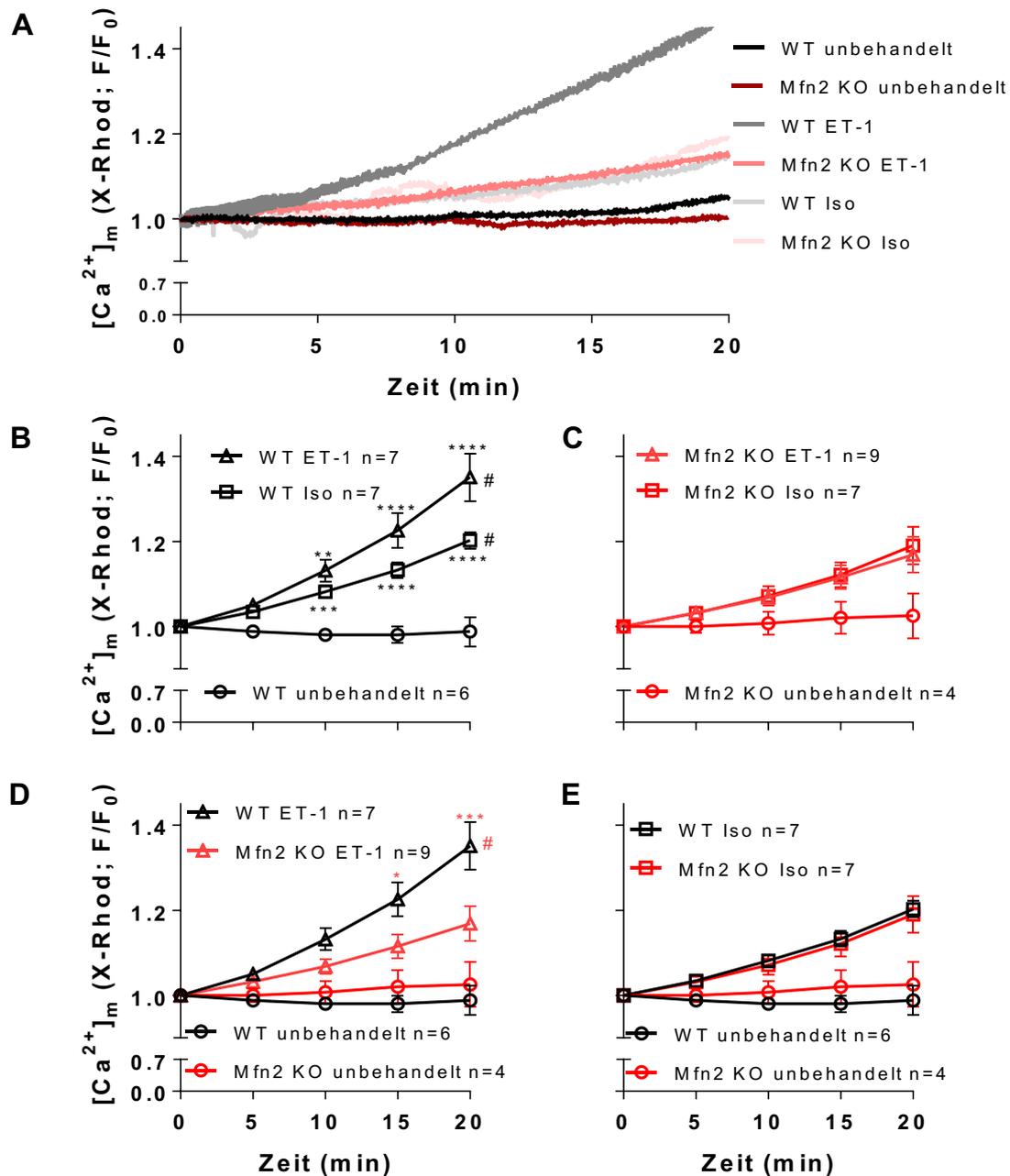


Abb. 7: Mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme in WT und Mfn2 KO Kardiomyozyten

Adulte ventrikuläre Kardiomyozyten der WT und Mfn2 KO Mäuse wurden mit XRhod1/AM inkubiert und unter Feldstimulation mit 0,5 Hz dem IP_3 Agonisten ET-1 (10nM) oder dem β -adrenergen Agonisten ISO (500nM) ausgesetzt. (A) repräsentative konfokalmikroskopische Kurvenverläufe aller Gruppen über den Beobachtungszeitraum von 20 min (B-E) # $p < 0,05$ vs. WT unbehandelt (schwarz) bzw. vs. Mfn2 KO unbehandelt (rot) (two-way-ANOVA). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ vs. WT unbehandelt (schwarz) bzw. vs. Mfn2 KO unbehandelt (rot) (Bonferroni Posttest). Ergebnisse dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

In Kardiomyozyten von wildtypischen Mäusen unter Behandlung mit dem IP₃-R Agonisten ET-1 stieg das Ca²⁺-Signal stetig an und erreichte sein Maximum zum Ende des Experiments bei 35±6% (Abbildung 7B). Dies ist im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen signifikant erhöht. In Myozyten Mfn2-defizienter Tiere war die IP₃-vermittelte mitochondriale Ca²⁺-Aufnahme hingegen verglichen mit den unbehandelten Mfn2 KO Mäusen nicht signifikant gesteigert und erreichte nur einen Anstieg von 17±4% (Abbildung 7C). Die ET-1 stimulierte mitochondriale Ca²⁺-Aufnahme war in wildtypischen verglichen zu den Mfn2 KO Mäusen signifikant stärker ausgeprägt (Abbildung 7D).

Zusätzlich führten wir die Versuche mit dem β-adrenergen Agonisten ISO durch. ISO erhöht, unabhängig von IP₃Rs, unter anderem über eine Phosphorylierung von L-Typ Ca²⁺-Kanälen und RyR2 die zytosolische Ca²⁺-Konzentration (siehe Einleitung Abschnitt 1.2). Auch unter Stimulation mit 500 nM ISO stieg das mitochondriale Ca²⁺-Signal in Kardiomyozyten aus wildtypischen Mäusen kontinuierlich an und erreichte sein Maximum zum Ende des Experiments bei 20±2%. Der β-adrenerg vermittelte mitochondriale Ca²⁺-Anstieg fiel signifikant geringer aus als der ET-1 vermittelte (Abbildung 7B). In Kardiomyozyten von Mfn2-defizienten Tieren zeigte sich dagegen bei Stimulation mit ISO kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den gleich behandelten Wildtypen (19±4%; Abbildung 7C). Ferner gab es bei dem β-adrenerg vermittelten mitochondrialen Ca²⁺-Anstieg keinen Unterschied zwischen wildtypischen und Mfn2 KO Kardiomyozyten (Abbildung 7E).

3.3 Mitochondriale Membranpotential $\Delta\Psi_m$ in WT und Mfn2 KO

Kardiomyozyten

Mitochondrien bauen über ihrer inneren Membran ein stark negatives Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) auf. Dieses Potential ist vor allem von der Energetisierung der Mitochondrien, also der Aktivität der Atmungskette des von ihr aufrechterhaltenen Protonengradienten abhängig (siehe Einleitung Abschnitt 1.3). Die Aufnahme positiver Ladung in die mitochondriale Matrix, wie z.B. durch Ca²⁺-Ionen, resultiert in der Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$. Diese Änderungen des Membranpotentials

können mit dem potentiometrischen Farbstoff TMRM gemessen werden (Protokoll siehe Methoden Abschnitt 2.6) (Thermo Fisher Scientific, 2010). Zur Kalibrierung des Fluoreszenzsignals wurde das Ionophor FCCP verwendet. FCCP permeabilisiert die IMM für Protonen und führt so zur maximal möglichen Depolarisation der Mitochondrien, sodass eine relative Aussage der zuvor gemessenen Fluoreszenzänderungen möglich wird.

In Abbildung 8A sind repräsentative originale Kurvenverläufe der mitochondrialen Membranpotenzial-Messungen am Konfokalmikroskop bei unbehandelten Kontrollen oder bei Behandlung mit 10 nM ET-1 zu sehen. Alle Messungen wurden an elektrisch stimulierten Zellen (0,5 Hz) durchgeführt. Es wurden immer jeweils mehrere Zellen (n) aus mindestens 3 Tieren gemessen. Die Ergebnisse werden als Mittelwert des F/F_0 nach 5, 10, 15 und 20 min mit dem SEM dargestellt.

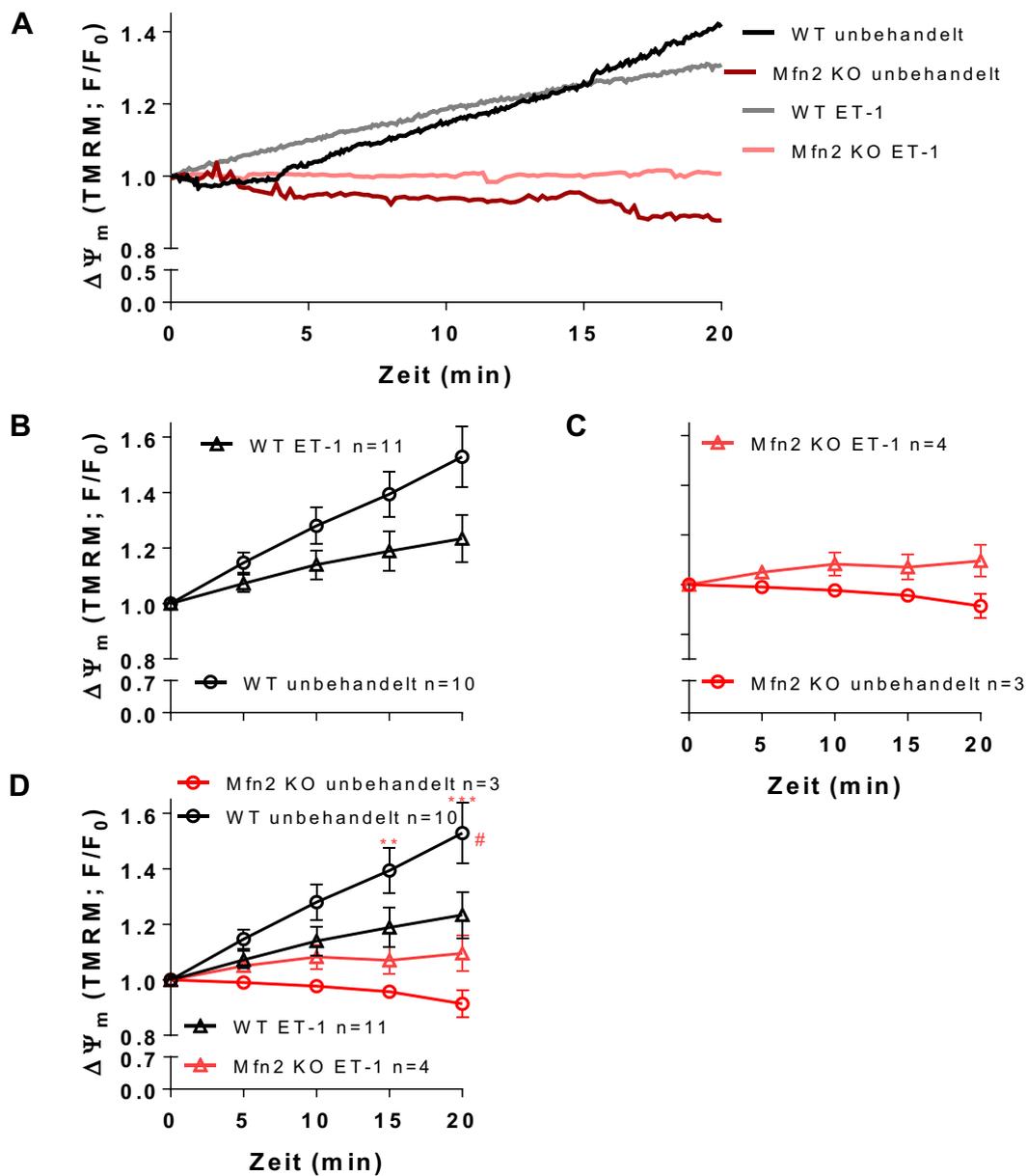


Abb. 8: Mitochondriale Membranpotenzial $\Delta\Psi_m$ in WT und Mfn2 KO Kardiomyozyten

Adulte ventrikuläre Kardiomyozyten der WT und Mfn2 KO Mäuse wurden mit TMRM inkubiert und unter Feldstimulation mit 0,5 Hz dem IP₃ Agonisten ET-1 (10nM) ausgesetzt. (A) repräsentative konfokalmikroskopische Kurvenverläufe aller Gruppen über den Beobachtungszeitraum von 20 min (B-D) # p<0,05 vs. Mfn2 KO unbehandelt (rot) (two-way-ANOVA). **p<0,01, ***p<0,001 vs. Mfn2 KO unbehandelt (rot) (Bonferroni Posttest). Ergebnisse dargestellt als Mittelwert ± SEM.

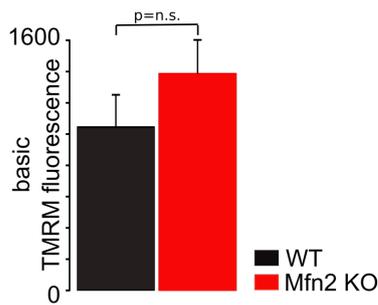


Abb. 9: Basale TMRM Fluoreszenz in WT und Mfn2 KO Kardiomyozyten

Basale TMRM Fluoreszenz zu Beginn der Versuchsdurchführung zwischen WT (schwarz) und Mfn2 KO (rot) Kardiomyozyten. Ergebnisse dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

Unbehandelte Kardiomyozyten aus wildtypischen Mäusen zeigten ein kontinuierlich ansteigendes Signal des mitochondrialen Membranpotenzials $\Delta\Psi_m$ bis zum Ende des Experiments auf ein Maximum von $53\pm 11\%$ (Abbildung 8 B und D). Unter ET-1 zeigte sich ebenfalls ein kontinuierlicher Anstieg des $\Delta\Psi_m$ ($23\pm 8\%$). Dies entsprach keinem Unterschied im $\Delta\Psi_m$ innerhalb der Wildtypen mit oder ohne Zugabe von ET-1.

In Kardiomyozyten aus Mfn2-defizienten Tieren kam es bei Zugabe von ET-1 zu einem leichten Anstieg des $\Delta\Psi_m$ (um $9\pm 6\%$) (Abbildung 8C, D). In den unbehandelten Kardiomyozyten der Mfn2 KO Mäusen fiel das Signal hingegen leicht ab ($-8\pm 5\%$). Diese Resultate unterstützen die Ergebnisse aus den Messungen der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme, in welchen in Mfn2 KO Kardiomyozyten keine relevante mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme beobachtet werden konnte (siehe Abschnitt 3.2).

Ein signifikanter Unterschied des $\Delta\Psi_m$ zeigte sich zwischen den unbehandelten Kardiomyozyten aus Mfn2 KO und wildtypischen Mäusen (Abbildung 8D). Um eine unterschiedliche basale Aktivität der Atmungskette mit daher bereits unter Baseline Bedingungen unterschiedlichem TMRM Fluoreszenzsignal auszuschließen, wurde die absolute TMRM Fluoreszenz in unbehandelten Zellen von Wildtypen und Mfn2 KO Tieren vor jeder Messung erhoben (WT $n=13$, Mfn2 KO $n=4$). Dies zeigte keine signifikanten Unterschiede der basalen Atmungskettenaktivität (Abbildung 9).

3.4 Mitochondriale Superoxidproduktion $\bullet\text{O}_2^-$ in WT und Mfn2 KO

Kardiomyozyten

Eine gesteigerte mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme zieht in der Folge eine gesteigerte Atmungskettenaktivität nach sich, die dann eine vermehrte Produktion von mitochondrialen ROS, vor allem Superoxidradikale ($\bullet\text{O}_2^-$), bedingen könnte. Daher wurden die mitochondriale $\bullet\text{O}_2^-$ -Produktion mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoSOX gemessen (Thermo Fisher Scientific, 2010).

In Abbildung 10A sind repräsentative originale Kurvenverläufe der mitochondrialen Superoxidproduktion $\bullet\text{O}_2^-$ am Konfokalmikroskop bei unbehandelten Kontrollen oder bei Behandlung mit 10 nM ET-1 zu sehen. Alle Messungen wurden an elektrisch stimulierten Zellen (0,5 Hz) durchgeführt. Es wurden immer jeweils mehrere Zellen (n) aus mindestens 3 Tieren gemessen. Die Ergebnisse werden als Mittelwert des F/F_0 nach 5, 10, 15 und 20 min mit dem SEM dargestellt.

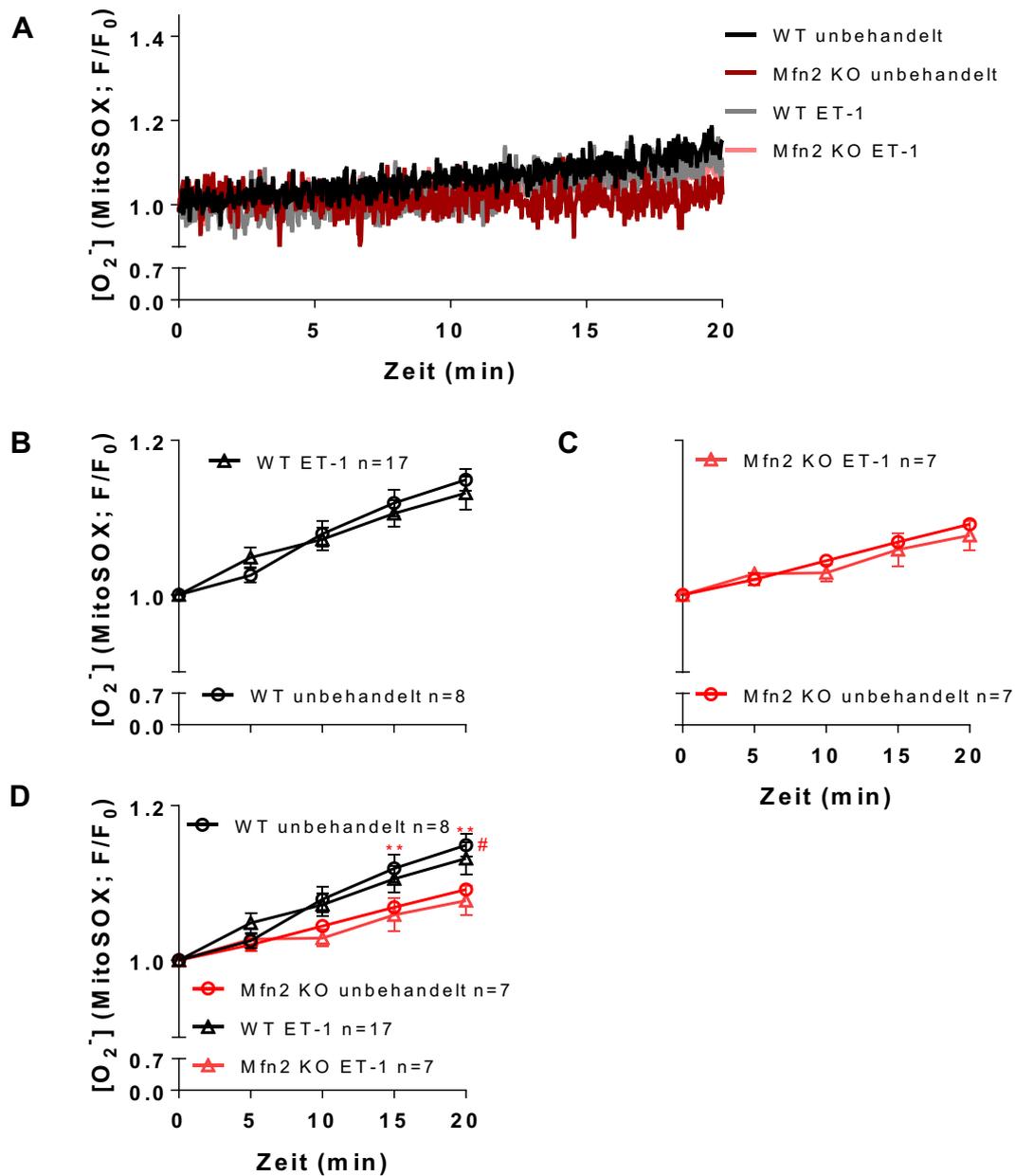


Abb. 10: Mitochondriale Superoxidproduktion in WT und Mfn2 KO Kardiomyozyten

Adulte ventrikuläre Kardiomyozyten der WT und Mfn2 KO Mäuse wurden mit MitoSOX inkubiert und unter Feldstimulation mit 0,5 Hz dem IP₃ Agonisten ET-1 (10nM) ausgesetzt. **(A)** repräsentative konfokalmikroskopische Kurvenverläufe aller Gruppen über den Beobachtungszeitraum von 20 min **(B-D)** # p<0,05 vs. Mfn2 KO unbehandelt (rot) (two-way-ANOVA). **p<0,01 vs. Mfn2 KO unbehandelt (rot) (Bonferroni Posttest). Ergebnisse dargestellt als Mittelwert ± SEM.

Die mitochondriale $\bullet\text{O}_2$ -Produktion stieg unabhängig von ET-1 im zeitlichen Verlauf sowohl in unbehandelten Kardiomyozyten von wildtypischen Mäusen als auch der Mfn2 KO Tiere kontinuierlich an (WT unbehandelt: $15\pm 1\%$; WT ET-1: $13\pm 2\%$; Mfn2 KO unbehandelt: $9\pm 1\%$; Mfn2 KO ET-1: $8\pm 2\%$) (Abbildung 10 B und C). Im Vergleich der jeweiligen unbehandelten Gruppen zeigte sich eine signifikant reduzierte Produktion von $\bullet\text{O}_2$ in den Kardiomyozyten der Mfn2 KO Mäuse (Abbildung 10D).

3.5 Mitochondriale ATP-Gehalt in WT und Mfn2 KO Kardiomyozyten

Da Ca^{2+} im Mitochondrium an mehreren Stellen zu einer Steigerung der Atmungskettenaktivität führt (siehe Einleitung Abschnitt 1.6), wurde der intrazelluläre ATP-Gehalt mittels einer indirekten Nachweismethode gemessen. Dazu wurde der Fluoreszenzfarbstoffes MagFluo4 verwendet. Dieser bindet hochaffin intrazellulär Mg^{2+} und stellt dadurch eine indirekte Möglichkeit dar, auf den intrazellulären ATP Gehalt zu schließen (Dedkova & Blatter, 2012; Garfinkel *et al.*, 1986; Thermo Fisher Scientific, 2010; Zima *et al.*, 2013).

Da Mg^{2+} intrazellulär zu großen Teilen an ATP gebunden vorliegt, wird es bei einem Abfall der ATP-Konzentration in vermehrtem Maße frei (Aromolaran *et al.*, 2007; Dedkova & Blatter, 2012; Garfinkel *et al.*, 1986). Umgekehrt sinkt das Fluoreszenzsignal des Mg^{2+} bei einem Anstieg der ATP-Konzentration. Deshalb können Änderungen des freien Mg^{2+} -Konzentration als reziproke Änderungen des ATP-Gehalts betrachtet werden.

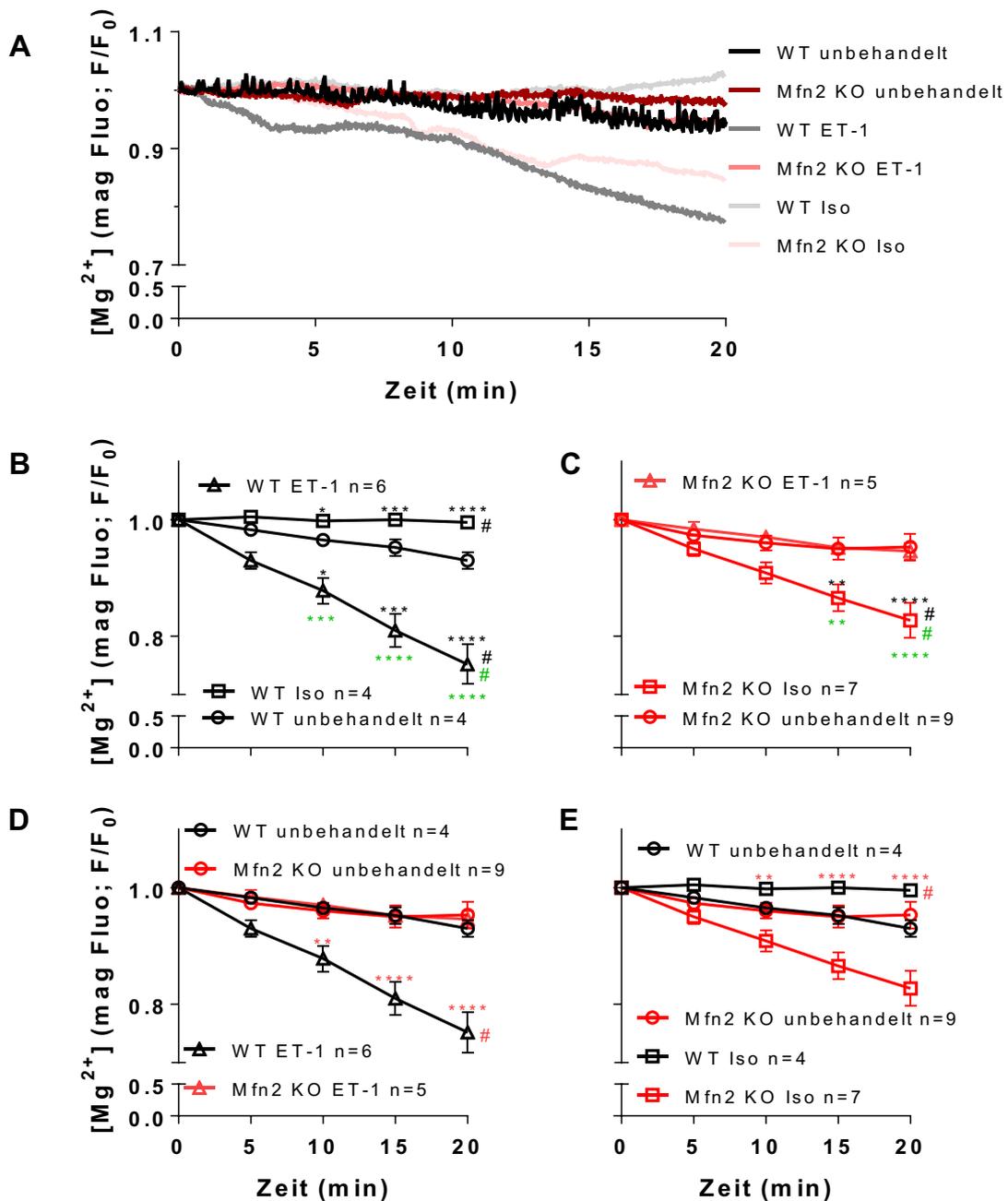


Abb. 11: Mitochondriale ATP-Gehalt in WT und Mfn2 KO Kardiomyozyten

Adulte ventrikuläre Kardiomyozyten der WT und Mfn2 KO Mäuse wurden mit MagFluo4 inkubiert und unter Feldstimulation mit 0,5 Hz dem IP₃ Agonisten ET-1 (10nM) oder dem β-adrenergen Agonisten ISO (500nM) ausgesetzt. **(A)** repräsentative konfokalmikroskopische Kurvenverläufe aller Gruppen über den Beobachtungszeitraum von 20 min **(B-E)** # p<0,05 vs. WT unbehandelt (schwarz) bzw. vs. Mfn2 KO (rot) bzw. vs. ISO (grün) (two-way-ANOVA). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 vs. WT (schwarz) bzw. vs. Mfn2 KO (rot) bzw. vs. ISO (grün) (Bonferroni Posttest). Ergebnisse dargestellt als Mittelwert ± SEM.

In Abbildung 11A sind repräsentative originale Kurvenverläufe der ATP-Messung am Konfokalmikroskop zu sehen, bei denen die unbehandelten Kontrollen oder entweder die Behandlung mit 10 nM ET-1 oder 500 nM ISO erfolgte. Alle Messungen wurden an elektrisch stimulierten Zellen (0,5 Hz) durchgeführt. Es wurden immer jeweils mehrere Zellen (n) aus mindestens 3 Tieren gemessen. Die Ergebnisse werden als Mittelwert des F/F_0 nach 5, 10, 15 und 20 min mit dem SEM dargestellt.

In Kardiomyozyten von wildtypischen Mäusen kam es unter der Behandlung mit ET-1 zu einem kontinuierlichen Abfall der Mg^{2+} -Konzentration, welcher bei Ende des Experiments bei $-25\pm 3\%$ sein Minimum erreichte (Abbildung 11B) (entsprechend einem Anstieg des ATP-Gehaltes). Dieser IP_3R -vermittelte Effekt war in den Kardiomyozyten von Mfn2 KO Tieren hingegen nicht zu beobachten (Abbildung 11C) und zeigte sich signifikant vermindert ($-5\pm 2\%$) im Vergleich zu den unbehandelten wildtypischen Kardiomyozyten. Dies entspricht einer Verminderung des ATP-Gehaltes (Abbildung 11D).

Bei Behandlung mit ISO zeigte sich in den Kardiomyozyten der wildtypischen Mäuse über den Beobachtungszeitraum eine signifikante Erhöhung des Mg^{2+} ($+1\pm 1\%$) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen, im Sinne einer Reduktion des ATP-Gehaltes (Abbildung 11B). In den Mfn2 KO Kardiomyozyten zeigte sich dagegen nach ISO ein signifikanter Abfall der Mg^{2+} -Konzentration im Vergleich zu den unbehandelten und mit ET-1 behandelten Kardiomyozyten. Diese erreichte bei Ende des Experiments ihr Minimum bei $-17\pm 3\%$ und entspricht einem Anstieg des ATP-Gehaltes (Abbildung 11C). Die β -adrenerge Stimulation führte in wildtypischen und Mfn2 KO Kardiomyozyten zu signifikant unterschiedlichen Verläufen, in Wildtypen kommt es zu einer Reduktion und in Mfn2 KO zu einer Steigerung des ATP-Gehaltes (Abbildung 11E).

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse und Modell des metabolischen IP₃ Signalwegs

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurden an isolierten Kardiomyozyten von adulten Kardiomyozyten-spezifischen Mfn2 KO Mäusen sowie deren Wildtyp-Geschwistertieren durchgeführt. Die intakten Kardiomyozyten wurden unter elektrischer Feldstimulation mit 0,5 Hz über einen Beobachtungszeitraum von 20 min einer Stimulation mit Endothelin 1 (ET-1) oder Isoprenalin (ISO) ausgesetzt. Die mitochondrialen Ca²⁺-Signale, das mitochondriale Membranpotenzial $\Delta\Psi_m$, die Superoxidproduktion und der indirekt erhobene ATP-Gehalt wurden konfokalmikroskopisch gemessen.

In der vorliegenden Arbeit überprüften wir die Hypothese, dass in Herzmuskelzellen die intakte Kopplung von Mitochondrium und SR via Mfn2 unter physiologischen Bedingungen (wie etwa normaler IP₃R Expression und zirkulierenden Spiegeln von ET-1) notwendig für die IP₃R-vermittelte Signaltransduktion in die Mitochondrien sind und dort zu einer Anpassung der ATP-Produktion an den zellulären Bedarf führt. In den bisherigen Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass eine Stimulation mit IP₃R Agonisten zu einer mitochondrialen Ca²⁺-Aufnahme via mRyR1 und einer konsekutiven Steigerung des ATP-Gehaltes führte (Seidlmayer *et al.*, 2016). Unter Ruhebedingungen blieb bei β -adrenerger Stimulation mit ISO hingegen der Effekt auf den ATP-Gehalt aus (Seidlmayer *et al.*, 2016). Da die IP₃R vermittelten Ca²⁺-Freisetzungen aus dem SR auf [Ca²⁺]_c im Vergleich zu den RyR2 vermittelten Ca²⁺-Änderungen sehr klein sind, deuten die hier vorgestellten Ergebnisse auf die Notwendigkeit einer intakten SR-mitochondrialen Kopplung durch Mfn2 auf die IP₃-medierte Stimulation der mitochondrialen Ca²⁺-Aufnahme und den ATP-Gehalt.

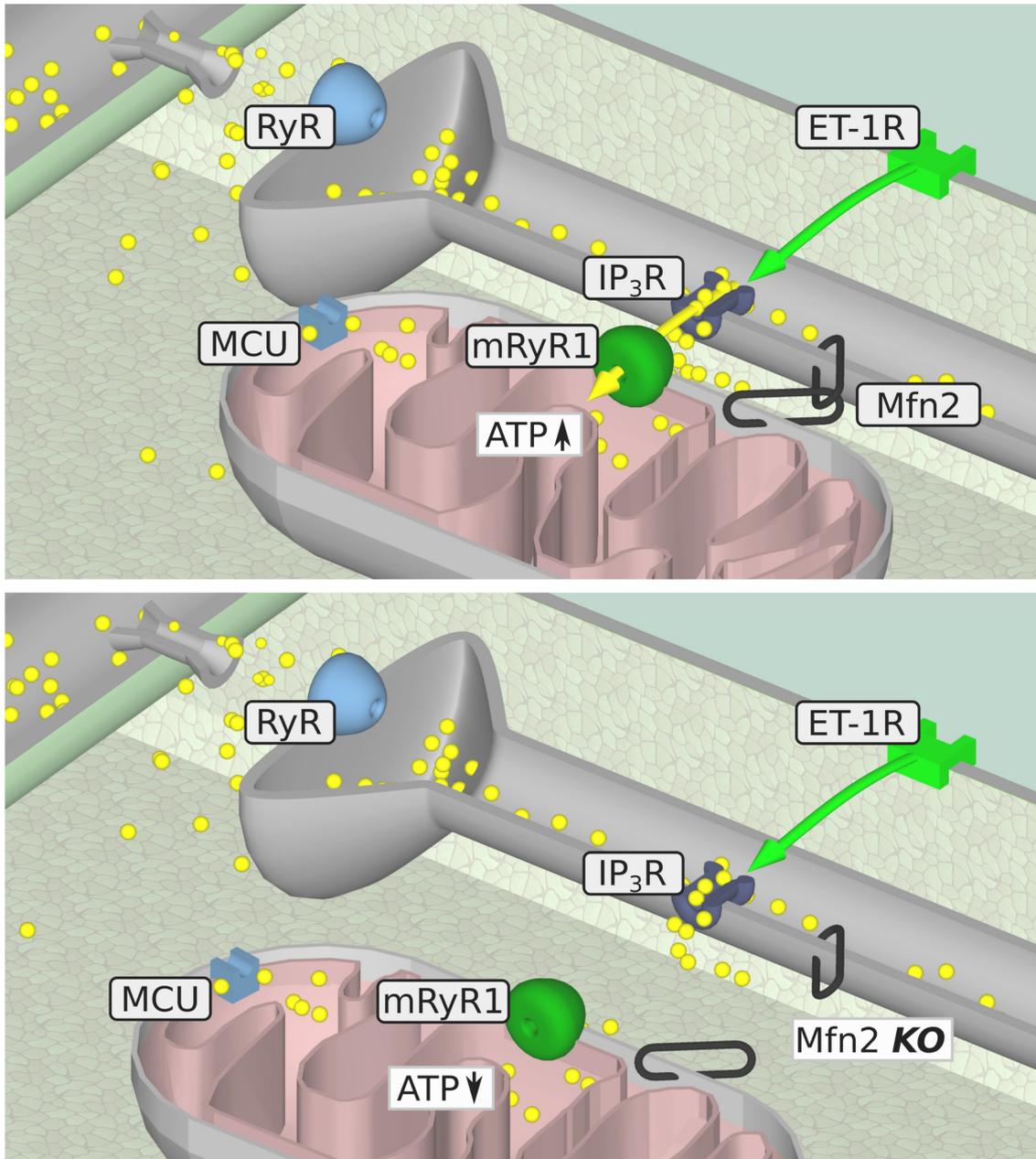


Abb. 12: Zusammenfassendes Modell des metabolischen IP₃ Signalwegs

Oben: Gezeigt ist die intakte Verbindung mit Mfn2, welche eine IP₃ mediierte mitochondriale Ca²⁺-Aufnahme über das SR/Mitochondriale Mikrodomänen vermittelt und somit zu einem gesteigerten mitochondrialen Metabolismus führt. Unten: Bei Verlust der physikalischen Kopplung durch Mfn2 kann das bei ET-1 R Stimulation über den IP₃R frei werdende Ca²⁺ nicht mehr in das Mitochondrium aufgenommen werden und es entfällt eine metabolische Antwort. Gelbe Kreise: Ca²⁺, Gelber Pfeil: Calciumfluss, Grüner Pfeil: IP₃ Vermittlung

Die hier vorgestellten Ergebnisse deuten zudem darauf hin vor, dass der Effekt von ET-1, eine signifikante IP₃-abhängige mitochondriale Ca²⁺-Aufnahme zu generieren, in

Kardiomyozyten von Mfn2-KO Tieren verloren geht. Hingegen kann β -adrenerge Stimulation mit ISO in diesen Tieren weiterhin eine mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme induzieren, die sich nicht von der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme in Wildtypen unterscheidet. Bei Betrachtung der indirekt ermittelten ATP-Level unter IP_3R Stimulation konnte ET-1 in Kardiomyozyten von Mfn2-KO Tieren keine Steigerung des ATP-Gehaltes auslösen und deutet damit auf die Relevanz von Mfn2 als kritische Strukturkomponente zwischen SR und Mitochondrien. Im Gegensatz dazu zeigte sich unter β -adrenerger Stimulation mit ISO in Kardiomyozyten von Mfn2-KO Tieren eine signifikante Erhöhung des ATP-Gehaltes, während in Kardiomyozyten von WT eine Behandlung mit ISO zu einer Verminderung des ATP-Gehaltes führte.

4.2 Einordnung der Ergebnisse in den aktuellen Forschungskontext

Die Beobachtung eines differenziertes Effekts durch ISO ist in Übereinstimmung mit Studien, in denen eine plötzlich gesteigerte Arbeitslast zu einer Abnahme von mitochondrialem NADH (und wahrscheinlich ATP) führte, welches über die Zeit langsam in einer Ca^{2+} abhängigen Weise regeneriert wurde (Brandes & Bers, 1997). Eine andere Untersuchung zeigte zusätzlich, dass eine β -adrenerge Stimulation mit ISO lediglich zu einer transienten MCU-vermittelten Steigerung des Sauerstoffverbrauchs führte und legt damit nahe, dass dem MCU vermutlich nur eine Rolle bei der akuten Anpassung der mitochondrialen Energieproduktion an gesteigerten metabolischen Bedarf zukommt (Kwong *et al.*, 2015). Im zeitlichen Verlauf zeigten sich keine Unterschiede im generellen Sauerstoffverbrauch in den Kardiomyozyten von WT und MCU KO Mäusen, was somit auf die Beteiligung anderer mitochondrialer Ca^{2+} -Aufnahmewege hindeutet, um die Energieproduktion in kardialen Myozyten zu gewährleisten (Kwong *et al.*, 2015). Die hier vorgestellten Ergebnisse lassen vermuten, dass eine IP_3R -mRyR1-vermittelte mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme zu einer langfristigen ATP-Generierung beiträgt und Mfn2 auf diesen Ca^{2+} -Transfer unter physiologischen Bedingungen einen regulativen Effekt besitzt (Abbildung 12). Bei Verlust dieses Effekts in Mfn2 KO Mäusen führt die Stimulation von IP_3R zu keiner ATP Generierung, analog zu Beobachtungen in pathologischen Situationen (Rosca & Hoppel, 2013). Zusammengefasst schlagen

diese Beobachtungen unter physiologischen Bedingungen eine Funktion von Mfn2 als Regulator der Ca^{2+} -abhängigen Energieproduktion nach ET-1 Stimulation vor, wohingegen es bei Verlust der Mfn2-vermittelten Kopplung bereits bei durch ISO erhöhten $[\text{Ca}^{2+}]_c$ zu einer energetische Adaptation mit gesteigertem ATP-Gehalt zu kommen scheint. Zur Interpretation der Daten sollte jedoch auch auf die eingeschränkte Beurteilbarkeit durch die verwendete Nachweismethode verwiesen werden (siehe Abschnitt 2.6 und 3.5). Durch den indirekten Nachweis von ATP über den Mg^{2+} Gehalt lässt sich letztlich nicht eindeutig klären, ob es zu einer gesteigerten Produktion von ATP, einem verminderten Verbrauch oder einer Kombination von beidem kommt. Trotz einer guten Etablierung der Nachweismethode (Seidlmayer *et al.*, 2016; Zima & Blatter, 2004; Zima *et al.*, 2013) ist mitochondriales ATP physiologisch weitestgehend konstant durch Phosphokreatin (PCr) gepuffert und schwankt auch bei großer Beanspruchung des Herzens nur in relativ geringem Maße (Balaban *et al.*, 1986; Bertero & Maack, 2018b).

Im Einklang sind die vorgestellten Daten mit den ursprünglichen Ergebnissen von de Brito und Scorrano (de Brito & Scorrano, 2008) sowie den Nachfolgearbeiten dieser Arbeitsgruppe (Naon *et al.*, 2016), die in murinen embryonalen Mfn2 KO Fibroblasten auf ein IP_3R vermitteltes Signal eine verminderte Ca^{2+} -Aufnahme zeigten. In Arbeiten im gleichen Versuchsmodell von Filadi *et al.* (Filadi *et al.*, 2015) zeigte sich Mfn2 hingegen als „Platzhalter“ zwischen SR und Mitochondrium und die Ablation führte zu einer vermehrten Anlagerung der Organelle aneinander und einer höheren Sensitivität auf proapoptotische Stimuli. Als Erklärung für gestörte SR-mitochondriale Signalvermittlung wurde die Herabregulation des MCU in Mfn2 KO Zellen angeführt (Filadi *et al.*, 2015). In hier nicht dargestellten Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe in murinen Kardiomyozyten konnte kein Unterschied der MCU Expression zwischen Mfn2 KO und WT festgestellt werden (Seidlmayer *et al.*, 2019) und somit sind diese Abweichungen nicht abschließend erklärt.

Bei einer Kardiomyozyten-spezifischen Betrachtung für die Funktion von Mfn2 existieren widersprüchliche Daten: Die vorgestellten Ergebnisse widersprechen den Resultaten von Papanicolaou *et al.* (Papanicolaou *et al.*, 2011), der keine respiratorische Dysfunktion an isolierten Mitochondrien von Mfn2 KO Mäusen feststellen konnte. In dieser Arbeit wurden lediglich ein Anstieg der mitochondrialen Ca^{2+} -Speicherkapazität

und eine Unempfindlichkeit der mPTP gezeigt, allerdings keine veränderte SR-mitochondriale Interaktion (Papanicolaou *et al.*, 2011). Eine mögliche Erklärung wäre ein anderes genetisches Modell, um den Mfn2 KO zu induzieren, welches durch starke Cre-Expression cardiotoxische Effekte in Embryonen und adulten Mäusen besitzt. In dem hier verwendeten Mausmodell, idem zu Chen *et al.* (Chen *et al.*, 2012), erfolgte die Induktion des Mfn2 KO zellkerngerichtet erst nach der Geburt und ist nicht als kardiotoxisch beschrieben. Auch dort konnte durch den Mfn2 KO ein negativer Effekt auf den mitochondrialen Metabolismus auf β -adrenergen Stress gezeigt werden (Chen *et al.*, 2012). Die Störung des Mfn2-medierten intakten SR-mitochondrialen Kontaktes konnte weiterhin in einem Herzinsuffizienzmodell durch transverse aortale Konstriktion in Meerschweinchen beobachtet werden, und führte zu einer verminderten zellulären Erregbarkeit und Kraftentwicklung der Kardiomyozyten (Goh *et al.*, 2016).

Die zirkulierenden Konzentrationen von ET-1 sind typischerweise unter chronischen Stresssituationen wie der chronischen Herzinsuffizienz erhöht (Wei *et al.*, 1994) genauso wie die myokardiale Expression der zugehörigen ET_A-Rezeptoren (Picard *et al.*, 1998; Pieske *et al.*, 1999). Um Herauszufinden, ob eine vermehrte Aktivierung dieses ET-1 Signalwegs kardiale pathologische Effekte hat, entwickelte Yang *et al.* eine Mauslinie mit konditioneller kardialer ET-1 Überexpression (Yang *et al.*, 2004). Dies führte zu einer fast zehnfach erhöhten Konzentration von ET-1 im Herzen, wohingegen sich die zirkulierenden Werte von ET-1 nicht signifikant veränderten. Diese ET-1 überexprimierenden Tiere zeigten eine schwere kardiale Inflammationsreaktion, kardiale Hypertrophie bis hin zur dilatativen Kardiomyopathie und verstarben innerhalb von fünf Wochen nach Induktion (Yang *et al.*, 2004). Andererseits konnte gezeigt werden, dass ein genereller KO von ET-1 (ET-1^{-/-}) in homozygoten Mäusen bereits neonatal letal ist (Kurihara *et al.*, 1994). Bei durch Kaiserschnitt zur Welt gebrachten Tieren am 18.5 Tag postcoitum zeigten sich schwere craniofaciale und kardiale Abnormalitäten, was auf eine kritische Rolle von ET-1 in der Entwicklung schließen lässt (Kurihara, Kurihara, Oda, *et al.*, 1995; Kurihara *et al.*, 1994). Zusätzlich zeigte sich in den ET-1^{-/-} ein reduziertes neonatales Gewicht, Entwicklungsstörungen der Schilddrüse und des Thymus, sowie eine verminderte kardiale sympathische Innervation (Ieda *et al.*, 2004; Kurihara, Kurihara, Maemura, *et al.*, 1995). Heterozygote Versuchstiere, ET-1^{+/-}, zeigten reduzierte

Konzentrationen von ET-1 im Plasma und der Lunge, zeigten aber keine Dysmorphien und waren fertil (Kurihara *et al.*, 1994). Diese ET-1^{+/-} Tiere zeigten bei Betrachtung der kardialen Funktionsparameter allerdings einen erhöhten systolischen, diastolischen und mittleren arteriellen Blutdruck (Kurihara *et al.*, 1994). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass eine zehnfache Erhöhung von ET-1 eindeutig pathologisch zu sein scheint, normale Konzentrationen von ET-1 aber für eine normale physiologische Funktion in Kardiomyozyten notwendig sind.

Offenbar scheint der Effekt von ET-1 auf die genaue (patho)physiologische Situation anzukommen, wodurch die beobachteten unterschiedlichen Reaktionen zwischen den wildtypischen und Mfn2 KO Kardiomyozyten auf ET-1 erklärt werden könnten. Im murinen Myokard verhindern ET-1 nach transverser aortaler Konstriktion etwa eine exzessive Apoptose (Zhao *et al.*, 2006). Diese anti-apoptotische Signalkaskade von ET-1 beinhaltet Calcineurin, die mitochondriale Funktion und die klassischen MEK1/2-ERK1/2 und PI₃-Kinase Signalwege (Iwai-Kanai & Hasegawa, 2004). Es konnte in kultivierten neonatalen Kardiomyozyten der Ratte gezeigt werden, dass ET-1 die frühe Phase der Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie verhindert, indem es zu einer ET_A-Rezeptor vermittelten Hochregulation der antioxidativ wirksamen Mn-SOD kommt (Suzuki & Miyauchi, 2001). Zusätzlich zeigte sich in Ratten, die einem kardialen Ischämie-Reperfusion-Protokoll unterzogen wurden, eine Präkonditionierung mit ET-1 als vorteilhaft im Sinne einer reduzierten Infarktgröße (Gourine *et al.*, 2005). Die transgene Expression von ET-1 in Mäusen, welchen ein funktionelles Gen für endotheliale NO Synthase fehlt, führt zu einer Verbesserung der diastolischen Funktion vermutlich durch die Modulation von oxidativem Stress und einem Shift im metabolischen Substratgebrauch von Fettsäuren hin zu vermehrter Glykolyse (Vignon-Zellweger *et al.*, 2011). Damit übereinstimmend kommt es bei der chronischen Herzinsuffizienz neben vermehrter Glykolyse, was einem metabolischen Kompensationsmechanismus entspricht, zu einer Hypoxie induzierten Factor-1 α -abhängigen Erhöhung der ET-1 Expression (Kakinuma *et al.*, 2001). Auch unsere erhobenen Daten aus den wildtypischen Mäusen unterstützen einen protektiven Effekt von ET-1 auf den kardialen mitochondrialen Metabolismus.

Im Rahmen von pathologischen Veränderungen, wie etwa kardialer Hypertrophie, Herzinsuffizienz oder dilatativer Kardiomyopathie, kommt es zur Heraufregulation der IP₃R auf Proteinebene (Go *et al.*, 1995; Harzheim *et al.*, 2009, 2010; Signore *et al.*, 2013). In einem Hypertrophiemodell von spontan hypertensiven Ratten betraf die gesteigerte Expression vor allem die IP₃R der Diaden (Harzheim *et al.*, 2009). Die Autoren zeigten, dass in diesem Hypertrophiemodell die verstärkten IP₃R-vermittelten Ca²⁺ Signale als Sensitizer für benachbarte RyR2-Aktivierung dienen (analog einer CICR) und somit das diastolische Ca²⁺-Level erhöhten und die Induktion der ECC begünstigten (Harzheim *et al.*, 2009). Sie spekulierten, dass es durch eine gestörte zelluläre Architektur im Rahmen der Hypertrophie zu einer reduzierten Kopplung der LTCC und RyR2 käme, welche somit durch die Überexpression der IP₃R kompensiert werden könnte. In Patch-Clamp Untersuchungen an murinen Ventrikelkardiomyozyten von Signore *et al.* (Signore *et al.*, 2013) zeigte sich unter ET-1 Stimulation zwar ebenfalls ein Einfluss auf das zelluläre elektromechanische Verhalten -etwa ein vermindertes Ruhemembranpotenzial, ein verlängertes Aktionspotenzial, verstärkte und dysregulierte Zellverkürzung- allerdings konnte dagegen keine direkte Beeinflussung der RyR2 durch die IP₃R vermittelten Ca²⁺-Signale gezeigt werden. Wenn man bedenkt, dass es im Rahmen vieler kardialer Pathologien zu einem zellulären Energiedefizit und einer Beeinträchtigung der zellulären Architektur kommt, wäre eine mögliche weitere Erklärung der oft beobachteten IP₃R Überexpression eine versuchte Kompensation des fehlenden IP₃R vermittelte mitochondriale Ca²⁺-Aufnahme. Durch den Verlust der Verbindung zwischen SR und Mitochondrium würde das so freigesetzte Ca²⁺ allerdings nicht mehr ins Mitochondrium aufgenommen werden und zu einer Erhöhung des diastolischen [Ca²⁺]_c führen. Dies wiederum würde eine verstärkte Arrhythmie neigung durch diese unkoordinierten Ca²⁺-Signale erklären, welche auch experimentell vielfach bei Stimulation mit IP₃R Agonisten beobachtet wurde (Harzheim *et al.*, 2009, 2010; Kockskämper *et al.*, 2008; Signore *et al.*, 2013). Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass es durch die Stimulation der ET-1 Rezeptoren in gesunden Kontrolltieren zu einer mitochondrialen Ca²⁺-Aufnahme, einem erhaltenen $\Delta\Psi_m$, einer erhaltenen antioxidativen Kapazität und einer Steigerung des ATP-Gehaltes kommt. Außerdem konnten wir zeigen, dass diese Effekte Mfn2 abhängig sind und somit in der andauernden Debatte um die Funktion von Mfn2 für eine funktionell

positive Kopplung zwischen den SR und Mitochondrium sprechen. Deshalb könnte die Herabregulation von Mfn2 im Rahmen der Herzinsuffizienz zu einer relativen Energiedepletion und zum Fortschreiten der Erkrankung führen. So inhibiert etwa die Hochregulation von Mfn2 die durch Ang II induzierte kardiale Hypertrophie (Yu *et al.*, 2011). Es erfolgt im Rahmen der kardialen Hypertrophie einer Herzinsuffizienz eine Hochregulation der Expression für verschiedene microRNAs, zum Beispiel etwa der microRNA-106a (Guan *et al.*, 2016), microRNA-195-3p (Wang *et al.*, 2019) oder microRNA-20 (Sun *et al.*, 2019). Diese microRNAs interagieren mit der mRNA für Mfn2 und führen zu dessen verminderter Expression. Interessanterweise konnte in einem kultivierten Kardiomyozyten Modell von Guan *et al.* eine kompensatorische Überexpression von Mfn2 eine microRNA-106a induzierte Hypertrophie reversieren (Guan *et al.*, 2016). Diese Ergebnisse unterstreichen nicht nur die Relevanz und komplexen Regulationsmechanismen von Mfn2 und damit der SR-mitochondrialen Kopplung, sondern stellen eine microRNA Inhibition als möglichen Downstream-Angriffspunkt der kardialen Hypertrophie in Aussicht (Guan *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019).

Zu überlegen wäre auch, ob es zusätzlich noch weitere relevante koppelnde Proteine zwischen dem SR und Mitochondrium gibt, und welchen Einfluss diese auf die postulierte metabolische IP₃R-mRyR1-Achse haben. Zur Überwindung der OMM passiert Ca²⁺ den unspezifischen VDAC, der eine hohe Ionenleitfähigkeit aufweist (Shoshan-Barmatz *et al.*, 2017). Zahlreiche Studien zeigten die hohe Ca²⁺-Permeabilität des VDAC1 und dessen Eigenschaft auf die Verfügbarkeit von Ca²⁺ im IMR (De Stefani *et al.*, 2012; Gincel *et al.*, 2001; Rapizzi *et al.*, 2002). In nicht erregbaren Zellen stellt beispielsweise glucose-regulated protein 75 (grp 75) und Sigma- 1 Receptor als sogenannte chaperone eine Verbindung zwischen dem IP₃R1 und dem VDAC1 der OMM dar und beeinflussen die Calciumsensitivität (Hayashi & Su, 2007; Szabadkai *et al.*, 2006). In einem Ischämie/Reperusionsmodell in H9c2 Kardiomyoblasten konnte durch eine Inhibierung von einem der beteiligten Proteine dieser Achse (IP₃R, grp75, VDAC1) ein Schutz vor mitochondrialer Calciumüberladung und konsekutiver Öffnung der mPTP erzielt werden (Paillard *et al.*, 2013). Der Einfluss von grp75 auf die metabolische IP₃R-mRyR1 Achse unter physiologischen Bedingungen bleibt allerdings unklar. FUNDC1, als Protein der

OMM ist ein weitere Kandidat, von dem kürzlich gezeigt werden konnte, dass er im Herzen eine physische Kopplung im Bereich der Diaden zwischen IP₃R2 und Mitochondrien herstellt (Wu *et al.*, 2017). Bei FUNDC1 Herabregulation in Mäusen konnte eine Reduktion der Kontaktlänge zwischen SR und Mitochondrien um ~80% festgestellt werden, sowie eine verminderte mitochondriale Ca²⁺-Aufnahme und kardiale Dysfunktion (Wu *et al.*, 2017). Min *et al.* (Min *et al.*, 2012) zeigte in adulten Kardiomyozyten der Ratte und HL-1 Zellen eine funktionell relevante physikalische Kopplung von RyR2 und VDAC2 speziell in der subsarkolemmalen Region. Beim genetisch induzierten Wegfall von VDAC2 mittels „short hairpin RNA“ stieg die diastolische [Ca²⁺]_c und eine mitochondriale Ca²⁺-Aufnahme wurde unterbunden (Min *et al.*, 2012). Kürzlich konnte Thai *et al.* zusätzlich die Relevanz des 18-kDa OMM Transportprotein TSPO für die mitochondriale Ca²⁺-Aufnahme und den Erhalt der zellulären Bioenergetik zeigen (Thai *et al.*, 2018)

Unter Laborbedingungen in einem H9c2 Kardiomyoblasten Modell der Ischämie/Reperfusion konnte die Herabregulierung von Mfn2 vor einer mitochondrialen Calciumüberladung schützen (Paillard *et al.*, 2013). Interessanterweise konnte dies auf eine verminderte Interaktion des Signalkomplexes aus IP₃R1/grp75/VDAC1 zurückgeführt werden und lässt auf eine mögliche Abhängigkeit von Mfn2 auf IP₃ vermittelte Signale schließen. Da der Fokus dieser Studie auf der Interaktion von Cyclophilin D -einem mitochondrialem Chaperon das zur Öffnung der mPTP führen kann- mit dem IP₃R1/grp75/VDAC1-Komplex lag, wurde die pathologische Relevanz dieser Achse für die mitochondriale Calciumüberladung bei Ischämie/Reperfusion gezeigt (Paillard *et al.*, 2013), aber keine mögliche physiologische Funktion untersucht. In einer Studie von Michels *et al.* (Michels *et al.*, 2009) konnten bei Patch-Clamp Untersuchungen an IMM ebenfalls zwei verschiedene mitochondriale Ca²⁺-Aufnahmekanäle detektiert werden. Während der erste (mCa1) der beiden die typische Kinetik des MCU zeigte und auch durch den MCU-Blocker Ru360 blockiert wurde, zeigte der zweite (mCa2) eine dem mRyR1 ähnliche Kinetik. Durch Verwendung des mRyR1 Blockers Dantrolene konnte der zweite allerdings nicht blockiert werden, weshalb die Autoren eine Beteiligung des mRyR1 eher ausschlossen. Eine weitere mögliche Spekulation wäre eine direkte Beteiligung von weiteren Strukturelementen (wie

etwa einer Verbindung via Mfn2) an der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme, die in isolierten IMM entfällt. Eine direkte Beteiligung von Mfn2 an der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme scheint unwahrscheinlich, wenn man den fehlenden Phänotyp von jungen Mfn2 KO Tieren bedenkt. Allerdings kommt es in diesen Tieren vielleicht zu metabolischen Kompensationsmechanismen analog zu den hier gezeigten verschiedenen Reaktionen auf ISO. Das Zusammenspiel von strukturellen Kopplungen zwischen ER/SR und Mitochondrien und dem Ca^{2+} -Transfer scheint komplex und multifaktoriell beeinflusst. Es könnten also neben Mfn2 eine Vielzahl von funktionell relevanten Verbindungen zwischen SR/ER und der OMM bestehen, die nur in ihrer gesamten Komplexität eine Mikrodomäne entstehen lassen, die eine physiologische Ca^{2+} -Interaktion unterstützen.

Unseren Erwartungen entsprechend zeigte sich in den Mfn2 KO Kardiomyozyten nach ET-1 Stimulation eine signifikant verminderte mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme und auch die Steigerung des ATP-Gehalts blieb aus. In Wildtypen stieg das mitochondriale Membranpotenzial $\Delta\Psi_m$ an, wobei dieser Effekt durch die IP_3R -Stimulation leicht vermindert wurde. In Mfn2 KO Tieren hingegen kam es zu einer Depolarisation von $\Delta\Psi_m$, wobei dies durch Zugabe von ET-1 leicht reduziert wurde. Diese Ergebnisse stimmen nur bedingt mit den Ergebnissen der Vorarbeiten der Arbeitsgruppe überein, die eine IP_3 -induzierte Aufnahme von mitochondrialem Ca^{2+} mit konsekutiver Aktivierung der oxidativen Phosphorylierung und einer Abnahme von $\Delta\Psi_m$ zeigen konnte (Seidlmayer *et al.*, 2016). Im Gegensatz zu den jetzigen Ergebnissen waren damals allerdings quieszente Zellen verwendet worden (Seidlmayer *et al.*, 2016). Eine Reduktion von $\Delta\Psi_m$ würde durch eine ADP-induzierte Aktivierung der Atmungskette stattfinden, sodass nicht feldstimulierte Zellen keine klare Aussage über den Energieverbrauch zulassen. Vielmehr scheint ET-1 in den Ergebnissen der hier verwendeten Mauslinien zu einer Stabilisierung von $\Delta\Psi_m$ beizutragen. Da $\Delta\Psi_m$ jedoch einer fein abgestimmten und dynamischen „Up- und Downstream“-Regulation von oxidativen Phosphorylierung und Ca^{2+} -Aufnahme unterliegt, ist die verwendete Nachweismethode eingeschränkt beurteilbar hinsichtlich der Ursache dieser Stabilisierung. Interessanterweise waren die basalen Fluoreszenzwerte des $\Delta\Psi_m$ zwischen den Mfn2 KO und den WT Kardiomyozyten nicht unterschiedlich, was in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Chen *et al.* ist (Chen *et al.*, 2012). Dies

weist auf eine intakte Atmungskettenaktivität hin und widerlegt direkte Mfn2-assoziierte Veränderungen des $\Delta\Psi_m$. In Kontrast zu den Daten von Chen et al. (Chen *et al.*, 2012) zeigte sich in unseren Ergebnissen im längeren zeitlichen Verlauf von 20 min ein (von ET-1 unabhängiger) Unterschied in der Superoxid-Produktion zwischen Mfn2 KO und Wildtypen. Es zeigte sich eine verminderte Superoxidbildung in den Mfn2 KO Kardiomyozyten, die auf den ebenfalls beobachteten verminderten mitochondrialen Metabolismus zurückgeführt werden könnte. Diese Beobachtung ist auch in Übereinstimmung mit Arbeiten, die Mfn2 Verlust als protektiven Faktor gegen oxidativen Stress bei Ischämie/Reperfusionsexperimenten in Kardiomyozyten identifizierten (Hall *et al.*, 2016). In den Wildtypen dagegen existieren vielleicht ausreichend energieabhängige antioxidative Kapazitäten, um einer Superoxidproduktion entgegen zu wirken oder diese rasch zu entgiften und damit die ROS Produktion und Elimination im Gleichgewicht stehen zu lassen (Bertero & Maack, 2018a; Kohlhaas *et al.*, 2017). Hierzu wären in unseren verwendeten Mauslinien weitere detaillierte Untersuchungen interessant, da der verwendete Fluoreszenzfarbstoff limitierend spezifisch Superoxidanionen nachweist, andere ROS aber nicht erfasst (Thermo Fisher Scientific, 2010).

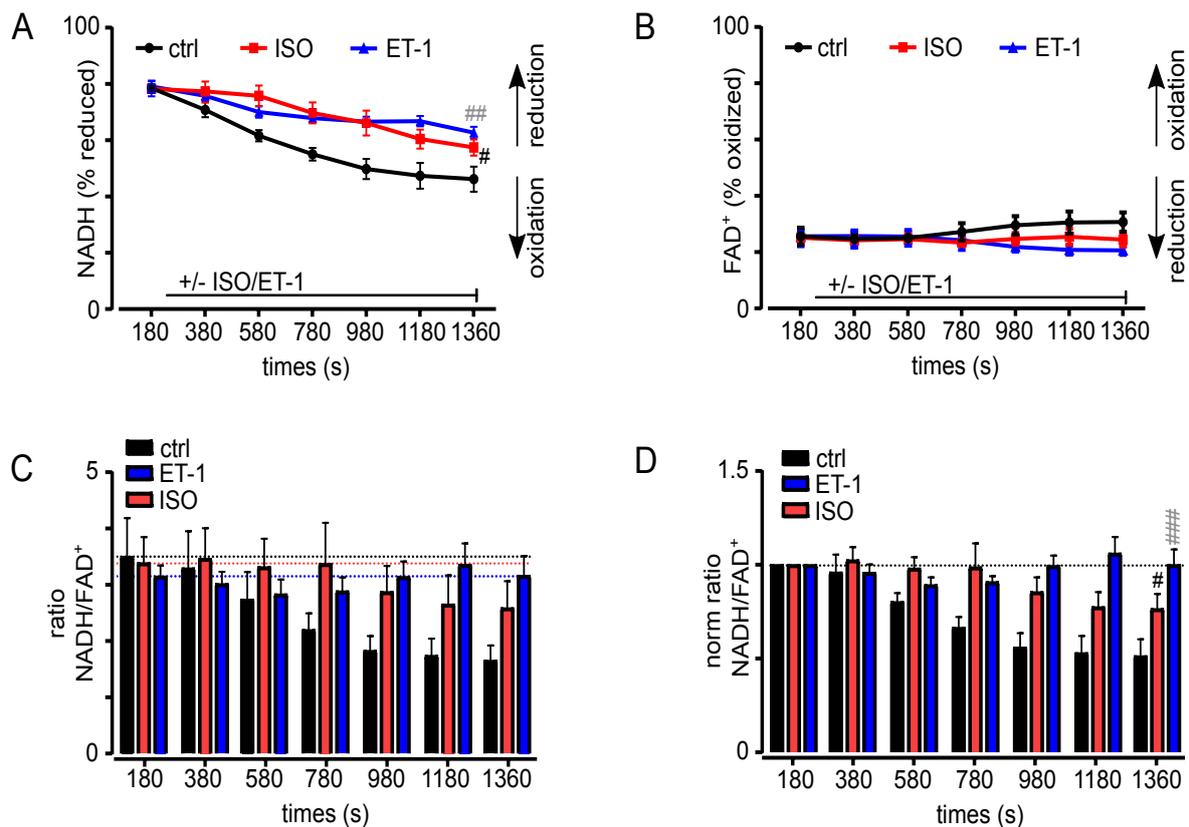


Abb. 13: Mitochondrialer Redoxstatus in Mfn2 KO Kardiomyozyten

Adulte Ventrikelkardiomyozyten der WT Mäuse wurden unter elektrischer Feldstimulation mit 0,5 Hz dem IP₃ Agonisten ET-1 (10nM, n=6) oder dem β -adrenergen Agonisten ISO (500nM, n=6) ausgesetzt (ctrl, unbehandelt n=7). Es erfolgte die Messung der Autofluoreszenz von (A) NADH, (B) FAD⁺ sowie die Bestimmung des Quotienten NADH/FAD⁺ ohne (C) und mit (D) Normalisierung auf den 3 min Wert. # p<0,05, ##<0,01, ###p<0,001 ISO vs. unbehandelte (schwarz) bzw. ET-1 vs unbehandelt (grau) (two-way-ANOVA). Daten aus 4 Tieren. Ergebnisse dargestellt als Mittelwert \pm SEM. (Seidlmayer *et al.*, 2019)

Über die oben gezeigten Daten des mitochondrialen Membranpotenzials und Superoxidproduktion hinaus gehend, erfolgte eine Messung des Redox-Status der Kardiomyozyten von WT Kardiomyozyten (Seidlmayer *et al.*, 2019) (Abbildung 13). Dabei wurden die Relationen von NADH/NAD⁺ und FADH₂/FAD sowie das Verhältnis von NADH/FAD untersucht. In den unbehandelten Kardiomyozyten zeigte sich über die gesamte Beobachtungsdauer ein kontinuierlicher Trend hin zur Oxidation, im Sinne einer Energiedepletion. Während es sowohl unter ET-1 und ISO Stimulation zur Abnahme des reduzierten NADH kam, waren die Änderungen auf den normalisierten netto NADH/FAD Quotienten in den mit ET-1 behandelten Kardiomyozyten im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen weniger stark ausgeprägt als in mit ISO behandelten

Kardiomyozyten (Seidlmayer *et al.*, 2019). Diese Ergebnisse unterstreichen den IP₃R-mR_{YR}1 Signalweg als wichtiges Element des basalen langsamen Energiestoffwechsels in ventrikulären Kardiomyozyten. Zusammengenommen deuten auch diese Ergebnisse auf eine funktionell relevante Kopplung von SR und Mitochondrium durch Mfn2, die eine Rolle in der langsamen bioenergetischen Adaptation durch die IP₃ Signalachse vermuten lässt und durch zukünftige Experimente weiter untersucht werden sollte.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Herzinsuffizienz ist pathophysiologisch unter anderem durch eine neuroendokrine Aktivierung, Dysregulation des zellulären Energiehaushaltes und Veränderungen der subzellulären Architektur gekennzeichnet (Remodelling) (Bertero & Maack, 2018b; Tanai & Frantz, 2015). Das Herz ist physiologisch auf einen fein regulierten und ausgeglichenen bioenergetischen Energiehaushalt angewiesen, um auf akute Belastungssituationen adäquat reagieren zu können und oxidativen Stress zu vermeiden (Bertero & Maack, 2018a; Kohlhaas *et al.*, 2017). Ca^{2+} reguliert zentral sowohl die zyklischen Kontraktions-/Relaxationsprozesse (ECC) als auch unmittelbar den mitochondrialen Metabolismus. Der ECC liegt in den Kardiomyozyten die Ca^{2+} -Freisetzung durch die RyR2 zu Grunde; die IP_3 Rezeptoren des SR führen davon unabhängig zu einer Ca^{2+} Freisetzung aus dem SR (Kockskämper *et al.*, 2008). Diese IP_3 R vermittelten Signale werden in den räumlich nahe gelegenen Mitochondrien über den mRyR1 in die mitochondriale Matrix aufgenommen und stimulieren dort langfristig die oxidative Phosphorylierung, die für eine gesteigerte ATP-Produktion und den Erhalt der antioxidativen Kapazität verantwortlich sind (Seidlmayer *et al.*, 2016). Die enge räumliche Nähe zwischen SR und Mitochondrien wird durch Strukturproteine wie Mitofusin 2 ergänzt, die das SR mit der äußeren Mitochondrienmembran koppeln und so die Ca^{2+} -Interaktion beeinflussen (Chen *et al.*, 2012; Dorn & Maack, 2013).

Ziel der Arbeit war, den Effekt von Mfn2 Defizienz auf die IP_3 induzierte mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme in Kardiomyozyten zu evaluieren. Dazu erfolgten Fluoreszenzfärbungen an adulten isolierten Ventrikelkardiomyozyten kardiospezifischer Mfn2 KO Mäusen bzw. deren wildtypischen Geschwistertieren. Erhobene Parameter umfassten das mitochondriale Ca^{2+} , das mitochondriale Membranpotenzial, die mitochondriale Superoxidbildung und mitochondriale ATP-Gehalt.

Die Ergebnisse bestätigen eine Signalachse, bei der die Stimulation von isolierten murinen Kardiomyozyten mit dem IP_3 Agonisten ET-1 zu einer mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme führt, dem Erhalt des mitochondrialen Membranpotenzials dient und der ATP-

Gehalt steigt (Seidlmayer *et al.*, 2016, 2019). Bei induzierter kardiospezifischer Ablation von Mfn2 geht diese SR-mitochondriale Interaktion verloren, und es entsteht ein energetisches Defizit und eine verminderte Superoxidbildung. Bei β -adrenerger Stimulation mit ISO resultiert in WT zwar eine mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme, allerdings ein Abfall des ATP-Gehaltes. In den Mfn2 defizienten Kardiomyozyten zeigt sich eine Steigerung des ATP-Gehaltes auch auf β -adrenerge Stimulation, die einen energetischen Kompensationsmechanismus in den Mfn2 KO Tieren vermuten lässt (Seidlmayer *et al.*, 2019).

Dies identifiziert Mfn2 als kritische Strukturkomponente für die langfristige bioenergetische Adaptation der durch IP_3R vermittelten Signalachse unter physiologischen Bedingungen. Zusätzlich unterstreicht dies die funktionelle Relevanz des pathologischen Remodellings im Rahmen der Herzinsuffizienz auf den mitochondrialen Energiehaushalt und deutet auf mögliche therapeutische Ansatzpunkte in dieser fein abgestimmten SR-mitochondrialen Ca^{2+} -Transmission.

6 Literaturverzeichnis

Altschafli, B.A., Beutner, G., Sharma, V.K., Sheu, S.-S. & Valdivia, H.H. 2007. The mitochondrial ryanodine receptor in rat heart: a pharmaco-kinetic profile. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 1768(7):1784–1795.

Aon, M.A., Cortassa, S. & O'Rourke, B. 2010. Redox-optimized ROS balance: a unifying hypothesis. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 1797(6–7):865–877.

Armoundas, A.A., Hobai, I.A., Tomaselli, G.F., Winslow, R.L. & O'Rourke, B. 2003. Role of Sodium-Calcium Exchanger in Modulating the Action Potential of Ventricular Myocytes From Normal and Failing Hearts. *Circulation research*. 93(1):46–53.

Aromolaran, A.S., Zima, A.V. & Blatter, L.A. 2007. Role of glycolytically generated ATP for CaMKII-mediated regulation of intracellular Ca²⁺ signaling in bovine vascular endothelial cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. 293(1):C106–118.

Balaban, R.S. 2009a. Domestication of the cardiac mitochondrion for energy conversion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 46(6):832–841.

Balaban, R.S. 2009b. The role of Ca²⁺ signaling in the coordination of mitochondrial ATP production with cardiac work. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 1787(11):1334–1341.

Balaban, R.S., Kantor, H.L., Katz, L.A. & Briggs, R.W. 1986. Relation between work and phosphate metabolite in the in vivo paced mammalian heart. *Science (New York, N.Y.)*. 232(4754):1121–1123.

Bare, D.J., Kettlun, C.S., Liang, M., Bers, D.M. & Mignery, G.A. 2005. Cardiac type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: interaction and modulation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *The Journal of Biological Chemistry*. 280(16):15912–15920.

Barth, E., Stämmler, G., Speiser, B. & Schaper, J. 1992. Ultrastructural quantitation of mitochondria and myofilaments in cardiac muscle from 10 different animal species including man. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 24(7):669–681.

Beikoghli Kalkhoran, S., Hall, A.R., White, I.J., Cooper, J., Fan, Q., ... Hausenloy, D.J. 2017. Assessing the effects of mitofusin 2 deficiency in the adult heart using 3D electron tomography. *Physiological Reports*. 5(17).

Berridge, M.J., Lipp, P. & Bootman, M.D. 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 1(1):11–21.

- Bers, D.M. 2001. *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*. Second Edition ed. Springer. <http://www.springer.com/gp/book/9780792371571> Date of access: 20 Mar. 2017.
- Bers, D.M. 2002. Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature*. 415(6868):198–205.
- Bers, D.M. 2006. Altered Cardiac Myocyte Ca Regulation In Heart Failure. *Physiology*. 21(6):380–387.
- Bers, D.M. & Guo, T. 2005. Calcium signaling in cardiac ventricular myocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1047:86–98.
- Bertero, E. & Maack, C. 2018a. Calcium Signaling and Reactive Oxygen Species in Mitochondria. *Circulation Research*. 122(10):1460–1478.
- Bertero, E. & Maack, C. 2018b. Metabolic remodelling in heart failure. *Nature Reviews. Cardiology*. 15(8):457–470.
- Beutner, G., Sharma, V.K., Giovannucci, D.R., Yule, D.I. & Sheu, S.S. 2001. Identification of a ryanodine receptor in rat heart mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*. 276(24):21482–21488.
- Beutner, G., Sharma, V.K., Lin, L., Ryu, S.-Y., Dirksen, R.T. & Sheu, S.-S. 2005. Type 1 ryanodine receptor in cardiac mitochondria: Transducer of excitation–metabolism coupling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1717(1):1–10.
- Bezprozvanny, I. 2005. The inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Cell Calcium*. 38(3):261–272.
- Brandes, R. & Bers, D.M. 1997. Intracellular Ca²⁺ Increases the Mitochondrial NADH Concentration During Elevated Work in Intact Cardiac Muscle. *Circulation Research*. 80(1):82–87.
- Braunwald, E. 2013. Heart failure. *JACC. Heart failure*. 1(1):1–20.
- Bravo-Sagua, R., Rodriguez, A.E., Kuzmicic, J., Gutierrez, T., Lopez-Crisosto, C., ... Lavandero, S. 2013. Cell Death and Survival Through the Endoplasmic Reticulum-Mitochondrial Axis. *Current molecular medicine*. 13(2):317–329.
- de Brito, O.M. & Scorrano, L. 2008. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature*. 456(7222):605–610.
- Cárdenas, C., Miller, R.A., Smith, I., Bui, T., Molgó, J., ... Foskett, J.K. 2010. Essential Regulation of Cell Bioenergetics By Constitutive InsP3 Receptor Ca²⁺ Transfer to Mitochondria. *Cell*. 142(2):270–283.

- Chen, Y. & Dorn, G.W. 2013. PINK1- Phosphorylated Mitofusin 2 is a Parkin Receptor for Culling Damaged Mitochondria. *Science (New York, N.Y.)*. 340(6131):471–475.
- Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E. & Chan, D.C. 2003. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *The Journal of Cell Biology*. 160(2):189–200.
- Chen, Y., Liu, Y. & Dorn, G.W. 2011. Mitochondrial fusion is essential for organelle function and cardiac homeostasis. *Circulation Research*. 109(12):1327–1331.
- Chen, Y., Csordás, G., Jowdy, C., Schneider, T.G., Csordás, N., ... Maack, C. 2012. Mitofusin 2-containing mitochondrial-reticular microdomains direct rapid cardiomyocyte bioenergetic responses via interorganelle Ca(2+) crosstalk. *Circulation Research*. 111(7):863–875.
- Cooling, M., Hunter, P. & Crampin, E.J. 2007. Modeling hypertrophic IP3 transients in the cardiac myocyte. *Biophysical Journal*. 93(10):3421–3433.
- Cortassa, S., O'Rourke, B. & Aon, M.A. 2014. Redox-optimized ROS balance and the relationship between mitochondrial respiration and ROS. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 1837(2):287–295.
- Cosson, P., Marchetti, A., Ravazzola, M. & Orci, L. 2012. Mitofusin-2 Independent Juxtaposition of Endoplasmic Reticulum and Mitochondria: An Ultrastructural Study. *PLoS ONE*. 7(9).
- Csordás, G., Renken, C., Várnai, P., Walter, L., Weaver, D., ... Hajnóczky, G. 2006. Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *The Journal of Cell Biology*. 174(7):915–921.
- Csordás, G., Várnai, P., Golenár, T., Roy, S., Purkins, G., ... Hajnóczky, G. 2010. Imaging interorganelle contacts and local calcium dynamics at the ER-mitochondrial interface. *Molecular cell*. 39(1):121–132.
- Csordás, G., Weaver, D. & Hajnóczky, G. 2018. Endoplasmic Reticulum-Mitochondrial Contactology: Structure and Signaling Functions. *Trends in Cell Biology*. 28(7):523–540.
- De Stefani, D., Bononi, A., Romagnoli, A., Messina, A., De Pinto, V., ... Rizzuto, R. 2012. VDAC1 selectively transfers apoptotic Ca²⁺ signals to mitochondria. *Cell Death and Differentiation*. 19(2):267–273.
- Dedkova, E.N. & Blatter, L.A. 2012. Measuring mitochondrial function in intact cardiac myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 52(1):48–61.
- Dedkova, E.N. & Blatter, L.A. 2013. Calcium signaling in cardiac mitochondria. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 58:125–133.

- Denton, R.M. 2009. Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 1787(11):1309–1316.
- Denton, R.M. & McCormack, J.G. 1980. The role of calcium in the regulation of mitochondrial metabolism. *Biochemical Society Transactions*. 8(3):266–268.
- Dhein, S., Mohr, F.W. & Delmar, M. 2004. *Practical Methods in Cardiovascular Research*. 2005th ed. Berlin: Springer.
- Domeier, T.L., Zima, A.V., Maxwell, J.T., Huke, S., Mignery, G.A. & Blatter, L.A. 2008. IP₃ receptor-dependent Ca²⁺ release modulates excitation-contraction coupling in rabbit ventricular myocytes. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 294(2):H596-604.
- Dorn, G.W. 2013. Mitochondrial dynamics in heart disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1833(1):233–241.
- Dorn, G.W. 2015. Mitochondrial dynamism and heart disease: changing shape and shaping change. *EMBO Molecular Medicine*. 7(7):865–877.
- Dorn, G.W. & Maack, C. 2013. SR and mitochondria: calcium cross-talk between kissing cousins. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 55:42–49.
- Dunlay, S.M., Weston, S.A., Jacobsen, S.J. & Roger, V.L. 2009. Risk Factors for Heart Failure: A Population-Based Case-Control Study. *The American journal of medicine*. 122(11):1023–1028.
- Fabiato, A. 1983. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *The American Journal of Physiology*. 245(1):C1-14.
- Farmakis, D., Stafylas, P., Giamouzis, G., Maniadakis, N. & Parissis, J. 2016. The medical and socioeconomic burden of heart failure: A comparative delineation with cancer. *International Journal of Cardiology*. 203:279–281.
- Filadi, R., Greotti, E., Turacchio, G., Luini, A., Pozzan, T. & Pizzo, P. 2015. Mitofusin 2 ablation increases endoplasmic reticulum–mitochondria coupling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 112(17):E2174–E2181.
- Filadi, R., Greotti, E., Turacchio, G., Luini, A., Pozzan, T. & Pizzo, P. 2017. On the role of Mitofusin 2 in endoplasmic reticulum–mitochondria tethering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 114(12):E2266–E2267.
- Filadi, R., Pendin, D. & Pizzo, P. 2018. Mitofusin 2: from functions to disease. *Cell Death & Disease*. 9(3).
- Fill, M. & Copello, J.A. 2002. Ryanodine receptor calcium release channels.

Physiological Reviews. 82(4):893–922.

Foskett, J.K., White, C., Cheung, K.-H. & Mak, D.D. 2007. Inositol Trisphosphate Receptor Ca²⁺ Release Channels. *Physiological reviews*. 87(2):593–658.

Franzini-Armstrong, C. 2007. ER-Mitochondria Communication. How Privileged? *Physiology*. 22(4):261–268.

García-Pérez, C., Schneider, T.G., Hajnóczky, G. & Csordás, G. 2011. Alignment of sarcoplasmic reticulum-mitochondrial junctions with mitochondrial contact points. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 301(5):H1907-1915.

Garfinkel, L., Altschuld, R.A. & Garfinkel, D. 1986. Magnesium in cardiac energy metabolism. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 18(10):1003–1013.

Giacomello, M., Drago, I., Bortolozzi, M., Scorzeto, M., Gianelle, A., ... Pozzan, T. 2010. Ca²⁺ hot spots on the mitochondrial surface are generated by Ca²⁺ mobilization from stores, but not by activation of store-operated Ca²⁺ channels. *Molecular Cell*. 38(2):280–290.

Gincel, D., Zaid, H. & Shoshan-Barmatz, V. 2001. Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *The Biochemical Journal*. 358(Pt 1):147–155.

Giorgi, C., De Stefani, D., Bononi, A., Rizzuto, R. & Pinton, P. 2009. Structural and functional link between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 41(10):1817–1827.

Go, L.O., Moschella, M.C., Watras, J., Handa, K.K., Fyfe, B.S. & Marks, A.R. 1995. Differential regulation of two types of intracellular calcium release channels during end-stage heart failure. *The Journal of Clinical Investigation*. 95(2):888–894.

Goh, K.Y., Qu, J., Hong, H., Liu, T., Dell'Italia, L.J., ... Zhou, L. 2016. Impaired mitochondrial network excitability in failing guinea-pig cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*. 109(1):79–89.

Gomez-Suaga, P., Paillusson, S., Stoica, R., Noble, W., Hanger, D.P. & Miller, C.C.J. 2017. The ER-Mitochondria Tethering Complex VAPB-PTPIP51 Regulates Autophagy. *Current biology: CB*. 27(3):371–385.

Gourine, A.V., Molosh, A.I., Poputnikov, D., Bulhak, A., Sjöquist, P.-O. & Pernow, J. 2005. Endothelin-1 exerts a preconditioning-like cardioprotective effect against ischaemia/reperfusion injury via the ET(A) receptor and the mitochondrial K(ATP) channel in the rat in vivo. *British Journal of Pharmacology*. 144(3):331–337.

- Guan, X., Wang, L., Liu, Z., Guo, X., Jiang, Y., ... Xu, C. 2016. miR-106a promotes cardiac hypertrophy by targeting mitofusin 2. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 99:207–217.
- Gunter, T.E. & Sheu, S.-S. 2009. Characteristics and Possible Functions of Mitochondrial Ca²⁺ Transport Mechanisms. *Biochimica et biophysica acta*. 1787(11):1291–1308.
- Hall, A.R., Burke, N., Dongworth, R.K., Kalkhoran, S.B., Dyson, A., ... Hausenloy, D.J. 2016. Hearts deficient in both Mfn1 and Mfn2 are protected against acute myocardial infarction. *Cell Death & Disease*. 7(5):e2238.
- Harzheim, D., Movassagh, M., Foo, R.S.-Y., Ritter, O., Tashfeen, A., ... Roderick, H.L. 2009. Increased InsP3Rs in the junctional sarcoplasmic reticulum augment Ca²⁺ transients and arrhythmias associated with cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106(27):11406–11411.
- Harzheim, D., Talasila, A., Movassagh, M., Foo, R.S.-Y., Figg, N., ... Roderick, H.L. 2010. Elevated InsP3R expression underlies enhanced calcium fluxes and spontaneous extra-systolic calcium release events in hypertrophic cardiac myocytes. *Channels (Austin, Tex.)*. 4(1):67–71.
- Hatano, A., Okada, J.-I., Washio, T., Hisada, T. & Sugiura, S. 2015. Distinct functional roles of cardiac mitochondrial subpopulations revealed by a 3D simulation model. *Biophysical Journal*. 108(11):2732–2739.
- Hayashi, T. & Su, T.-P. 2007. Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca(2+) signaling and cell survival. *Cell*. 131(3):596–610.
- Hayashi, T., Martone, M.E., Yu, Z., Thor, A., Doi, M., ... Hoshijima, M. 2009. Three-dimensional electron microscopy reveals new details of membrane systems for Ca²⁺ signaling in the heart. *Journal of Cell Science*. 122(7):1005–1013.
- Heusch, G., Libby, P., Gersh, B., Yellon, D., Böhm, M., ... Opie, L. 2014. Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure. *Lancet (London, England)*. 383(9932):1933–1943.
- Hollander, J.M., Thapa, D. & Shepherd, D.L. 2014. Physiological and structural differences in spatially distinct subpopulations of cardiac mitochondria: influence of cardiac pathologies. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 307(1):H1-14.
- Hüttemann, M., Lee, I., Samavati, L., Yu, H. & Doan, J.W. 2007. Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation through cell signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1773(12):1701–1720.

- Ide, T., Tsutsui, H., Hayashidani, S., Kang, D., Suematsu, N., ... Takeshita, A. 2001. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circulation Research*. 88(5):529–535.
- Ieda, M., Fukuda, K., Hisaka, Y., Kimura, K., Kawaguchi, H., ... Ogawa, S. 2004. Endothelin-1 regulates cardiac sympathetic innervation in the rodent heart by controlling nerve growth factor expression. *The Journal of Clinical Investigation*. 113(6):876–884.
- Iwai-Kanai, E. & Hasegawa, K. 2004. Intracellular signaling pathways for norepinephrine- and endothelin-1-mediated regulation of myocardial cell apoptosis. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 259(1–2):163–168.
- Jiang, T., Pak, E., Zhang, H.L., Kline, R.P. & Steinberg, S.F. 1996. Endothelin-dependent actions in cultured AT-1 cardiac myocytes. The role of the epsilon isoform of protein kinase C. *Circulation Research*. 78(4):724–736.
- Kakinuma, Y., Miyauchi, T., Yuki, K., Murakoshi, N., Goto, K. & Yamaguchi, I. 2001. Novel molecular mechanism of increased myocardial endothelin-1 expression in the failing heart involving the transcriptional factor hypoxia-inducible factor-1alpha induced for impaired myocardial energy metabolism. *Circulation*. 103(19):2387–2394.
- Kemp, C.D. & Conte, J.V. 2012. The pathophysiology of heart failure. *Cardiovascular Pathology*. 21(5):365–371.
- Kirichok, Y., Krapivinsky, G. & Clapham, D.E. 2004. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature*. 427(6972):360–364.
- Kockskämper, J., Zima, A.V., Roderick, H.L., Pieske, B., Blatter, L.A. & Bootman, M.D. 2008. Emerging roles of inositol 1,4,5-trisphosphate signaling in cardiac myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 45(2):128–147.
- Kohlhaas, M. & Maack, C. 2010. Adverse bioenergetic consequences of Na⁺-Ca²⁺ exchanger-mediated Ca²⁺ influx in cardiac myocytes. *Circulation*. 122(22):2273–2280.
- Kohlhaas, M. & Maack, C. 2011. Interplay of Defective Excitation-Contraction Coupling, Energy Starvation, and Oxidative Stress in Heart Failure. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 21(3):69–73.
- Kohlhaas, M. & Maack, C. 2013. Calcium release microdomains and mitochondria. *Cardiovascular Research*. 98(2):259–268.
- Kohlhaas, M., Liu, T., Knopp, A., Zeller, T., Ong, M.F., ... Maack, C. 2010. Elevated cytosolic Na⁺ increases mitochondrial formation of reactive oxygen species in failing cardiac myocytes. *Circulation*. 121(14):1606–1613.
- Kohlhaas, M., Nickel, A.G. & Maack, C. 2017. Mitochondrial energetics and calcium

coupling in the heart. *The Journal of Physiology*. 595(12):3753–3763.

Konstantinidis, K., Lederer, W.J., Rizzuto, R. & Kitsis, R.N. 2012. Mitofusin 2 Joins the Sarcoplasmic Reticulum and Mitochondria at the Hip to Sustain Cardiac Energetics. *Circulation research*. 111(7):821–823.

Kurihara, Y., Kurihara, H., Suzuki, H., Kodama, T., Maemura, K., ... Kamada, N. 1994. Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature*. 368(6473):703–710.

Kurihara, Y., Kurihara, H., Oda, H., Maemura, K., Nagai, R., ... Yazaki, Y. 1995. Aortic arch malformations and ventricular septal defect in mice deficient in endothelin-1. *The Journal of Clinical Investigation*. 96(1):293–300.

Kurihara, Y., Kurihara, H., Maemura, K., Kuwaki, T., Kumada, M. & Yazaki, Y. 1995. Impaired development of the thyroid and thymus in endothelin-1 knockout mice. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 26 Suppl 3:S13-16.

Kwong, J.Q., Lu, X., Correll, R.N., Schwanekamp, J.A., Vagnozzi, R.J., ... Molkenin, J.D. 2015. The mitochondrial calcium uniporter selectively matches metabolic output to acute contractile stress in the heart. *Cell reports*. 12(1):15–22.

Lala, A. & Desai, A.S. 2014. The role of coronary artery disease in heart failure. *Heart Failure Clinics*. 10(2):353–365.

Lederer, W.J., Bers, D.M. & Eisner, D.A. 2013. Calcium signaling in heart: multiscale, diverse, rapid, local, and remarkable. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 58:3–4.

Li, X., Zima, A.V., Sheikh, F., Blatter, L.A. & Chen, J. 2005. Endothelin-1-induced arrhythmogenic Ca²⁺ signaling is abolished in atrial myocytes of inositol-1,4,5-trisphosphate(IP₃)-receptor type 2-deficient mice. *Circulation Research*. 96(12):1274–1281.

Lipp, P., Laine, M., Tovey, S.C., Burrell, K.M., Berridge, M.J., ... Bootman, M.D. 2000. Functional InsP₃ receptors that may modulate excitation–contraction coupling in the heart. *Current Biology*. 10(15):939–942.

Liu, T. & O'Rourke, B. 2008. Enhancing Mitochondrial Ca²⁺ Uptake in Myocytes From Failing Hearts Restores Energy Supply and Demand Matching. *Circulation Research*. 103(3):279–288.

Ljubojevic, S. & Bers, D.M. 2015. Nuclear Calcium in Cardiac Myocytes. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 65(3):211–217.

Lopez-Crisosto, C., Pennanen, C., Vasquez-Trincado, C., Morales, P.E., Bravo-Sagua,

- R., ... Lavandero, S. 2017. Sarcoplasmic reticulum-mitochondria communication in cardiovascular pathophysiology. *Nature Reviews. Cardiology*. 14(6):342–360.
- Lu, F., Tian, Z., Zhang, W., Zhao, Y., Li, H., ... Xu, C. 2010. Calcium-sensing receptors regulate cardiomyocyte Ca²⁺ signaling via the sarcoplasmic reticulum-mitochondrion interface during hypoxia/reoxygenation. *Journal of Biomedical Science*. 17:50.
- Lu, X., Ginsburg, K.S., Kettlewell, S., Bossuyt, J., Smith, G.L. & Bers, D.M. 2013. Measuring Local Gradients of Intra-Mitochondrial [Ca] in Cardiac Myocytes During SR Ca Release. *Circulation research*. 112(3):424.
- Lukyanenko, V., Chikando, A. & Lederer, W.J. 2009. Mitochondria in cardiomyocyte Ca²⁺ signaling. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 41(10):1957–1971.
- Luongo, T.S., Lambert, J.P., Yuan, A., Zhang, X., Gross, P., ... Elrod, J.W. 2015. The Mitochondrial Calcium Uniporter Matches Energetic Supply with Cardiac Workload during Stress and Modulates Permeability Transition. *Cell Reports*. 12(1):23–34.
- Maack, C. & O'Rourke, B. 2007. Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics. *Basic research in cardiology*. 102(5):369–392.
- Maack, C., Cortassa, S., Aon, M.A., Ganesan, A.N., Liu, T. & O'Rourke, B. 2006. Elevated Cytosolic Na⁺ Decreases Mitochondrial Ca²⁺ Uptake During Excitation–Contraction Coupling and Impairs Energetic Adaptation in Cardiac Myocytes. *Circulation research*. 99(2):172–182.
- Matlib, M.A., Rouslin, W., Kraft, G., Berner, P. & Schwartz, A. 1978. On the existence of two populations of mitochondria in a single organ. Respiration, calcium transport and enzyme activities. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 84(2):482–488.
- McBride, H.M., Neuspiel, M. & Wasiak, S. 2006. Mitochondria: More Than Just a Powerhouse. *Current Biology*. 16(14):R551–R560.
- McMillin-Wood, J., Wolkowicz, P.E., Chu, A., Tate, C.A., Goldstein, M.A. & Entman, M.L. 1980. Calcium uptake by two preparations of mitochondria from heart. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 591(2):251–265.
- Mendis, S., Puska, P., Norrving, B., World Health Organization, World Heart Federation & World Stroke Organization eds. 2011. *Global atlas on cardiovascular disease prevention and control*. Geneva: World Health Organization in collaboration with the World Heart Federation and the World Stroke Organization.
- Michels, G., F., K.I., Jeannette, E.-B., Dennis, R., Stefan, H., ... Hoppe Uta C. 2009.

Regulation of the Human Cardiac Mitochondrial Ca²⁺ Uptake by 2 Different Voltage-Gated Ca²⁺ Channels. *Circulation*. 119(18):2435–2443.

Min, C.K., Yeom, D.R., Lee, K.-E., Kwon, H.-K., Kang, M., ... Kim, D.H. 2012. Coupling of ryanodine receptor 2 and voltage-dependent anion channel 2 is essential for Ca²⁺ transfer from the sarcoplasmic reticulum to the mitochondria in the heart. *The Biochemical Journal*. 447(3):371–379.

Mishra, J., Jhun, B.S., Hurst, S., O-Uchi, J., Csordás, G. & Sheu, S.-S. 2017. The Mitochondrial Ca²⁺ Uniporter: Structure, Function and Pharmacology. *Handbook of experimental pharmacology*. 240:129–156.

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(6):781–788.

Murphy, M.P. 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*. 417(Pt 1):1–13.

Murphy, E., Ardehali, H., Balaban, R.S., DiLisa, F., Dorn, G.W., ... American Heart Association Council on Basic Cardiovascular Sciences, Council on Clinical Cardiology, and Council on Functional Genomics and Translational Biology. 2016. Mitochondrial Function, Biology, and Role in Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation Research*. 118(12):1960–1991.

Nagoshi, T., Yoshimura, M., Rosano, G.M.C., Lopaschuk, G.D. & Mochizuki, S. 2011. Optimization of Cardiac Metabolism in Heart Failure. *Current Pharmaceutical Design*. 17(35):3846–3853.

Naon, D., Zaninello, M., Giacomello, M., Varanita, T., Grespi, F., ... Scorrano, L. 2016. Critical reappraisal confirms that Mitofusin 2 is an endoplasmic reticulum–mitochondria tether. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 113(40):11249–11254.

O’Rourke, B. & Blatter, L.A. 2009. Mitochondrial Ca²⁺ uptake: tortoise or hare? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 46(6):767–774.

O’Rourke, B., Cortassa, S. & Aon, M.A. 2005. Mitochondrial Ion Channels: Gatekeepers of Life and Death. *Physiology (Bethesda, Md.)*. 20:303–315.

O-Uchi, J., Jhun, B.S., Hurst, S., Bisetto, S., Gross, P., ... Sheu, S.-S. 2013. Overexpression of ryanodine receptor type 1 enhances mitochondrial fragmentation and Ca²⁺-induced ATP production in cardiac H9c2 myoblasts. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 305(12):H1736–H1751.

- Paillard, M., Tubbs, E., Thiebaut, P.-A., Gomez, L., Fauconnier, J., ... Ovize, M. 2013. Depressing mitochondria-reticulum interactions protects cardiomyocytes from lethal hypoxia-reoxygenation injury. *Circulation*. 128(14):1555–1565.
- Palmer, J.W., Tandler, B. & Hoppel, C.L. 1985. Biochemical differences between subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria from rat cardiac muscle: effects of procedural manipulations. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 236(2):691–702.
- Palty, R., Hershinkel, M. & Sekler, I. 2012. Molecular identity and functional properties of the mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *The Journal of Biological Chemistry*. 287(38):31650–31657.
- Pan, X., Liu, J., Nguyen, T., Liu, C., Sun, J., ... Finkel, T. 2013. The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter. *Nature Cell Biology*. 15(12):1464–1472.
- Papanicolaou, K.N., Khairallah, R.J., Ngoh, G.A., Chikando, A., Luptak, I., ... Walsh, K. 2011. Mitofusin-2 maintains mitochondrial structure and contributes to stress-induced permeability transition in cardiac myocytes. *Molecular and Cellular Biology*. 31(6):1309–1328.
- Pape, H.-C., Kurtz, A. & Silbernagl, S. 2014. *Physiologie*. G. Thieme.
- Picard, P., Smith, P.J., Monge, J.C., Rouleau, J.L., Nguyen, Q.T., ... Stewart, D.J. 1998. Coordinated upregulation of the cardiac endothelin system in a rat model of heart failure. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 31 Suppl 1:S294-297.
- Pieske, B., Beyermann, B., Breu, V., Löffler, B.M., Schlotthauer, K., ... Hasenfuss, G. 1999. Functional effects of endothelin and regulation of endothelin receptors in isolated human nonfailing and failing myocardium. *Circulation*. 99(14):1802–1809.
- Pinali, C., Bennett, H., Davenport, J.B., Trafford, A.W. & Kitmitto, A. 2013. Three-dimensional reconstruction of cardiac sarcoplasmic reticulum reveals a continuous network linking transverse-tubules: this organization is perturbed in heart failure. *Circulation Research*. 113(11):1219–1230.
- Ponikowski, P., Voors, A.A., Anker, S.D., Bueno, H., Cleland, J.G.F., ... Davies, C. 2016. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failureThe Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC)Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European Heart Journal*. 37(27):2129–2200.
- Prole, D.L. & Taylor, C.W. 2016. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and their protein partners as signalling hubs. *The Journal of Physiology*. 594(11):2849–2866.

- Proven, A., Roderick, H.L., Conway, S.J., Berridge, M.J., Horton, J.K., ... Bootman, M.D. 2006. Inositol 1,4,5-trisphosphate supports the arrhythmogenic action of endothelin-1 on ventricular cardiac myocytes. *Journal of Cell Science*. 119(Pt 16):3363–3375.
- Rapizzi, E., Pinton, P., Szabadkai, G., Wieckowski, M.R., Vandecasteele, G., ... Rizzuto, R. 2002. Recombinant expression of the voltage-dependent anion channel enhances the transfer of Ca²⁺ microdomains to mitochondria. *The Journal of Cell Biology*. 159(4):613–624.
- Rich, P.R. & Maréchal, A. 2010. The mitochondrial respiratory chain. *Essays In Biochemistry*. 47:1–23.
- van Riet, E.E.S., Hoes, A.W., Wagenaar, K.P., Limburg, A., Landman, M.A.J. & Rutten, F.H. 2016. Epidemiology of heart failure: the prevalence of heart failure and ventricular dysfunction in older adults over time. A systematic review. *European Journal of Heart Failure*. 18(3):242–252.
- Rizzuto, R. & Pozzan, T. 2006. Microdomains of Intracellular Ca²⁺: Molecular Determinants and Functional Consequences. *Physiological Reviews*. 86(1):369–408.
- Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A. & Mammucari, C. 2012. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 13(9):566–578.
- 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 (New York, N.Y.)*. 262(5134):744–747.
- Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F.S., Fogarty, K.E., ... Pozzan, T. 1998. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science (New York, N.Y.)*. 280(5370):1763–1766.
- Roger, V.L. 2013. Epidemiology of Heart Failure. *Circulation Research*. 113(6):646–659.
- Rosca, M.G. & Hoppel, C.L. 2013. Mitochondrial dysfunction in heart failure. *Heart failure reviews*. 18(5).
- Rosca, M.G., Vazquez, E.J., Kerner, J., Parland, W., Chandler, M.P., ... Hoppel, C.L. 2008. Cardiac mitochondria in heart failure: decrease in respirasomes and oxidative phosphorylation. *Cardiovascular Research*. 80(1):30–39.
- Roth, G.A., Huffman, M.D., Moran, A.E., Feigin, V., Mensah, G.A., ... Murray, C.J.L. 2015. Global and regional patterns in cardiovascular mortality from 1990 to 2013.

Circulation. 132(17):1667–1678.

Ruiz-Meana, M., Fernandez-Sanz, C. & Garcia-Dorado, D. 2010. The SR–mitochondria interaction: a new player in cardiac pathophysiology. *Cardiovascular Research*. 88(1):30–39.

Schrepfer, E. & Scorrano, L. 2016. Mitofusins, from Mitochondria to Metabolism. *Molecular Cell*. 61(5):683–694.

Schwarzer, M., Schrepfer, A., Amorim, P.A., Osterholt, M. & Doenst, T. 2013. Pressure overload differentially affects respiratory capacity in interfibrillar and subsarcolemmal mitochondria. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 304(4):H529–H537.

Seidlmayer, L.K., Gomez-Garcia, M.R., Blatter, L.A., Pavlov, E. & Dedkova, E.N. 2012. Inorganic polyphosphate is a potent activator of the mitochondrial permeability transition pore in cardiac myocytes. *The Journal of General Physiology*. 139(5):321–331.

Seidlmayer, L.K., Mages, C., Berbner, A., Eder-Negrin, P., Arias-Loza, P.A., ... Dedkova, E.N. 2019. Mitofusin 2 Is Essential for IP3-Mediated SR/Mitochondria Metabolic Feedback in Ventricular Myocytes. *Frontiers in Physiology*. 10.

Seidlmayer, L.K., Kuhn, J., Berbner, A., Arias-Loza, P.-A., Williams, T., ... Ritter, O. 2016. Inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated sarcoplasmic reticulum-mitochondrial crosstalk influences adenosine triphosphate production via mitochondrial Ca²⁺ uptake through the mitochondrial ryanodine receptor in cardiac myocytes. *Cardiovascular Research*. 112(1):491–501.

Shadel, G.S. & Horvath, T.L. 2015. Mitochondrial ROS Signaling in Organismal Homeostasis. *Cell*. 163(3):560–569.

Sharma, V.K., Ramesh, V., Franzini-Armstrong, C. & Sheu, S.S. 2000. Transport of Ca²⁺ from sarcoplasmic reticulum to mitochondria in rat ventricular myocytes. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 32(1):97–104.

Shoshan-Barmatz, V., Maldonado, E.N. & Krelin, Y. 2017. VDAC1 at the crossroads of cell metabolism, apoptosis and cell stress. *Cell Stress*. 1(1):11–36.

Shoshan-Barmatz, V., Keinan, N. & Zaid, H. 2008. Uncovering the role of VDAC in the regulation of cell life and death. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 40(3):183–191.

Signore, S., Sorrentino, A., Ferreira-Martins, J., Kannappan, R., Shafaie, M., ... Rota, M. 2013. Inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptors and human left ventricular myocytes. *Circulation*. 128(12):1286–1297.

- Simmen, T., Aslan, J.E., Blagoveshchenskaya, A.D., Thomas, L., Wan, L., ... Thomas, G. 2005. PACS-2 controls endoplasmic reticulum-mitochondria communication and Bid-mediated apoptosis. *The EMBO journal*. 24(4):717–729.
- Stoica, R., De Vos, K.J., Paillusson, S., Mueller, S., Sancho, R.M., ... Miller, C.C.J. 2014. ER-mitochondria associations are regulated by the VAPB-PTPIP51 interaction and are disrupted by ALS/FTD-associated TDP-43. *Nature Communications*. 5:3996.
- Su, X., Sekiguchi, M. & Endo, M. 2000. An Ultrastructural Study of Cardiac Myocytes in Postmyocardial Infarction Ventricular Aneurysm Representative of Chronic Ischemic Myocardium Using Semiquantitative and Quantitative Assessment. *Cardiovascular Pathology*. 9(1):1–8.
- Suh, J.H., Heath, S.-H. & Hagen, T.M. 2003. Two subpopulations of mitochondria in the aging rat heart display heterogenous levels of oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*. 35(9):1064–1072.
- Sun, D., Li, C., Liu, J., Wang, Z., Liu, Y., ... Wen, S. 2019. Expression Profile of microRNAs in Hypertrophic Cardiomyopathy and Effects of microRNA-20 in Inducing Cardiomyocyte Hypertrophy Through Regulating Gene MFN2. *DNA and cell biology*. 38(8):796–807.
- Suzuki, T. & Miyauchi, T. 2001. A novel pharmacological action of ET-1 to prevent the cytotoxicity of doxorubicin in cardiomyocytes. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 280(5):R1399-1406.
- Szabadkai, G., Bianchi, K., Várnai, P., De Stefani, D., Wieckowski, M.R., ... Rizzuto, R. 2006. Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *The Journal of Cell Biology*. 175(6):901–911.
- Tanai, E. & Frantz, S. 2015. Pathophysiology of Heart Failure. *Comprehensive Physiology*. 6(1):187–214.
- Tarasov, A.I., Griffiths, E.J. & Rutter, G.A. 2012. Regulation of ATP production by mitochondrial Ca²⁺. *Cell Calcium*. 52(1):28–35.
- Territo, P.R., Mootha, V.K., French, S.A. & Balaban, R.S. 2000. Ca(2+) activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: role of the F(0)/F(1)-ATPase. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. 278(2):C423-435.
- Tewari, S.G., Camara, A.K.S., Stowe, D.F. & Dash, R.K. 2014. Computational analysis of Ca²⁺ dynamics in isolated cardiac mitochondria predicts two distinct modes of Ca²⁺ uptake. *The Journal of Physiology*. 592(Pt 9):1917–1930.
- Thai, P.N., Daugherty, D.J., Frederich, B.J., Lu, X., Deng, W., ... Schaefer, S. 2018.

Cardiac-specific Conditional Knockout of the 18-kDa Mitochondrial Translocator Protein Protects from Pressure Overload Induced Heart Failure. *Scientific Reports*. 8(1):1–17.

Thermo Fisher Scientific. 2010. *The Molecular Probes® Handbook, A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 11th Edition*. 11th ed. Thermo Fisher Scientific. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/molecular-probes-the-handbook/mp-handbook-download.html> Date of access: 01 Feb. 2020.

Ventura-Clapier, R., Garnier, A. & Veksler, V. 2004. Energy metabolism in heart failure. *The Journal of Physiology*. 555(1):1–13.

Vignon-Zellweger, N., Relle, K., Kienlen, E., Alter, M., Seider, P., ... Hocher, B. 2011. Endothelin-1 overexpression restores diastolic function in eNOS knockout mice. *Journal of Hypertension*. 29(5):961–970.

Virani, S.S., Alonso, A., Benjamin, E.J., Bittencourt, M.S., Callaway, C.W., ... American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. 2020. Heart Disease and Stroke Statistics-2020 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. (January, 29):CIR0000000000000757.

Wang, L., Qin, D., Shi, H., Zhang, Y., Li, H. & Han, Q. 2019. MiR-195-5p Promotes Cardiomyocyte Hypertrophy by Targeting MFN2 and FBXW7. *BioMed Research International*. 2019:1580982.

Wang, Z., Ying, Z., Bosty-Westphal, A., Zhang, J., Schautz, B., ... Müller, M.J. 2010. Specific metabolic rates of major organs and tissues across adulthood: evaluation by mechanistic model of resting energy expenditure. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 92(6):1369–1377.

Wei, A.-C., Liu, T., Winslow, R.L. & 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(6):465–478.

Wei, C.M., Lerman, A., Rodeheffer, R.J., McGregor, C.G., Brandt, R.R., ... Burnett, J.C. 1994. Endothelin in human congestive heart failure. *Circulation*. 89(4):1580–1586.

Weiss, R.G. & Maslov, M. 2004. Normal Myocardial Metabolism:Fueling Cardiac Contraction. *Advanced Studies in Medicine*. 4(6B):457–463.

Weisser-Thomas, J., Piacentino, V., Gaughan, J.P., Margulies, K. & Houser, S.R. 2003. Calcium entry via Na/Ca exchange during the action potential directly contributes to contraction of failing human ventricular myocytes. *Cardiovascular Research*. 57(4):974–985.

WHO | Cardiovascular diseases (CVDs). s.a. WHO. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/> Date of access: 13 Mar. 2017.

Williams, G.S.B., Boyman, L., Chikando, A.C., Khairallah, R.J. & Lederer, W.J. 2013. Mitochondrial calcium uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110(26):10479–10486.

Wu, S. & Zou, M.-H. 2019. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes in the heart. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 662:201–212.

Wu, S., Lu, Q., Wang, Q., Ding, Y., Ma, Z., ... Zou, M.-H. 2017. Binding of FUN14 Domain Containing 1 With Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor in Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes Maintains Mitochondrial Dynamics and Function in Hearts in Vivo. *Circulation*. 136(23):2248–2266.

Wullschleger, M., Blanch, J. & Egger, M. 2017. Functional local crosstalk of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor- and ryanodine receptor-dependent Ca²⁺ release in atrial cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*. 113(5):542–552.

Yang, L.L., Gros, R., Kabir, M.G., Sadi, A., Gotlieb, A.I., ... Stewart, D.J. 2004. Conditional cardiac overexpression of endothelin-1 induces inflammation and dilated cardiomyopathy in mice. *Circulation*. 109(2):255–261.

Yu, H., Guo, Y., Mi, L., Wang, X., Li, L. & Gao, W. 2011. Mitofusin 2 inhibits angiotensin II-induced myocardial hypertrophy. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. 16(2):205–211.

Zhao, X.-S., Pan, W., Bekeredjian, R. & Shoet, R.V. 2006. Endogenous endothelin-1 is required for cardiomyocyte survival in vivo. *Circulation*. 114(8):830–837.

Zima, A.V. & Blatter, L.A. 2004. Inositol-1,4,5-trisphosphate-dependent Ca²⁺ signalling in cat atrial excitation–contraction coupling and arrhythmias. *The Journal of Physiology*. 555(Pt 3):607–615.

Zima, A.V., Pabbidi, M.R., Lipsius, S.L. & Blatter, L.A. 2013. Effects of mitochondrial uncoupling on Ca²⁺ signaling during excitation-contraction coupling in atrial myocytes. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 304(7):H983–H993.