

Aus dem Bereich Innere Medizin
Klinik für Angiologie, Kardiologie und internistische Intensivmedizin
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. M. Böhm

**Die Rolle von Cardiolipin in Bezug auf die elektro-mechanische
Kopplung und mitochondriale Energetik am Beispiel des Barth
Syndroms**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2019

vorgelegt von: Carolin Krug
geb. am: 07.06.1989 in Karlsburg

Tag der Promotionsprüfung: 13.01.2020

Dekan: Prof. Dr. M. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. C. Maack

Prof. Dr. P. Lipp

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	X
Abkürzungsverzeichnis	XI
1 Zusammenfassung	1
1.1 Die Rolle von Cardiolipin in Bezug auf die elektro-mechanische Kopplung und mitochondriale Energetik am Beispiel des Barth Syndroms.....	1
1.2 The role of cardiolipin in electro-mechanical coupling and mitochondrial energetics by means of the Barth Syndrome	3
2 Einleitung	6
2.1 Chronische Herzinsuffizienz.....	6
2.1.1 Dilatative Kardiomyopathie.....	7
2.2 Barth Syndrom	8
2.2.1 Definition	8
2.2.2 Epidemiologie.....	9
2.2.3 Ätiologie.....	9
2.2.4 Klinik.....	11
2.2.4.1 Kardiologische Aspekte.....	11
2.2.4.2 Hämatologische und infektiologische Aspekte	12
2.2.4.3 Neurologische Aspekte und skelettale Myopathie.....	12
2.2.4.4 Metabolische Aspekte	13
2.2.4.5 Wachstumsverzögerung und Gedeihstörung	13
2.2.4.6 Typische Facies	14
2.2.5 Diagnostik.....	14
2.2.6 Therapie	15
2.2.7 Prognose	16
2.3 Cardiolipin und seine Bedeutung für die Mitochondrien	16
2.3.1 Bedeutung des Cardiolipin für die Struktur der inneren Mitochondrienmembran.....	17

2.3.2	Bedeutung des Cardiolipin für die Atmungskette und die Entstehung von ROS.....	18
2.3.3	Cardiolipin-Peroxidation und SS31.....	19
2.3.4	Physikalische Bedeutung des Cardiolipin.....	20
2.3.5	Bedeutung des Cardiolipin für die äußere Mitochondrienmembran	21
2.3.6	Veränderungen bei Cardiolipin-Defizienz und die Bedeutung des Cardiolipin für die Mitochondrien-assoziierten Membranen.....	21
2.3.7	Elektromechanische Kopplung der Kardiomyozyten	22
2.4	Mitochondriale Energetik.....	24
2.4.1	Physiologische Anpassung des Energieangebots an die Energienachfrage	26
2.4.2	Die Mechanismen der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme und des Exportes	26
2.4.3	Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies.....	27
2.5	Pathophysiologische Veränderungen bei chronischer Herzinsuffizienz.....	28
2.6	Fragestellung der Arbeit.....	30
3	Material und Methoden.....	32
3.1	Materialien	32
3.1.1	Versuchstiere	32
3.1.2	Verwendete Substanzen	33
3.1.2.1	Grundstock.....	33
3.1.2.2	Substanzen zur Herstellung der Myozyten-Isolutionslösung.....	34
3.1.2.3	Substanzen zur Herstellung des Stopppuffer 1	34
3.1.2.4	Substanzen zur Herstellung des Stopppuffer 2	35
3.1.2.5	Substanzen zur Herstellung des Liberasepuffers.....	35
3.1.2.6	Substanzen zur Herstellung des Zellmediums	35
3.1.2.7	Substanzen zur Herstellung der Tyrodelösung	36
3.1.2.8	Weitere Substanzen zur Messung an der Zellverkürzungsanlage	36
3.1.2.9	Farbstoffe zur Myozytenfärbung	37
3.1.2.10	Substanz zur Beschichtung der Deckgläschen	37

3.1.2.11	Direkt an den Versuchstieren angewandte Substanzen.....	37
3.1.3	Präparations- und Isolationsinstrumentarium	38
3.1.4	Narkosesystem.....	38
3.1.5	Anlage zur Messung der Fluoreszenz	39
3.1.6	Übersicht über die verwendeten optischen Filter und Spiegel....	40
3.1.7	Materialien und Geräte für die Versuchsreihe an Mitochondrien	41
3.1.8	Substanzen für die Versuchsreihe an Mitochondrien	42
3.1.8.1	Substanzen zur Herstellung der Mitochondrien- Isolutionslösung	42
3.1.8.2	Substanzen zur Herstellung der Mitochondrien- Suspensionslösung.....	42
3.1.8.3	Substanzen zur Herstellung der BSA/Proteinase-Lösung...	43
3.1.8.4	Weitere zur Mitochondrienisolation benutzte Substanzen...	43
3.1.8.5	Substanzen zur Herstellung des Atmungspuffers	43
3.1.8.6	Substratzugabe während der Atmungsmessung	44
3.1.8.7	Zur Proteinbestimmung verwendete Substanzen	44
3.1.8.8	Zur NADPH-Messung verwendete Substanzen	44
3.1.8.9	Zur paramagnetischen Elektronenresonanzspektroskopie verwendete Substanzen.....	45
3.1.8.10	Zur Amplex-Red-Messung verwendete Substanzen	45
3.1.9	Sonstige Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte	46
3.2	Methoden	48
3.2.1	Methoden zur Messung an Kardiomyozyten	48
3.2.1.1	Mausmyozytenisolation.....	48
3.2.1.2	Beschichtung der Deckgläschen.....	50
3.2.1.3	Messungen an der Zellverkürzungsanlage	51
	Einstellungen der Photomultipliertubes (PMT) II	56
	Schematische Darstellung der Zulaufanlage	57
	Messprotokoll.....	58
3.2.1.4	Fluoreszenzfarbstoffe.....	58
3.2.1.4.1	NAD(P)H/FAD-Autofluoreszenzmessung	58
3.2.1.4.2	Messung der Fluoreszenz von MitoSOX	59
3.2.1.4.3	Messung der Fluoreszenz von DCF	60

3.2.1.5	Auswertung der Messergebnisse	61
3.2.2	Methoden zur Messung an Mitochondrien.....	63
3.2.2.1	Mitochondrienisolation	63
3.2.2.2	Atmungsmessung	64
3.2.2.3	Proteinbestimmung	65
3.2.2.4	NAD(P)H-Messung	65
3.2.2.5	Paramagnetische Elektronenresonanzspektroskopie	66
3.2.2.5.1	Pipetterschema	67
3.2.2.6	Amplex Red Messung	67
3.2.2.6.1	Pipettierschema für die jeweiligen Messungen (in µl) ...	68
4	Ergebnisse	69
4.1	Einfluss der Tafazzin-Defizienz auf die Funktion von isolierten Mitochondrien	69
4.1.1	Atmungsmessung.....	69
4.1.2	NADPH-Messung	71
4.1.3	Superoxidproduktion.....	73
4.1.4	H ₂ O ₂ -Produktion	74
4.2	Einfluss der Tafazzin-Defizienz auf die Funktion von isolierten Herzmuskelzellen.....	75
4.2.1	Kontraktion	75
4.2.2	Redoxstatus von NAD(P)H/NAD(P) ⁺ und FADH ₂ /FAD	80
4.2.3	Kardiomyozytenfunktion in der Gegenwart von SS31	83
4.2.4	Einfluss von SS31 auf den mitochondrialen Redoxstatus von NAD(P)H und FAD	91
4.2.5	Mitochondriale Superoxidproduktion	95
4.2.6	Mitochondriale ROS-Produktion	96
4.2.7	Intrazelluläre Calcium-Konzentration.....	97
4.2.8	Mitochondriales Membranpotential.....	99
5	Diskussion.....	100
5.1	Auswirkung der Tafazzin-Defizienz auf die kontraktile Funktion der Kardiomyozyten und die elektromechanische Kopplung.....	100
5.2	Auswirkung der Tafazzin-Defizienz auf den Redoxstatus der Kardiomyozyten	107

5.3	Auswirkung der Tafazzin-Defizienz auf die mitochondriale ROS-Produktion und die mitochondriale Atmung.....	108
5.4	Der Effekt von SS31 auf die Kontraktilität und den Redoxstatus Tafazzin-defizienter Kardiomyozyten	111
5.5	Ausblick.....	113
6	Literaturverzeichnis.....	115
7	Danksagung	122

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Komplexe der Atmungskette unter der Einwirkung von Cardiolipin	10
Abbildung 2: Chemische Struktur des Tetra-Linolsäure-Cardiolipin und seine Rolle bei der Entstehung von Krümmungen in Lipidmembranen.....	18
Abbildung 3: Cardiolipin-Peroxidation durch Cytochrom C oder reaktive Sauerstoffspezies destabilisiert die IMM.	20
Abbildung 4: Elekromechanische Kopplung, Calcium-Mikrodomänen.	24
Abbildung 5: Mitochondriale Energetik mit oxidativer Phosphorylierung, Produktion von ROS und den Veränderungen bei Herzinsuffizienz.	25
Abbildung 6: Herz in Langendorff-Perfusionsanlage	50
Abbildung 7: Schematische Darstellung der IonOptix-Anlage zur Messung der Fluoreszenzen und der Sarkomerlänge	54
Abbildung 8: PMT-Einstellungen zur Messung der Fluoreszenzen von NAD(P)H/FAD und DCF	55
Abbildung 9: PMT-Einstellungen zur Messung der Fluoreszenzen von mitoSOX	56
Abbildung 10: Schematische Darstellung der zuleitenden Gefäße und der Messkammer	57
Abbildung 11: Messprotokoll	58
Abbildung 12: Atmungsmessung an isolierten Mitochondrien von WT (n=3) und Taz-KD (n=3) Kardiomyozyten.	70
Abbildung 13: NADPH-Autofluoreszenz vor Substratzugabe in isolierten Mitochondrien von WT (n=3) und Taz-KD (n=3) Kardiomyozyten.....	71
Abbildung 14: NADPH-Autofluoreszenz in isolierten Mitochondrien von WT (n=3) und Taz-KD (n=3) Kardiomyozyten unter verschiedenen ADP-Konzentrationen.....	72
Abbildung 15: Superoxidproduktion isolierter Mitochondrien von WT (n=3) und Taz-KD (n=3) Kardiomyozyten.	73

Abbildung 16: H ₂ O ₂ -Produktion in isolierten Mitochondrien von WT (n=3) und Taz-KD (n=3) Kardiomyozyten.	74
Abbildung 17: Repräsentative Aufzeichnung eines NAD(P)H/FAD- und Kontraktilitätsexperimentes.	76
Abbildung 18: Diastolische und systolische Sarkomerlänge in WT (n=36) und Taz-KD (n=22) Kardiomyozyten.	77
Abbildung 19: Fraktionelle Verkürzung in WT (n=36) und Taz-KD (n=22) Kardiomyozyten.	78
Abbildung 20: Zeit bis zur maximalen Verkürzung (Time-to-Peak) in WT (n=36) und Taz-KD (n=22) Kardiomyozyten.	79
Abbildung 21: Relaxationszeiten in WT (n=36) und Taz-KD (n=22) Kardiomyozyten.	80
Abbildung 22: Redoxstatus der WT (n=29) und Taz-KD (n=21) Kardiomyozyten im Experimentverlauf.	82
Abbildung 23: Verhältnis von NAD(P)H und FAD in WT (n=29) und Taz-KD (n=21) Kardiomyozyten im Experimentverlauf, als Indikator für den Redoxstatus.	83
Abbildung 24: Sarkomerlänge in WT (n=36) Kardiomyozyten im Vergleich zu WT (n=6) Kardiomyozyten nach Behandlung mit SS31 im Experimentverlauf.	84
Abbildung 25: Fraktionelle Verkürzung in WT (n=36) Kardiomyozyten im Vergleich zu WT (n=6) Kardiomyozyten nach Behandlung mit SS31 im Experimentverlauf.	85
Abbildung 26: Zeit bis zur maximalen Verkürzung (Time-to-Peak) in WT (n=36) Kardiomyozyten im Vergleich zu WT (n=6) Kardiomyozyten nach Behandlung mit SS31 im Experimentverlauf.	86
Abbildung 27: Relaxationszeiten in WT (n=36) Kardiomyozyten im Vergleich zu WT (n=6) Kardiomyozyten nach Behandlung mit SS31 im Experimentverlauf.	87
Abbildung 28: Sarkomerlänge in Taz-KD (n=22) Kardiomyozyten im Vergleich zu Taz-KD (n=8) Kardiomyozyten nach Behandlung mit SS31 im Experimentverlauf.	88

Abbildung 29: Fraktionelle Verkürzung in Taz-KD (n=22) Kardiomyozyten im Vergleich zu Taz-KD (n=8) Kardiomyozyten nach Behandlung mit SS31 im Experimentverlauf.	89
Abbildung 30: Zeit bis zur maximalen Verkürzung (Time-to-Peak) in Taz-KD (n=22) Kardiomyozyten im Vergleich zu Taz-KD (n=8) Kardiomyozyten nach Behandlung mit SS31 im Experimentverlauf.....	90
Abbildung 31: Relaxationszeiten in Taz-KD (n=22) Kardiomyozyten im Vergleich zu Taz-KD (n=8) Kardiomyozyten nach Behandlung mit SS31 im Experimentverlauf.	91
Abbildung 32: Redoxstatus der WT (n=31) Kardiomyozyten im Vergleich zu WT (n=6) Kardiomyozyten mit SS31-Behandlung im Experimentverlauf.....	93
Abbildung 33: Redoxstatus der Taz-KD (n=21) Kardiomyozyten im Vergleich zu Taz-KD (n=8) Kardiomyozyten mit SS31-Behandlung im Experimentverlauf.....	94
Abbildung 34: Mitochondriale Superoxidproduktion in WT (n=3) und Taz-KD (n=14) Kardiomyozyten im Experimentverlauf, gemessen mit Hilfe des Farbstoffes MitoSOX.	95
Abbildung 35: Mitochondriale ROS-Produktion in WT (n=40) und Taz-KD (n=32) Kardiomyozyten im Experimentverlauf, gemessen mit Hilfe des Farbstoffes DCF.	96
Abbildung 36: Ansprechen auf H ₂ O ₂ in WT und Taz-KD Kardiomyozyten ...	97
Abbildung 37: Intrazelluläre Calciumkonzentration in WT (n=22) und Taz-KD (n=21) Kardiomyozyten während der Systole und der Diastole im Experimentverlauf, gemessen mit Hilfe des Farbstoffes Indo.	98
Abbildung 38: Mitochondriales Membranpotential $\Delta\psi_m$ in WT (n=20) und Taz-KD (n=19) Kardiomyozyten im Experimentverlauf, gemessen mit Hilfe des Farbstoffes TMRM.	99
Abbildung 39: Calcium-Haushalt der WT (n=15) und Taz-KD (n=13) Kardiomyozyten im Experimentverlauf.	105

Abbildung 40: Calcium-Aufnahmekapazität der WT (n=5) und Taz-KD (n=4)	
Mitochondrien im Experimentverlauf.	106
Abbildung 41: Protein-Analyse des MCU in Mitochondrien aus Herz- und	
Skelettmuskelzellen.....	106

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Grundstock	33
Tabelle 2: Substanzen zur Herstellung der Myozyten-Isolutionslösung	34
Tabelle 3: Substanzen zur Herstellung des Stopppuffer 1	34
Tabelle 4: Substanzen zur Herstellung des Stopppuffer 2	35
Tabelle 5: Substanzen zur Herstellung des Liberasepuffers	35
Tabelle 6: Substanzen zur Herstellung des Zellmediums	35
Tabelle 7: Substanzen zur Herstellung der Tyrodelösung.....	36
Tabelle 8: Weitere Substanzen zur Messung an der Zellverkürzungsanlage	36
Tabelle 9: Farbstoffe zur Myozytenfärbung	37
Tabelle 10: Substanz zur Beschichtung der Deckgläschen	37
Tabelle 11: Direkt an den Versuchstieren angewandte Substanzen	37
Tabelle 12: Präparations- und Isolationsinstrumentarium	38
Tabelle 13: Übersicht über die verwendeten Spiegel, deren Transmissionen und die Lokalisation im Versuchsaufbau, sowie die Farbstoffe, bei denen der jeweilige Spiegel zum Einsatz kam.....	40
Tabelle 14: Materialien und Geräte für die Versuchsreihe an Mitochondrien	41
Tabelle 15: Substanzen zur Herstellung der Mitochondrien-Isolutionslösung	42
Tabelle 16: Substanzen zur Herstellung der Mitochondrien- Suspensionslösung	42
Tabelle 17: Substanzen zur Herstellung der BSA/Proteinase-Lösung	43
Tabelle 18: Weitere zur Mitochondrienisolation benutzte Substanzen	43
Tabelle 19: Substanzen zur Herstellung des Atmungspuffers.....	43
Tabelle 20: Substratzugabe während der Atmungsmessung	44
Tabelle 21: Zur Proteinbestimmung verwendete Substanzen	44
Tabelle 22: Zur NADPH-Messung verwendete Substanzen	44
Tabelle 23: Zur paramagnetischen Elektronenresonanzspektroskopie verwendete Substanzen	45
Tabelle 24: Zur Amplex-Red-Messung verwendete Substanzen	45
Tabelle 25: Sonstige Verbrauchsmaterialien und Laborgerät	47
Tabelle 26: Kalziumaufbau.....	50

Abkürzungsverzeichnis

$[Ca^{2+}]$	Calcium-Konzentration
$[Ca^{2+}]_m$	Mitochondriale Calciumkonzentration
$[Na^+]_i$	Intrazelluläre Natriumkonzentration
3-MGCA	3-Methylglutaconsäure
AG	Aktiengesellschaft
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
$CaCl_2$	Calciumchlorid
CL	Cardiolipin
CL4	Tetra-Linolsäure- Cardiolipin
CN	Cyanid
Cs A	Cyclosporin A
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DNP	Dinitrophenol
EF	Ejektionsfraktion
G-CSF	Granulozyten- stimulierender Faktor
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
HFpEF	Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion
HFrEF	Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion
I.E.	Internationale Einheit
ICD	implantierbarer Kardioverter-Defibrillator

ICM	Ischämische Kardiomyopathie
IMM	Innere Mitochondrienmembran
LDL	Low Density Lipoprotein
LV	Linker Ventrikel
MAM	Mitochondrien-assozierte Membranen
MCU	Mitochondrialer Calcium- Uniporter
Mfn 2	Mitofusin 2
MLCL	Mono-Lysocardiolipin
NCLX	$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{Li}^+$ -Cotransporter
NCX	Sarkolemmaler $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - Austauscher
$\cdot\text{O}^{2-}$	Superoxidanion
OMM	Äußere Mitochondrienmembran
PM	Pyruvat/Malat
PTP	Protein Tyrosin Phospha- tase
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RyR	Ryanodinrezeptor
SEM	Standard error of the mean, Standardfehler
SERCA	Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase
SF	Shortening Fraction
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TAZ	Tafazzin-Gen
Taz-KD	Tafazzin-Knockdown

TMRM	Tetramethylrhodamin- methylester
UK	United Kingdom
USA	United States of America
$\Delta\mu\text{H}$	Protonen-bewegende Kraft
ΔpH	Protonengradient
$\Delta\psi_{\text{m}}$	Mitochondriales Membranpotential

1 Zusammenfassung

1.1 Die Rolle von Cardiolipin in Bezug auf die elektromechanische Kopplung und mitochondriale Energetik am Beispiel des Barth Syndroms

Das Herz hat einen enorm hohen Energiebedarf, und Mitochondrien sind der Hauptort für die Energieproduktion in Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten). In Mitochondrien werden im Citratzyklus NADH und FADH_2 produziert, welche an den Komplexen I und II der Atmungskette Elektronen abgeben, deren Transfer entlang der Atmungskettenkomplexe I-IV einen Protonengradienten produziert, welcher die Treibkraft für ATP-Produktion an der F_1F_0 -ATP-Synthase darstellt. Um die ATP-Produktion an den ständig variierenden Bedarf anzupassen, regulieren ADP und Ca^{2+} den Elektronenfluss entlang der Atmungskette. ADP aktiviert die F_1F_0 -ATP-Synthase, was den Elektronenfluss beschleunigt und NADH und FADH_2 zu NAD^+ und FAD oxidiert. Ein Anstieg der Arbeitslast wird unter physiologischen Bedingungen durch β -adrenerge Stimulation induziert, wodurch die Amplitude und Frequenz cytosolischer Ca^{2+} -Transienten in Kardiomyozyten zunimmt. Ca^{2+} wird hierbei über den mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter (MCU) in Mitochondrien aufgenommen, wo es Dehydrogenasen des Citratzyklus stimuliert. Hierdurch wird der Redoxstatus von NADH/ NAD^+ und FADH_2 /FAD wieder reduziert. NADH steht über die mitochondriale Transhydrogenase mit NADPH im Gleichgewicht, und NADPH ist für die Entgiftung von H_2O_2 essentiell. Somit kommt der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme eine wichtige Rolle für die energetische Adaptation und die Regeneration der antioxidativen Kapazität zu.

Bei verschiedenen Formen der Herzinsuffizienz wurde eine mitochondriale Dysfunktion mit energetischem Defizit und oxidativem Stress beobachtet. Seltene Ursachen einer Herzinsuffizienz sind genetische Mutationen. Eine solche Form der Kardiomyopathie findet sich beim Barth Syndrom, einer X-chromosomal rezessiven Erkrankung, die nur Jungen betrifft und neben einer

Herzinsuffizienz auch eine skelettmuskuläre Myopathie und Immundefekte hervorruft. Der genetische Defekt betrifft das Gen (*Taz*), welches Tafazzin (TAZ) enkodiert. TAZ ist eine Transacylase, die für den letzten Schritt der Biosynthese von Cardiolipin benötigt wird, einem Phospholipid, welches insbesondere in der inneren mitochondrialen Membran vorkommt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Mechanismen für die Entstehung von oxidativem Stress in Mäusen mit Tafazzin-Knockdown (Taz-KD) genauer zu untersuchen, da diesem eine wichtige Rolle sowohl für die Pathophysiologie kardialer Erkrankungen als auch beim Barth Syndrom zugeschrieben wird. Insbesondere legten wir unser Augenmerk dabei auf eine möglicherweise gestörte mitochondriale Ca^{2+} -Transmission, welche in einen Redox-Shift münden könnte. Um dieses Ziel zu erreichen, erfolgten Experimente an isolierten Kardiomyozyten und Mitochondrien von Taz-KD und Wildtyp (WT) Kontroll-Mäusen. Isolierte Kardiomyozyten wurden hinsichtlich ihrer Kontraktilität sowie ihres Redoxstatus anhand der Bestimmung von NADH, NADPH und FAD untersucht. Des Weiteren wurden die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration und die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) detektiert.

Es zeigte sich dabei, dass die Taz-KD Kardiomyozyten, vor allem unter Arbeitslast, über eine geringere diastolische Länge verfügen, was eine diastolische Dysfunktion anzeigt. Eine systolische Dysfunktion war nicht zu verzeichnen. Im Hinblick auf den Redoxstatus konnten wir nachweisen, dass Taz-KD Kardiomyozyten im Experimentverlauf, insbesondere während der erhöhten Stimulationsfrequenz, eine signifikant stärkere Oxidation von NAD(P)H und FADH_2 erfahren. Dies spricht für einen energetischen „Mismatch“, bei dem in Taz-KD Kardiomyozyten möglicherweise zu wenig NADH und FADH_2 im Citratzyklus nachgebildet werden. Im Gegensatz zu WT Kardiomyozyten, in denen unter β -adrenerger Stimulation die cytosolischen Ca^{2+} -Amplituden anstiegen, war dies in Taz-KD Kardiomyozyten nicht der Fall. Die Emission von H_2O_2 unterschied sich in

beiden Gruppen, insbesondere in zusätzlichen Experimenten an isolierten Mitochondrien, trotz der vermehrten NADPH Oxidation nicht.

In Zusammenschau der Ergebnisse schlussfolgerten wir, dass die Taz-KD Kardiomyozyten über eine diastolische Dysfunktion verfügen, die möglicherweise durch einen fehlenden Anstieg der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration unter Arbeitslasterrhöhung bedingt ist. In der Tat konnten in weiterführenden Experimenten, die nicht durch mich selber ausgeführt wurden, ein ausgeprägter Defekt der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme beobachtet werden, der auf eine starke Herabregulation des mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporters zurückzuführen war. Die fehlende mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme erklärt das schwere Defizit der bioenergetischen Adaptation, indem sie zur ausgeprägten Oxidation von NAD(P)H und FADH_2 während β -adrenerger Stimulation aufgrund einer fehlenden Aktivierung verschiedener Schlüsselenzyme des Citratzyklus führt. Somit erfolgt eine verminderte Regeneration von NAD(P)H, welches für die Elimination von H_2O_2 entscheidend ist. Vorhergehende Arbeiten, die den alleinigen Grund der ROS-Produktion in einer gestörten Funktion der Atmungskette aufgrund einer behinderten Superkomplex-Bildung durch aberrante Cardiolipinformen sahen, konnten somit widerlegt werden.

1.2 The role of cardiolipin in electro-mechanical coupling and mitochondrial energetics by means of the Barth Syndrome

The heart has an enormous demand for energy. Mitochondria are the organelles of energy production within the heart muscle cells (cardiomyocytes). NADH and FADH_2 are produced in mitochondria via the Krebs cycle, afterwards both molecules are oxidized by complex I and II of the mitochondrial respiratory chain. The transfer of those electrons along the respiratory chain complexes I-IV establishes a proton gradient, which serves as the driving force for ATP production via the F_1F_0 -ATP-synthase.

The demand of ATP production constantly varies, therefore the electron transfer of the respiratory chain is regulated by the intracellular ADP- and Ca^{2+} concentrations. ADP activates the F_1F_0 -ATP-synthase leading to the oxidation of NADH to NAD^+ as well as FADH_2 to FAD. Under physiological conditions, however, an increased ATP production is induced by β -adrenergic stimulation, which leads to an increased cytosolic Ca^{2+} level in cardiomyocytes. Subsequently, the mitochondrial Ca^{2+} uniporter (MCU) ensures the uptake of Ca^{2+} into mitochondria where it stimulates the dehydrogenases of the citric acid cycle. Thereby, NAD^+ and FAD are reduced to NADH and FADH_2 respectively. NADPH is essential for the detoxification of H_2O_2 . Due to the equilibrium of NADH and NADPH, which is maintained by the mitochondrial transhydrogenase, the mitochondrial Ca^{2+} uptake mediates energetic adaptation as well as the regeneration of the oxidative capacity.

In various forms of heart failure, mitochondrial dysfunction with energetic defects and oxidative stress have been observed. Genetic mutations are only rare causes for cardiac insufficiencies. One form of such a cardiomyopathy is the Barth syndrome, an X-chromosomal recessive inherited disease, which only affects men and also causes skeletal muscular myopathy or immune deficiencies. The genetic defect affects the *TAZ* gene, which encodes for Tafazzin (TAZ). TAZ is a transacylase, which is essential for the biosynthesis of cardiolipin, a phospholipid of the inner mitochondrial membrane.

The aim of this thesis was to examine the mechanisms that lead to the development of oxidative stress in mice with Tafazzin knockdown (Taz-KD), as Taz-KD is supposed to play a key role with the pathophysiology of cardiac disorders as well as the Barth syndrome. Focus was put on a potentially disturbed mitochondrial Ca^{2+} transport, which may lead to a redox shift. Isolated mitochondria from cardiomyocytes of Taz-KD mice were compared to those of wild type (WT) mice. The isolated cardiomyocytes were examined with respect to contractility and redox state. Furthermore, the cytosolic Ca^{2+}

concentration and the formation of reactive oxygen species (ROS) were detected.

The results show a shorter diastolic sarcomere length in Taz-KD cardiomyocytes under an increased workload, which indicates a diastolic dysfunction. A systolic dysfunction could not be verified. Taz-KD cardiomyocytes show a significantly stronger oxidation of NAD(P)H and FADH₂ over the course of the experiment, especially during times of increased stimulation frequencies. This indicates an energetic mismatch, where Taz-KD cardiomyocytes may provide a decreased amount of NADH and FADH₂ in the citric acid cycle. In contrast to Taz-KD cardiomyocytes, a rising cytosolic Ca²⁺ concentration during β -adrenergic stimulation could only be shown for WT cardiomyocytes. Although isolated mitochondria showed increased NADPH oxidation, the emission of H₂O₂ did not differ between both groups.

Based on the results, it can be concluded that Taz-KD cardiomyocytes have a diastolic dysfunction, and that during workload transitions, oxidation of pyridine nucleotides may be the result of decreased mitochondrial Ca²⁺ uptake. Consecutive experiments of our working group indeed identified a distinctive defect of mitochondrial Ca²⁺ uptake, which is caused by a strong downregulation of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter. The lack of mitochondrial Ca²⁺ uptake therefore explains the strong deficiency of bioenergetic adaptation and leads to the oxidation of NAD(P)H and FADH₂ during β -adrenergic stimulation due to inactive Ca²⁺ dependent key enzymes of the citric acid cycle, hence hindering the regeneration of NAD(P)H, which is crucial for the H₂O₂ elimination. These data argue against the currently prevailing concept that in Barth syndrome, mitochondrial ROS formation is the result of defects in the respiratory chain secondary to cardiolipin deficiency, but rather point towards defective mitochondrial Ca²⁺ uptake that hampers the adaptation of the antioxidative capacity during workload transitions.

2 Einleitung

2.1 Chronische Herzinsuffizienz

Bei chronischer Herzinsuffizienz besteht bei etwa der Hälfte der Patienten eine eingeschränkte systolische Funktion des linken Ventrikels (LV), was als Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion (HFrEF) bezeichnet wird. Während etwa 2/3 der HFrEF-Fälle eine ischämische Genese (insbes. Herzinfarkt) hat (ischämische Kardiomyopathie, ICM), sind in 1/3 der Fälle andere (nicht-ischämische) Ursachen wie Myokarditis, aber auch genetische Ursachen für die eingeschränkte LVEF verantwortlich. Wird die systolische Pumpstörung durch genetische Faktoren ausgelöst, bezeichnet man dies als Dilatative Kardiomyopathie (DCM). Die zunehmende Einschränkung der LVEF ist mit Umbauprozessen des Myokards, dem sogenannten kardialen Remodeling, assoziiert.¹ Das kardiale Remodeling wird u.a. durch eine gesteigerte Aktivierung neurohumoraler Systeme, wie dem sympathischen Nervensystem und dem Renin-Angiotensin-Aldosteron System, aber auch vermehrte Inflammation, metabolische Veränderungen und oxidativen Stress verursacht.²

Die andere Hälfte der Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz leidet an einer diastolischen Herzinsuffizienz, welche auch Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF) bezeichnet wird.³ Epidemiologisch kam es in den letzten Jahrzehnten zu einer Zunahme der Erkrankung, möglicherweise durch die steigenden Zahlen der Komorbiditäten bzw. Risikofaktoren, die eine HFpEF bedingen. Dazu gehören Bluthochdruck, metabolisches Syndrom, Speichererkrankungen und zunehmendes Alter der Bevölkerung. Bei einer HFpEF liegt außer der erhaltenen systolischen Pumpfunktion auch eine normale Größe des linken Ventrikels vor. Allerdings kommt es häufig zu einer Zunahme der Wandstärke und somit einem geringeren Lumen des linken Ventrikels. Die komplexen pathophysiologischen Vorgänge dieser Herzinsuffizienzentität sind bisher unvollständig verstanden, beobachtet wurden aber eine Steifigkeit des linken

Ventrikels sowie ein gestörter Relaxationsprozess. Die aktive Relaxation des Myokards ist an ATP und Calcium gekoppelt, sodass Störungen im Calciumhandling eine diastolische Dysfunktion bedingen können.⁴

2.1.1 Dilatative Kardiomyopathie

Ursächlich für eine DCM sind in einem Fünftel bis einem Drittel der Fälle familiäre Formen. Dabei spielen Mutationen in Genen, die für sarkomerische Proteine, Zellkernmembranproteine, Transkriptionsfaktoren und sowohl Ca^{2+} -transportierende als auch mitochondriale Proteine kodieren, eine Rolle.^{1, 5} Bis jetzt sind mehr als 50 Gene identifiziert, die zu einer familiären DCM führen, wobei der autosomal-dominante Übertragungsweg die häufigste Form ist, aber auch autosomal rezessive und X-chromosomale Übertragungsformen sind beschrieben.⁵

Die Hauptmerkmale der DCM sind eine linksventrikuläre Dilatation, eine systolische Dysfunktion, apoptotischer und/oder nekrotischer Zelltod von Kardiomyozyten und eine myokardiale Fibrose.⁵ Klinisch äußert sie sich mit Symptomen einer Links- beziehungsweise Rechtsherzinsuffizienz, die sich aber häufig erst Monate bis Jahre nach dem Beginn des Remodelings manifestieren. Zudem können Synkopen infolge von Arrhythmien auftreten. Seltener kommt es zu Schlaganfällen durch systemische Embolien kardialer Thromben.¹ Neben ventrikulären Thromben sind hier Thromben aus dem linken Vorhof beim Vorhofflimmern relevant. Das Vorhofflimmern wird mit einer ungünstigen Prognose in Verbindung gebracht.⁶

Die Diagnose erfolgt zum einen klinisch durch Erhebung typischer Symptome, wie Luftnot und eingeschränkter körperlicher Leistungsfähigkeit, und darüber hinaus per Echokardiographie oder kardialer Magnetresonanztomographie. Hierbei kann zum einen die eingeschränkte systolische Funktion des Herzens und zum anderen die reduzierte Wandstärke, vor allem des linken Ventrikels, bei vergrößerten Herzhöhlen beurteilt werden.^{5, 7}

Bei einer durch Mutationen in mitochondrialen Genen verursachten Erkrankung kann auch das Herz stark betroffen sein, da die Kardiomyozyten einen sehr hohen Energiebedarf haben und daher auf die effiziente Bereitstellung von ATP aus Mitochondrien angewiesen sind.⁸ Die Mitochondrien sind in der Lage, mit Hilfe der Reduktionsäquivalente NADH und FADH₂, die dem Citratzyklus entspringen, einen Protonen- und elektrischen Gradienten über der inneren Mitochondrienmembran zu erzeugen, welcher die treibende Kraft für die oxidative Phosphorylierung und somit die ATP-Bildung darstellt.⁹ Im Herzen wird ATP hauptsächlich für die elektromechanische Kopplung, d.h., die elektrisch ausgelöste Ca²⁺-abhängige Kontraktion und Relaxation der Myofilamente benötigt.¹⁰ Es wird angenommen, dass ungefähr 2% des gesamten zellulären ATP-Gehaltes für einen Herzschlag benötigt werden¹⁰ und dass bei maximaler Auslastung somit der gesamte ATP-Pool innerhalb weniger Sekunden erneuert wird.^{11,12} Somit wird deutlich, dass eine Fehlfunktion mitochondrialer Proteine eine enorme Beeinträchtigung der kardialen Energetik, der Kontraktilität und der Struktur sowohl auf zellulärer als auch auf ventrikulärer Ebene bedingt. Da Mitochondrien jedoch nicht nur im Herzen vorkommen, sondern im gesamten Organismus eine wichtige Rolle spielen, ist eine mitochondriale Erkrankung als Multi-System-Erkrankung zu verstehen. Eine wichtige Ursache einer solchen mitochondrialen Erbkrankheit, bei der die kardiale Symptomatik aus eben beschriebenen Gründen im Vordergrund der Erkrankung steht, ist das Barth Syndrom.

2.2 Barth Syndrom

2.2.1 Definition

Im Jahre 1983 wurde das Barth Syndrom zum ersten Mal durch Dr. Peter Barth als eine Trias aus Kardiomyopathie, Myopathie und Neutropenie beschrieben.¹³ Im Verlauf der letzten drei Jahrzehnte sind weitere Erkenntnisse hinsichtlich des Phänotyps, der genetischen Grundlage und der Pathophysiologie hinzugekommen. Heute ist das Syndrom als seltene X-

chromosomal-rezessiv vererbte Erkrankung bekannt, die nur bei Jungen auftritt und gekennzeichnet ist durch Kardiomyopathie, skelettale Myopathie, Wachstumsverzögerung, Neutropenie und eine erhöhte Ausscheidung von 3-Methylglutaconsäure mit dem Urin.¹⁴ Die Pathogenese hat ihren Ursprung in einer genetischen Veränderung und ist einzigartig. Denn das Barth Syndrom ist die einzige bekannte Erkrankung, bei der das Problem im Reifungsprozess des Cardiolipin, einem Phospholipid der Mitochondrienmembran, liegt.¹⁵

2.2.2 Epidemiologie

Derzeit sind weltweit weniger als 500, im deutschsprachigen Raum (Deutschland und Österreich) acht, lebende männliche Betroffene bekannt.¹⁶ Jedoch gibt es Indizien dafür, dass die Dunkelziffer weitaus höher ist, da die Erkrankung unterdiagnostiziert ist. Für diese Vermutung spricht, dass das Alter von 73 untersuchten Patienten bei Diagnose im Durchschnitt 4 Jahre betrug, obwohl die ersten Symptome bereits mit einem Durchschnittsalter von 0,76 Jahren auftraten.¹⁷ Zur Zeit werden weniger als 10 neu identifizierte Erkrankte pro Jahr in den USA gemeldet, was eine kalkulierte Prävalenz der Barth Syndrome Foundation aus dem Jahr 2015 von 1/300.000-400.000 Lebendgeburten ergibt.¹⁶ Die geschätzte Dunkelziffer beläuft sich auf 1/140.000 Lebendgeburten.¹⁴ Ethnische Prädilektionen sind keine bekannt.¹⁶

2.2.3 Ätiologie

Das Barth Syndrom wird durch Mutationen im Tafazzin-Gen (*Taz*), lokalisiert auf Xq28 und früher G4.5 genannt, verursacht.¹⁸ Bis jetzt sind mehr als 200 verschiedene Mutationen identifiziert, die meisten sind Missense-Mutationen oder Deletionen.^{14, 19} Nur rund 16% der Patienten tragen *de novo*-Mutationen.¹⁹ Das Genprodukt, Tafazzin (TAZ), ist eine Acyltransferase, die die den letzten Schritt der Biosynthese von Cardiolipin katalysiert. Sie überträgt dabei Acylreste von Phosphatdylcholin auf Mono-Lysocardiolipin (MLCL), wodurch Tetra-Linolsäure-Cardiolipin (CL4) entsteht.²⁰ Die Konfiguration der Fettsäureketten des Cardiolipin ist gewebespezifisch,

wobei in oxidiertem Gewebe die Form des Tetra-Linolsäure(18:2)-CL vorherrschend ist. Genauer gesagt heißt dies, dass diese Komponente in Herzmuskel- und Skelettmuskelzellen bis zu 80% des absoluten Cardiolipingehaltes ausmacht.²¹ Eine Tafazzin-Defizienz, wie sie beim Barth Syndrom vorkommt, sorgt dafür, dass der Anteil an CL4 zugunsten von MLCL und anderen Cardiolipin-Komponenten mit höher ungesättigten Fettsäuren stark reduziert ist.²¹

Cardiolipin spielt eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der mitochondrialen Architektur. Genauer gesagt stabilisiert es die Superkomplexe der Atmungskette und optimiert die Energieproduktion in den Mitochondrien (Abbildung 1). Zudem ist es in die mitochondriale Apoptose verwickelt.¹⁴ Da *Taz* das heute einzige bekannte mit einer mitochondrialen Erkrankung assoziierte Gen ist, das in den Metabolismus von Cardiolipin involviert ist, gilt das Barth Syndrom bis heute als einzige Erkrankung, die Cardiolipin unmittelbar betrifft.²²

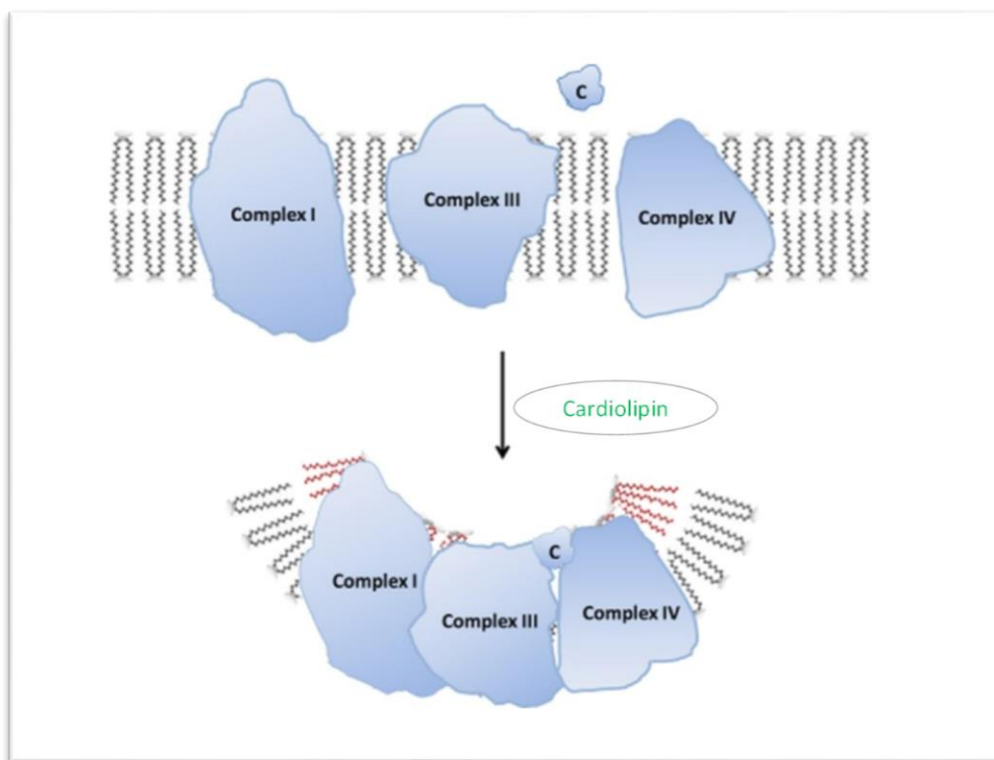


Abbildung 1: Die Komplexe der Atmungskette unter der Einwirkung von Cardiolipin
Modifiziert nach Szeto, 2014²³

2.2.4 Klinik

Das klinische Bild der Erkrankung umfasst eine variable Kombination des folgenden Spektrums: dilatative Kardiomyopathie, hypertrophe Kardiomyopathie, endokardiale Fibroelastose, Störung der Herzmuskelverdichtung, ventrikuläre Arrhythmien und plötzlicher Herztod, long-QT-Syndrom, verzögertes Erreichen der motorischen Meilensteine, proximale Myopathie, Lethargie und Erschöpfung, Neutropenie mit kompensatorischer Monozytose, rezidivierende bakterielle Infekte, 3-Methylglutaconacidurie, Hypoglykämie, Laktatazidose, Wachstums- und Pubertätsverzögerung, Gedeihstörungen, Lernschwierigkeiten und eine charakteristische Fazies. Das Barth Syndrom ist folglich eine Multisystem-Erkrankung, bei der die phänotypische Breite und die Variabilität, mit der sich die Erkrankung präsentiert, die Diagnostik erheblich erschweren.¹⁴

2.2.4.1 Kardiologische Aspekte

Die Kardiomyopathie ist das dominierende klinische Charakteristikum des Barth Syndroms, mit einer hohen Manifestationsrate in den sehr frühen Lebensabschnitten (70% im 1. Lebensjahr).¹⁷ Die häufigste Form, in der sich die Erkrankung zeigt, ist die dilatative Kardiomyopathie.²⁴ Die früheste bewiesene Herzerkrankung in Folge eines Barth Syndroms ist in der 18. Schwangerschaftswoche dokumentiert worden, wodurch sich die hohe Rate an Tot- und Fehlgeburten in einigen Familien mit Barth Syndrom erklären lässt.²⁵ Des Weiteren verfügt die Hälfte aller Patienten über eine ausgeprägte Störung der Herzmuskelverdichtung, vor allem im linken Ventrikel (left ventricular non-compaction).¹⁴

Die Ejektionsfraktion (EF) und die Verkürzungsfraktion (Fractional shortening, FS) weichen bei einem Großteil der Patienten, wenn auch nur in mildem Ausmaß, von der Norm ab. Einen Zusammenhang zwischen EF, FS und Alter besteht nicht, jedoch scheint es eine inverse Korrelation zwischen EF und zunehmendem Alter zu geben.¹⁷ Eine andere Arbeit wiederum konnte zeigen, dass sich die EF häufig über Jahre stabil hält, wobei die

meisten der echokardiographisch untersuchten Patienten eine kardiale Medikation erhielten. Sobald diese unterbrochen wurde, kam es zu einem Abfall der Ejektionsfraktion, welche sich nach Wiederbeginn der Medikation rasch erholte.²⁶

Das Risiko für Herzrhythmusstörungen, wie zum Beispiel ein long-QT-Syndrom, und plötzlichen Herztod ist bei Patienten mit Barth Syndrom ebenfalls erhöht.²⁷

2.2.4.2 Hämatologische und infektiologische Aspekte

Die Neutropenie ist ein persistierendes oder intermittierendes Merkmal bei 90% der Barth Syndrom Patienten. Manchmal geht sie den anderen Symptomen voraus und wurde sogar schon in Nabelschnurblut diagnostiziert.¹³ Die geringe Menge an neutrophilen Granulozyten ist assoziiert mit bakteriellen Infekten, Ulzerationen im Mund, prolongierten Infekten der oberen Atemwege bis hin zu Sepsis und Multiorganversagen. Ursächlich für die Neutropenie ist ein Arrest der Granulopoese auf der Stufe der Myelozyten.¹³ Dies ermöglicht die Therapie mit Granulozyten-stimulierendem Faktor (G-CSF), wobei dies durch zum Teil sehr schwankende Werte für neutrophile Granulozyten bei einigen Patienten erschwert wird.¹⁷

2.2.4.3 Neurologische Aspekte und skelettale Myopathie

Viele Patienten haben in ihrer Vorgeschichte ein verzögertes Erreichen der Meilensteine der motorischen Entwicklung, z. B. die Fähigkeit frei zu sitzen, zu stehen oder zu laufen wird verspätet erlernt. Zudem berichten fast alle Patienten über chronische Erschöpfung und Lethargie in ihrem täglichen Leben.²⁶ Die Muskelschwäche ist vorherrschend proximal und nicht progressiv.²⁸ Zudem gibt es Hinweise darauf, dass sich die Muskelkraft mit dem Alter verbessert, auch wenn sie nie normal wird.²⁶

Neurologische Defizite sind ebenfalls beschrieben. 50% der Jungen über 3 Jahre haben entweder eine Verzögerung beim Sprechen von ersten Worten

oder beim Zusammensetzen von mehreren Worten. 48% der Jungen über 7 Jahre haben eine Form der Lernschwierigkeit und 33% benötigen eine spezielle Form der Förderung.¹⁷

2.2.4.4 Metabolische Aspekte

Die fünf- bis zwanzigfach erhöhte Ausscheidung von 3-Methylglutaconsäure (3-MGCA) mit dem Urin, zum Teil stark schwankend im Tagesverlauf, ist ein typisches Merkmal des Barth Syndroms.^{29, 30} Jedoch gibt es auch Fälle, bei denen dieses Kriterium nicht aufgetreten ist, weshalb sich die Diagnose nicht nur an der Bestimmung von 3-MGCA orientieren sollte.³¹ Metabolische Auffälligkeiten, die ebenfalls beobachtet wurden, sind eine Hypcholesterinämie bei 24% der Patienten, ein erniedrigtes LDL unter 60 mg/dl bei 56% der untersuchten Betroffenen und ein Transthyretin (Präalbumin) unter 20 mg/dl bei 79% der Patienten.²⁶

Weitere beschriebene Laborbefunde bei zwei Patienten mit Manifestation in den ersten Lebenstagen waren Hypoglykämie, metabolische Azidose, erhöhte Transaminasen, Laktatazidose und milde Hyperammonämie, was gut mit einer angeborenen Störung mit Beteiligung der Mitochondrien zu vereinbaren ist.³²

2.2.4.5 Wachstumsverzögerung und Gedeihstörung

Das typische Bild des Barth Syndroms entspricht in beträchtlichem Ausmaß dem einer Wachstums- und Pubertätsverzögerung. 58% der Patienten, die jünger als 18 Jahre sind, liegen unter der 5. Perzentile für das Gewicht und auf oder unter der 5. Perzentile für die Größe. Das heißt, dass 95% eines entsprechenden Vergleichskollektives schwerer und größer sind, als die untersuchten Kinder und Jugendlichen mit Barth Syndrom. Im Gegensatz dazu sind die Patienten mit einem Alter über 18 Jahren auf der 13. Gewichts-Perzentile und der 50. Höhen-Perzentile, was durch einen verspäteten Wachstumsschub zwischen 15 und 21 Jahren hervorgerufen ist.²⁶

Das Barth-Syndrom-Register berichtet über weitere klinische Probleme, die im Rahmen der Erkrankung auftreten, wie zum Beispiel Gedeihstörungen (54%), wobei in einigen Fällen sogar die Notwendigkeit zur enteralen Zusatzernährung (33%) über eine nasogastrale oder eine PEG-Sonde besteht. Außerdem werden sowohl eine Skoliose (20%) als auch ein verzögertes Knochenalter in Bezug auf das chronologische Alter (58%) beobachtet.¹⁷

2.2.4.6 Typische Facies

Jungen mit Barth Syndrom zeigen auffallend ähnliche engelsgleiche Gesichtszüge. Die typische Facies umfasst ein rundes Gesicht mit prominentem Kinn und vollen Wangen, eine hohe Stirn, große Ohren und tief liegende Augen. Die Merkmale sind vor allem in der Kindheit und der frühen Adoleszenz auffallend und werden während der Pubertät weniger augenscheinlich.³³

2.2.5 Diagnostik

Historisch gesehen hat sich die Diagnosefindung darauf beschränkt, Jungen mit einer Kombination aus kardioskelettaler Myopathie, Neutropenie und 3-Methylglutaconacidurie zu identifizieren. Dies war mit einigen Schwierigkeiten verknüpft, da nicht alle Patienten diese Symptome in gleichem Ausmaß präsentieren. Eine neue Testmethode hilft, diese Problematik zu umgehen. Sie ermöglicht es, direkt die absoluten Zahlen von Tetra-Linolsäure-Cardiolipin (CL4) und Mono-Lysocardiolipin (MLCL) zu analysieren und somit deren Ratio zu berechnen. Dazu müssen lediglich Leukozyten aus einer Blutprobe gefiltert, die Phospholipide extrahiert und dann mittels Flüssigchromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie identifiziert werden. Diese Methode liefert eine hundertprozentige Spezifität und eine hundertprozentige Sensitivität für das Barth Syndrom, jedoch ist sie momentan erst in wenigen Zentren verfügbar. Da sie aber deutlich günstiger als eine *Taz*-Genanalyse ist und das nötige Equipment in den meisten klinischen Labors mit der Möglichkeit zur

metabolischen Untersuchung vorhanden ist, könnte sie als Routine-Diagnostik für Jungen mit idiopathischer Kardiomyopathie in Erwägung gezogen werden.³⁴ Die Diagnostik bei einer auffälligen Cardiolipin-Ratio könnte dann um eine *Taz*-Genanalyse erweitert werden. Die *Taz*-Sequenzierung ermöglicht außerdem die Detektion von weiblichen Anlagenträgern und ein pränatales Screening mittels Chorionzottenbiopsie oder Amniozentese bei diesen.¹⁴

2.2.6 Therapie

Die wichtigsten therapeutischen Möglichkeiten umfassen: medikamentöse Therapie einer Herzinsuffizienz, Herztransplantation, antibiotische Prophylaxe und die Gabe von Granulozyten-stimulierendem Faktor.

Nach ESC-Leitlinien sollte die standardisierte Therapie einer Herzinsuffizienz an sich je nach Ausprägung einen ACE-Hemmer, ersatzweise einen Angiotensin-Rezeptor-Antagonisten, einen Beta-Blocker, einen Mineralocorticoid-Rezeptor-Antagonisten, ein Diuretikum, ggf. Ivabradin und ggf. Digitalis umfassen.³⁵ Bei Patienten mit Barth Syndrom wurde regelmäßig ein gutes Ansprechen, sprich eine Normalisierung der Ejektionsfraktion, auf die oben aufgeführten Medikamente beobachtet. Der probatorische Auslassversuch der Medikation erzeugte ein Absinken der EF, die Reinitiierung jedoch wieder eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion.²⁶

Als Ultima Ratio konnte die Herztransplantation mit erfolgreichem Resultat unter dem Erreichen einer guten Lebensqualität, trotz des hohen peri-operativen Risikos und der relativen Immundefizienz aufgrund der vorbestehenden Neutropenie erfolgen.³⁶ Ebenso beschrieben ist die erfolgreiche Überbrückung eines Patienten bis zur Transplantation mit einem parakorporalen Berlin Heart EXCOR Assist Device für 251 Tage ohne relevanter Infektionskomplikationen trotz einiger Episoden massiver Neutropenie.³⁷ Die dauerhafte Überwachung beziehungsweise Kontrolle von Arrhythmien wird generell bei allen Patienten empfohlen. Außerdem sollten

ventrikuläre Arrhythmien und Symptome wie Synkopen frühzeitig die Implantation eines implantierbaren Kardioverter-Defibrillators (ICD) in Erwägung ziehen lassen.¹⁴

Ebenso zum Therapieprogramm zählen die antibiotische Prophylaxe und die Gabe von Granulozyten-stimulierendem Faktor. Letztere erfolgt durch subkutane Gabe, in der Regel 2-3 µg/kg Körpergewicht, wobei die Frequenz je nach Ausprägung der Neutropenie zwischen zwei Mal pro Woche und einmal täglich variiert.¹⁴ Ein Benefit für die Gabe von L-Carnitin oder Pantothensäure konnte nicht nachgewiesen werden.²⁷

Entscheidend für den Erfolg der Therapie ist der Einsatz eines multidisziplinären Teams, um zum Einen die Hospitalisierungsrate zu minimieren und es zum Anderen einer größeren Anzahl an Patienten mit Barth Syndrom zu ermöglichen, das Erwachsenenalter zu erreichen.¹⁴

2.2.7 Prognose

Historisch gesehen sind die meisten der Patienten schon während der Fetalperiode entweder aufgrund eines Herzversagens oder aber im Rahmen einer gravierenden Infektion gestorben. Eine Arbeit aus dem Jahre 2005 zeigte, dass bereits 70% der Geschwisterkinder von Barth-Syndrom-Patienten gestorben waren, bevor die Diagnose in der Familie gestellt werden konnte. Im Gegensatz dazu sind von den Patienten selbst, bei denen die Diagnose gestellt wurde und die somit einer entsprechenden Therapie zugeführt werden konnten, lediglich 10% verstorben.³⁸ Dies macht die Notwendigkeit, aber auch den Fortschritt durch eine frühzeitige Diagnostik und eine gut abgestimmte Therapie deutlich.

2.3 Cardiolipin und seine Bedeutung für die Mitochondrien

Cardiolipin (CL) ist ein negativ geladenes mitochondriales Phosphoglycerid, genauer gesagt, ein Phospholipid mit vier Fettsäureestern.²¹ Es ist das

dominierende Phospholipid der inneren Mitochondrienmembran (IMM),³⁹ welche auch den Ort seiner Biosynthese darstellt.²¹ Sein Vorkommen, aber auch das Muster der Fettsäureester variiert in verschiedenen Zelltypen. So ist sein Gehalt in oxidierten Geweben wesentlich größer und wird in eben diesen Geweben, wie zum Beispiel Herz- und Skelettmuskel, von Tetra-Linolsäure-Cardiolipin (CL4) dominiert. Diese Cardiolipin-Form mit ihren vier symmetrisch angeordneten Linolsäureresten stellt 70-80% des gesamten CL Gehaltes in diesen Zellen dar.²¹ Durch seine zwei Phosphat-Kopfgruppen und die vier Fettsäureester erhält das Molekül im Gegensatz zu anderen Phospholipiden eine kegelförmige Struktur (s. Abbildung 2).²³

2.3.1 Bedeutung des Cardiolipin für die Struktur der inneren Mitochondrienmembran

Die Prozesse, in die Cardiolipin involviert ist, sind vielfältig. Zum einen sorgt es aufgrund seiner Form für die Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität der inneren Mitochondrienmembran, genauer gesagt der Crista- Struktur mit ihrer parallelen Ausrichtung.^{40, 41} Wobei die Cristae, sprich Einstülpungen der inneren Mitochondrien-Membran, zur Oberflächenvergrößerung dienen und somit entscheidend sind für die Aktivität der Atmungskette. So besteht ein direkter Zusammenhang zwischen CL-Gehalt und Aktivität der Enzyme der Atmungskette.⁴¹ Der folgende Abschnitt verdeutlicht diese Abhängigkeit.

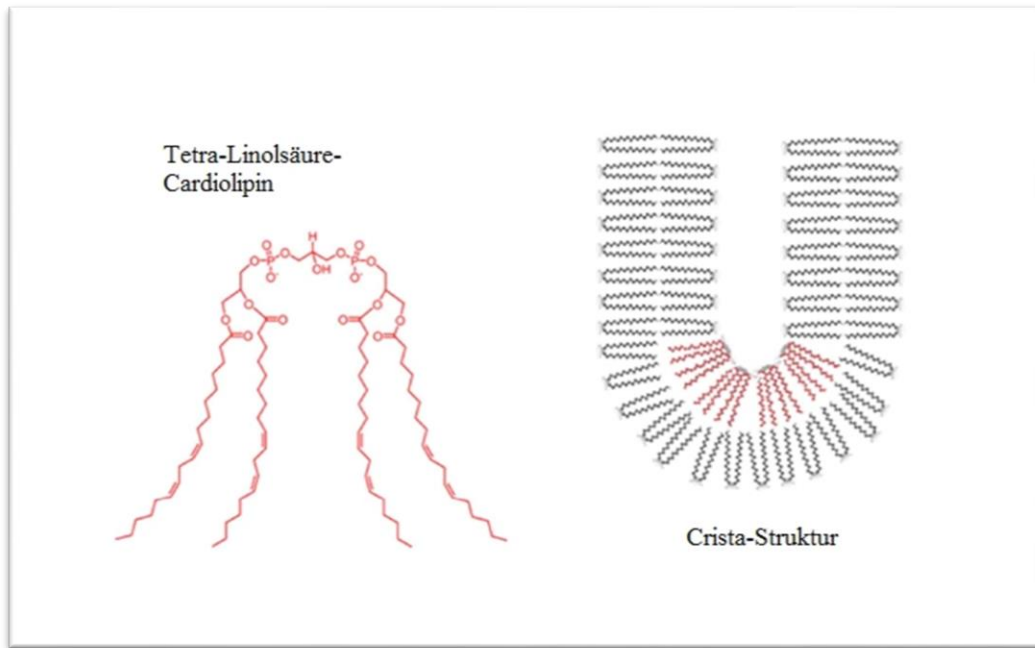


Abbildung 2: Chemische Struktur des Tetra-Linolsäure-Cardiolipin und seine Rolle bei der Entstehung von Krümmungen in Lipidmembranen.

Modifiziert nach Szeto, 2014²³

2.3.2 Bedeutung des Cardiolipin für die Atmungskette und die Entstehung von ROS

Cardiolipin spielt weiterhin eine entscheidende Rolle bei der Vereinigung von Komplexen der Atmungskette zu so genannten Superkomplexen und deren Stabilisierung. So wurde beobachtet, dass bei einem niedrigen Gehalt an CL beziehungsweise einem Vorhandensein abnormaler CL-Formen Komplex IV aus seinem mit Komplex III gebildeten Superkomplex entlassen wird.⁴² Die Superkomplex-Bildung spielt jedoch eine tragende Rolle für die Funktion der Atmungskette in intakten Organellen, da erst sie den optimalen Transport der Elektronen zwischen den Redox-Partnern ermöglicht.⁴³ Bestätigt wurde diese Bedeutung ebenfalls durch Experimente an pluripotenten Stammzellen, die als Modell für das Barth Syndrom dienen.⁴⁴ Mit Hilfe derer konnte gezeigt werden, dass durch die Instabilität der Superkomplexe die mitochondriale Atmung, vor allem die respiratorische Kapazität, d.h. die maximale Auslastung der Atmungskette,⁴⁵ in den Stammzellen stark reduziert war, was letztendlich zu einer mangelhaften Energiebereitstellung in Form von ATP

führt.⁴⁴ Zusätzlich kommt es durch die strukturelle Instabilität der Atmungskette zu einem Elektronenleck, was bedeutet, dass die Elektronen weniger effizient von einem zum anderen Komplex übertragen werden und somit zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zur Verfügung stehen.⁴⁴

2.3.3 Cardiolipin-Peroxidation und SS31

Cardiolipin seinerseits ist aufgrund seines hohen Gehaltes an ungesättigten Fettsäuren und seiner unmittelbaren Nähe zu der Produktionsstätte von ROS (d.h., der Atmungskette) besonders anfällig für oxidativ bedingte Schäden.⁴⁶ Es kann zum einen durch den Angriff von H_2O_2 und zum anderen durch ungünstige Interaktion mit Cytochrom C oxidiert werden, indem dessen Peroxidase-Funktion aktiviert wird. Diese Funktion und die Funktion des Cytochrom C als Elektronentransporter unterliegen je nach Art der Interaktion mit Cardiolipin einem sensiblen Gleichgewicht.²³ Das synthetische Peptid SS31 favorisiert durch die Bindung an Cardiolipin die Funktion des Elektronentransporters über die der Peroxidase, indem es das Aufbrechen der Tertiärstruktur von Cytochrom C verhindert und somit jeglichen oxidativen Angriff auf Cardiolipin unterbindet.⁴⁷ SS31 ist also in der Lage, Schäden, die durch die Oxidation von Cardiolipin entstehen, zu inhibieren. Diese wären im Speziellen die Entstehung von Knoten in den Fettsäureketten und somit eine geringergradige Krümmung der IMM.²³ Dadurch kommt es zu einem Auseinandergleiten der Komplexe der Atmungskette und einem Ablösen von Cytochrom C aus der IMM.²³

Das Peptid SS31 ist ein synthetisch hergestelltes Tetrapeptid, welches zellgängig und wasserlöslich ist. Die zelluläre Aufnahme erfolgt linear und frei von Rezeptor- oder Transporter-vermittelten Prozessen.²³ In das Innere von Mitochondrien gelangt das Peptid rasch und unabhängig vom mitochondrialen Potential. Lokalisiert ist es dann in der IMM und nicht in der mitochondrialen Matrix.⁴⁸ *Birk et. al*⁴⁹ konnten zudem zeigen, dass SS31 zum einen über elektrostatische als auch über hydrophobe Wechselwirkungen selektiv an Cardiolipin bindet. Einige der Effekte, die darüber ausgelöst

werden, wurden bereits oben beschrieben. Letztendlich konnten schon zahlreiche Studien an Tieren einen bemerkenswerten Effekt von SS31 bei unterschiedlichen Krankheiten mit bioenergetischer Fehlfunktion aufzeigen.²³

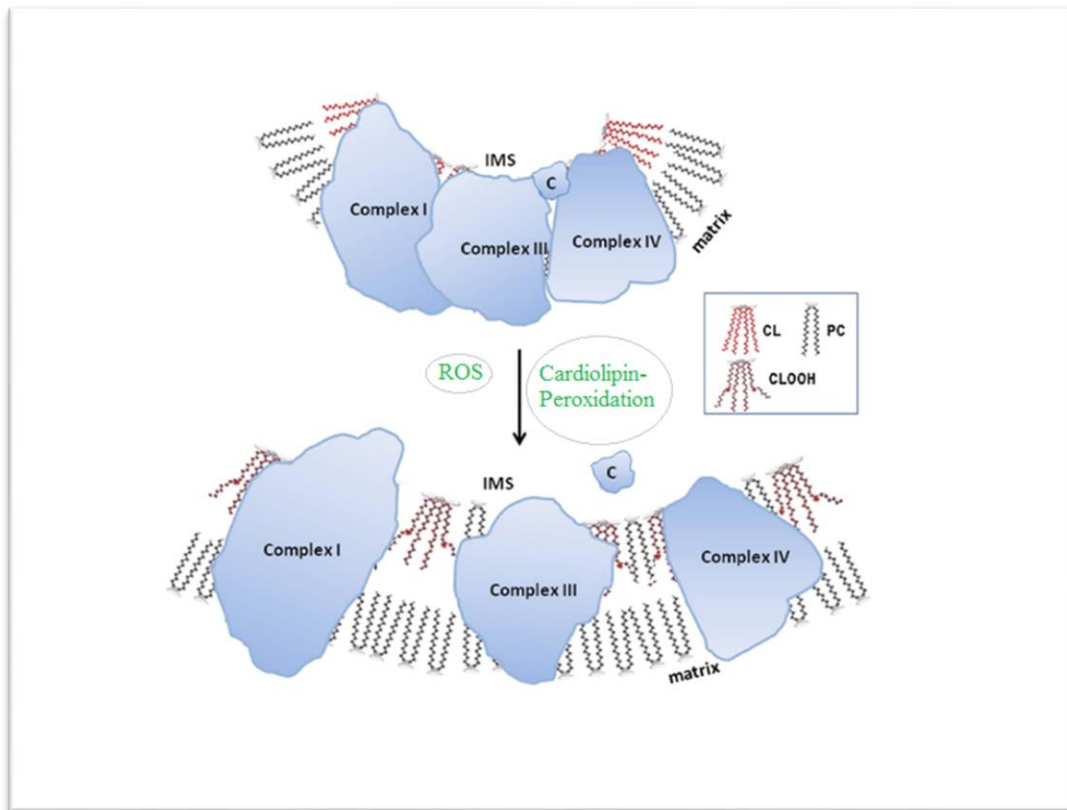


Abbildung 3: Cardiolipin-Peroxidation durch Cytochrom C oder reaktive Sauerstoffspezies destabilisiert die IMM.

Modifiziert nach Szeto, 2014²³

2.3.4 Physikalische Bedeutung des Cardiolipin

Cardiolipin trägt des Weiteren zur Erhaltung der physikalischen Eigenschaften der inneren Mitochondrienmembran, zum Beispiel ihrer Membranfluidität⁵⁰ und ihrer osmotischen Stabilität,⁵¹ bei. Auch ist es für die Aufrechterhaltung des inneren Membranpotentials $\Delta\psi$ und somit für die $\Delta\psi$ -abhängige Proteintranslokation über die IMM entscheidend.⁵² Darüber hinaus fungiert Cardiolipin als Protonenfalle bei der oxidativen Phosphorylierung, wodurch es die Mitochondrien-Kompartimente vor extremen pH-Schwankungen schützt⁵³ und zudem in die mitochondriale Apoptose verwickelt ist.¹⁴

2.3.5 Bedeutung des Cardiolipin für die äußere Mitochondrienmembran

Neben der Rolle, die Cardiolipin für die IMM spielt, hat sich in den letzten Jahren auch seine Bedeutung für die äußere Mitochondrienmembran (OMM) herauskristallisiert. In einem Experiment mit Hefen zeigte sich, dass sich 25% des gesamten Cardiolipin-Gehaltes der mitochondrialen Membranen in der OMM befinden. Da Cardiolipin die Translokase der äußeren Mitochondrienmembran (TOM-Komplex) beeinflusst, die ihrerseits im Inneren des Mitochondriums benötigte Vorläuferproteine unter Abspaltung ihrer Prä-Sequenz durch die äußere Mitochondrienmembran schleust, wird angenommen, dass die mitochondrialen Defekte von Patienten mit Barth Syndrom nicht alleine durch die Abnormitäten der IMM bedingt sind. Im Falle der Translokase kommt es bei Vorliegen abnormaler CL-Formen zu einer teilweisen Beeinträchtigung der Bindung der Vorläuferproteine und somit zu einer reduzierten Einschleusung eben dieser Proteine ins Innere des Mitochondriums.⁵⁴

2.3.6 Veränderungen bei Cardiolipin-Defizienz und die Bedeutung des Cardiolipin für die Mitochondrien-assoziierten Membranen

In einem vor kurzem entwickelten Mausmodell, welches über einen induzierbaren *Taz*-Knockdown (Taz-KD) durch RNA Interferenz Technologie verfügt, stellte sich das mikroskopische Bild der Mitochondrien nach 8 Monaten wie folgt dar: große Mitochondrien-Aggregate befinden sich zwischen den Sarkomeren, wobei diese weniger geordnet und spärlicher vorliegen, als gewohnt.²¹ Dies war mit einer reduzierten systolischen Funktion des Herzens assoziiert. Ähnliche Beobachtungen wurden an Kardiomyozyten gemacht, die aus pluripotenten Stammzellen von Patienten mit Barth Syndrom differenziert wurden.⁴⁵ Die Mitochondrien der Kardiomyozyten aus dem Mausmodell variieren außerdem in Form und Größe und beinhalten häufig große Vakuolen. Zusätzlich verfügen viele von ihnen über eine Crista-Struktur, die dicht gepackt ist und an eine Zwiebelschale erinnert.²¹ Auch bei menschlichen Gewebeproben sind

ähnliche Veränderungen der Mitochondrien aufgefallen. Sie erschienen als stark vergrößert mit Bündeln von kompakt gestapelten, ungeordneten Cristae.⁵⁵

Weitere Auffälligkeiten, die in den Taffazin-defizienten Mäusen beobachtet werden konnten, betrafen die Mitochondrien-assoziierten Membranen, die durch Kontaktstellen zwischen Mitochondrien und dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) gebildet werden.²¹ Sie sind unter normalen Umständen nicht nur für die Kommunikation zwischen SR und Mitochondrien wichtig, sondern auch für den Ca^{2+} -Haushalt der Mitochondrien.²¹ Diese Interaktion ist ein entscheidender Faktor für die Erhöhung der ATP-Produktion als Antwort auf Stress-induzierte Ca^{2+} -Ausschüttung aus dem SR und trägt demzufolge Sorge für eine ständige Anpassung der Energiebereitstellung an die aktuelle Situation der Zelle.⁵⁶ Eine wichtige Rolle spielt dabei das in den MAM angereicherte und sich ebenfalls im SR befindliche „Linker“-Protein Mitofusin 2 (Mfn2),⁵⁷ welches die besagte Interaktion zwischen Mitochondrium und SR reguliert,⁵⁶ indem es interorganelle Brücken bildet.⁵⁷ Bei einem Verlust von Mfn2 kommt es zu einer Verkleinerung der Kontaktfläche zwischen den beiden Organellen, mit dem Trend hin zu einer Spaltbildung. Pathologisches Cardiolipin-Remodeling führt laut Li et al. zu einer Beeinträchtigung der Expression von Mfn2 in der äußeren mitochondrialen Membran.⁵⁸

2.3.7 Elektromechanische Kopplung der Kardiomyozyten

Die elektromechanische Kopplung ist der Prozess von der elektrischen Erregung hin zur Kontraktion des Herzens,⁵⁹ die zur Versorgung des Körpers mit Sauerstoff und Nährstoffen essentiell ist. Dabei ist es wichtig, das auszuwerfende Blutvolumen ständig an die aktuelle Nachfrage anzupassen, sprich die myokardiale Kontraktionskraft im Falle eines erhöhten Sauerstoffbedarfs zu optimieren.⁹ Dies jedoch bedeutet ebenfalls einen erhöhten Energiebedarf der Kardiomyozyten, der durch eine vermehrte Bereitstellung von ATP gedeckt werden muss.

Die elektrische Erregung der Kardiomyozyten zeigt sich in Form eines Aktionspotentials. Durch eine Veränderung des Membranpotentials kommt es zu der Aktivierung schneller, spannungsabhängiger Natrium-Kanäle.⁹ Der daraus resultierende Na^+ -Einstrom induziert eine rasche Depolarisation der Zellmembran und somit die Öffnung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle vom L-Typ.⁹ Am Ende eines jeden Aktionspotentials steht die Repolarisation, für die verschiedene Kalium-Kanäle zuständig sind.⁶⁰ Der eben beschriebene Ca^{2+} -Einstrom sorgt für die Plateauphase des Aktionspotentials⁵⁹ und triggert die Öffnung der in unmittelbarer Nachbarschaft gelegenen Ryanodin-Rezeptoren (RyR2) am sarkoplasmatischen Retikulum, was wiederum den Ausstrom einer weitaus größeren Menge an Ca^{2+} -Ionen aus dem SR in das Cytosol auslöst.⁶¹ Schon ein einziger offener Ca^{2+} -Kanal würde genügen, um diese sogenannte Ca^{2+} induzierte Ca^{2+} -Freisetzung⁶² auszulösen.⁶¹ Die enorme Menge an Ca^{2+} flutet den Raum zwischen SR und Zellmembran und führt somit zu einer enormen Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration in diesem Bereich.⁹ In anderen Gebieten des Cytosols kommt es zu einem deutlich geringeren Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration, weshalb sich der Begriff der Ca^{2+} -Mikrodomänen durchgesetzt hat (s. Abbildung 4).⁶³

Die Ca^{2+} -Ionen binden an die Myofilamente, führen damit zu deren Aktivierung und somit zur Kontraktion der Kardiomyozyten. Dies führt letztendlich zum Auswurf von Blut aus dem linken und dem rechten Ventrikel. Um die Relaxation und somit die passive Füllung der Ventrikel einzuleiten, muss die intrazelluläre Konzentration an freiem Ca^{2+} sinken, sodass das gebundene Ca^{2+} von den Myofilamenten dissoziieren und danach auf verschiedenen Wegen aus dem Cytosol ausgeschleust werden kann.⁵⁹ Hauptsächlich geschieht dies durch die SR Ca^{2+} -ATPase (SERCA) und den sarkolemmalen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX).⁶⁴

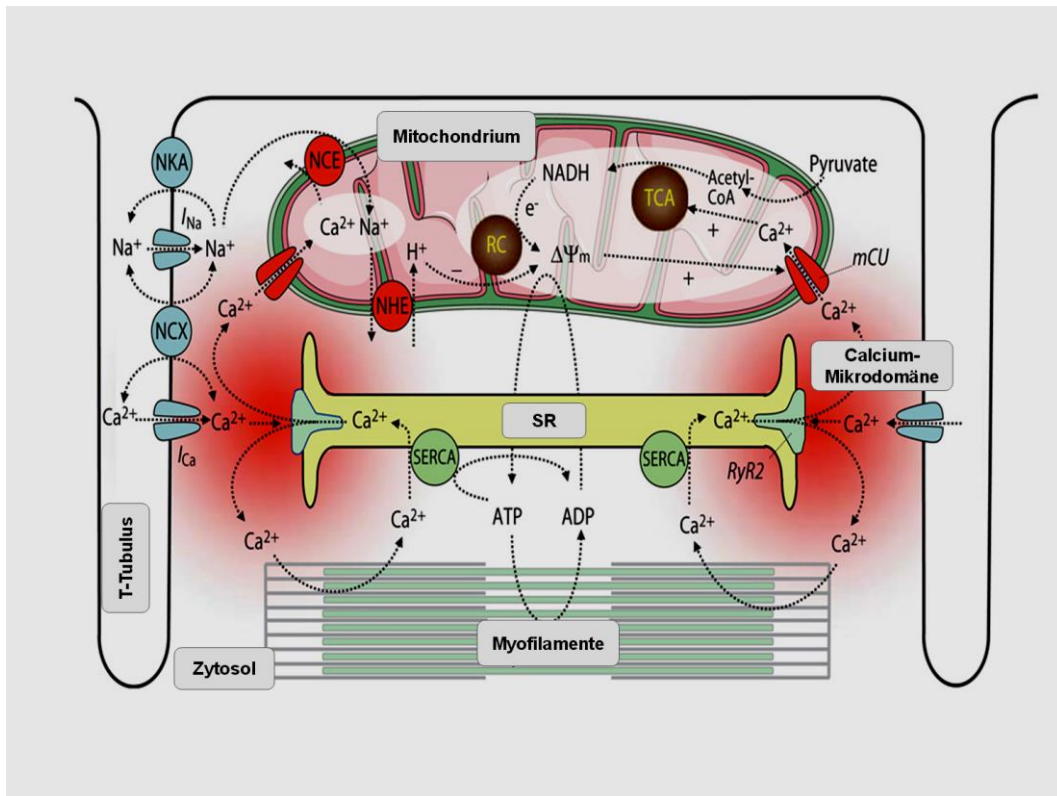


Abbildung 4: Elektromechanische Kopplung, Calcium-Mikrodomänen.

Modifiziert nach Maack und O'Rourke, 2007⁹

2.4 Mitochondriale Energetik

Die eben beschriebenen Vorgänge der elektromechanischen Kopplung verbrauchen eine Menge Energie. Selbst in Ruhe, wenn die Herzfrequenz zwischen 60 und 80 pro Minute beträgt, sind die Hauptverbraucher die Myosin-ATPase, die plasmalemmale Na^+/K^+ -ATPase und die SR Ca^{2+} -ATPase.⁹ Die Energie wird in Form von ATP bereitgestellt, wobei die Mitochondrien mit Hilfe der oxidativen Phosphorylierung ungefähr 92% des gesamten ATP-Haushaltes produzieren⁶⁵ und aus diesem Grund rund ein Drittel des gesamten Zellvolumens einnehmen.⁶⁶

Unter physiologischen Bedingungen entsteht durch den Abbau von Glukose via Glykolyse und Pyruvatdehydrogenase und den Abbau von Fettsäuren via β -Oxidation Acetyl-Coenzym A, welches in den Citratzyklus eingeschleust wird. Das Resultat ist die Entstehung von NADH, $FADH_2$ und Succinat. NADH schleust seine Elektronen auf Ebene des Komplex I in die

Atmungskette ein, und Succinat wird an Komplex II mit Hilfe von FAD als Oxidationsmittel reduziert, sodass FAD zwei Elektronen aufnimmt und an die Atmungskette abgeben kann.^{9, 67} Durch die aufgenommenen Elektronen laufen an den Komplexen I–IV sequentielle Redoxreaktionen ab, die dazu führen, dass Protonen über die IMM gepumpt werden und somit sowohl ein Protonengradient (ΔpH) als auch ein elektrischer Gradient ($\Delta\psi_m$) über der IMM etabliert werden. Diese beiden Gradienten bilden die so genannte „Protonen-bewegende Kraft“ ($\Delta\mu\text{H}$), die letztendlich die ATP-Produktion an der F_1F_0 -ATP-Synthase antreibt. Dabei gehen die Protonen den einzig physiologischen Weg zurück in die Matrix des Mitochondriums, nämlich entlang ihres elektrochemischen Gradienten durch die ATP-Synthase, und treiben dadurch die Umwandlung von ADP zu ATP an.^{9, 68} (Näheres dazu s. Abbildung 5)

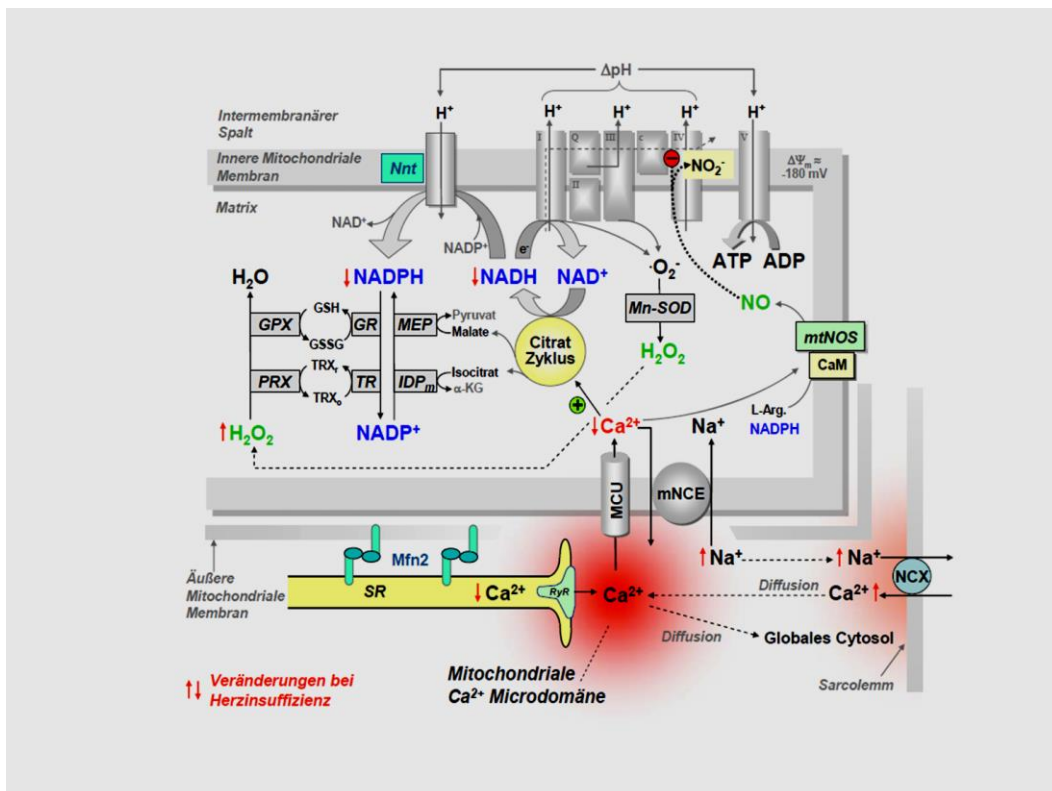


Abbildung 5: Mitochondriale Energetik mit oxidativer Phosphorylierung, Produktion von ROS und den Veränderungen bei Herzinsuffizienz.

Die Abbildung wurde mir von meinem Doktorvater Prof. Dr. C. Maack freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.4.1 Physiologische Anpassung des Energieangebots an die Energienachfrage

Die kardiale Arbeitslast wird hauptsächlich durch β -adrenerge Stimulation erhöht, wodurch sich die Frequenz und auch die Amplitude cytosolischer Calcium-Transienten erhöht, was wiederum den ATP-Verbrauch durch am Ca^{2+} -Zyklus beteiligter Enzyme und die durch Ca^{2+} aktivierten Myofilamente in die Höhe treibt. Die ausgeprägte ATP-Hydrolyse zu ADP stimuliert die F_1F_0 -ATP-Synthase, um das verbrauchte ATP zu regenerieren. Dadurch, dass die Reaktion der F_1F_0 -ATP-Synthase an $\Delta\mu\text{H}$ gekoppelt ist, würde es zu einer Dissipation der Protonen-bewegenden Kraft kommen, wenn nicht gleichzeitig NADH mehr Elektronen an die Atmungskette liefern würde. In Folge dessen liegt NADH vermehrt in oxidiert Form vor, was jedoch dadurch kompensiert wird, dass wie zuvor beschrieben die β -adrenerge Stimulation die cytosolischen Ca^{2+} -Transienten erhöht und somit vermehrt Ca^{2+} in das Mitochondrium gelangt.⁶⁹ Dies geschieht auf verschiedene Wege⁷⁰, jedoch im Speziellen durch den mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter (MCU) (s. Abbildung 4/ Abbildung 5).⁷¹ In der Matrix aktiviert Ca^{2+} allosterisch Schlüsselenzyme des Citratzyklus, um die Regeneration von oxidiertem NAD^+ (und FAD) zu beschleunigen.^{69, 72} Des Weiteren stimuliert Ca^{2+} direkt die Aktivität der F_1F_0 -ATP-Synthase.⁷³ Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Ca^{2+} und ADP die oxidative Phosphorylierung während der physiologischen Schwankungen der kardialen Arbeitslast in komplementärer Weise regulieren und somit zum einen für ein stabiles Verhältnis von ATP/ADP sorgen und zum anderen die Aufrechterhaltung des Redoxstatus von NADH/ NAD^+ in reduziertem Zustand gewährleisten.⁶⁹

2.4.2 Die Mechanismen der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme und des Exportes

Wie zuvor beschrieben, ist der MCU hauptverantwortlich für die Aufnahme von Ca^{2+} in die Mitochondrienmatrix.⁷¹ Der MCU sitzt in der IMM und ist ein hoch-selektiver Ca^{2+} -Transporter,⁷⁴ wobei der große elektrochemische Gradient entlang der IMM die treibende Kraft für den Influx darstellt.⁷¹ Die

Affinität des MCU für Ca^{2+} ist relativ gering, was die Frage aufwirft, mit welcher Kinetik die Mitochondrien angesichts vergleichsweise niedriger Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]$) im Cytosol Ca^{2+} aufnehmen. Dieses vermeintliche Paradoxon wird durch die Idee der Mikrodomänen aufgelöst. Dies bedeutet, dass die RyR des SR und die Mitochondrien in unmittelbarer Nachbarschaft liegen und der MCU somit einer Ca^{2+} -Konzentration ausgesetzt ist, die in diesem Bereich, im Gegensatz zum restlichen Cytosol, ausreichend hoch ist. Gestützt wird dies durch Patch-Clamp Experimente, bei denen in denselben Kardiomyozyten sowohl die cytosolische als auch die mitochondriale $[\text{Ca}^{2+}]$ bestimmt wurde. Dabei zeigten sich tatsächlich während jedem cytosolischen Ca^{2+} -Transienten rapide Veränderungen der mitochondrialen $[\text{Ca}^{2+}]$.^{75, 76}

Ausgeschleust aus dem Mitochondrium wird Ca^{2+} über den NCLX, einen Natrium-Calcium-Lithium-Austauscher, der im Austausch für ein Ca^{2+} Ion drei Natrium-Ionen in das Innere des Mitochondriums lässt (s. Abbildung 4/Abbildung 5). Seinen Namen hat er der Tatsache, dass er anstatt Na^+ auch Lithium (Li^+) transportieren kann, zu verdanken.⁷⁷ Der Na^+ -Import wird durch einen Na^+/H^+ -Austauscher ausgeglichen, wodurch jedoch $\Delta\mu\text{H}$ dissipiert und durch die Atmungskette wiederhergestellt werden muss. Dies macht den Ca^{2+} -Efflux zu einem energetisch sehr aufwendigen Prozess.⁶⁹

2.4.3 Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies

Ca^{2+} spielt nicht nur eine wichtige Rolle bei der Energieproduktion im Mitochondrium, sondern trägt indirekt auch einen entscheidenden Anteil an der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), vornehmlich Superoxidanionen (O_2^-) bei.⁶⁹ Schon unter physiologischen Bedingungen fließt ungefähr 0,2 % des gesamten Sauerstoffes, der an der Atmungskette verbraucht wird, in die Entstehung von O_2^- , wobei als Hauptquelle die Komplexe I und III der Atmungskette gelten.⁷⁸ Um die Enzyme der Mitochondrienmatrix und die mitochondriale DNA vor oxidativen Schäden zu schützen, wird O_2^- durch die Superoxiddismutase zügig in H_2O_2 umgewandelt und dieses wird wiederum durch die Glutathion-Peroxidase und Peroxiredoxin zu H_2O entgiftet (Abbildung 5).⁶⁹ Die H_2O_2 -eliminierenden

Enzyme werden von NADPH-abhängigen Enzymen, wie der Glutathion-Reduktase, regeneriert, wodurch sich die zentrale Rolle von NADPH bei der Eliminierung von mitochondrialen ROS ergibt.⁷⁹ NADPH selbst wird durch drei Enzyme regeneriert, die ihre Substrate allesamt von Produkten des Citratzyklus beziehen (Abbildung 5). Die Schlüsselrolle des Ca^{2+} ergibt sich folglich daraus, dass es drei geschwindigkeitsbestimmende Enzyme des Citratzyklus aktiviert und somit den Redoxstatus von NADPH in reduziertem Zustand bewahrt, um ein Überfluten des Mitochondriums mit H_2O_2 zu verhindern.⁷⁵ So wurde beobachtet, dass beim Blockieren des MCU die Ca^{2+} -abhängige Regeneration von NADPH behindert wurde und es somit zu einer vermehrten Produktion von H_2O_2 kam.⁷⁵ Der Redoxstatus fungiert seinerseits als Feedbackmechanismus für den Ca^{2+} -Ausstrom aus dem SR, d.h. für die elektromechanische Kopplung, da eine vermehrte Produktion an ROS mit einer erhöhten Aktivität des RyR2 korreliert.⁶⁹

2.5 Pathophysiologische Veränderungen bei chronischer Herzinsuffizienz

Das für chronische Herzinsuffizienz typische maladaptive Remodeling führt zu einer systolischen und diastolischen Dysfunktion, was es dem Herzen erschwert, den Körper (insbesondere unter Belastung) mit ausreichend Nährstoffen und Sauerstoff zu versorgen. Ursächlich hierfür sind im Wesentlichen Mängel in der elektromechanischen Kopplung, insbesondere in der Na^+ und Ca^{2+} -Homöostase, ein Energiedefizit und oxidativer Stress. Jedoch sind diese Ursachen nicht getrennt voneinander zu betrachten, da sie in enger Verbindung zueinander stehen.⁸⁰

In insuffizienten Kardiomyozyten ist die Beladung des SR reduziert, was zum einen die Amplitude cytosolischer Ca^{2+} -Transienten reduziert und gleichzeitig im Verlauf über diverse Kompensationsmechanismen (s. unten) die diastolische Ca^{2+} -Beladung im Cytosol erhöht.^{64, 81} Die zugrunde liegenden Defekte sind eine reduzierte Aktivität und Expression der SERCA und ein Leck des RyR2.⁸¹ Des Weiteren ist die überaus gut organisierte

dreidimensionale Struktur der T-Tubuli gestört.⁸² Dies sind Einstülpungen des Sarkolemm, die weit in die Zelle hineinragen und in direkter Nachbarschaft zum SR liegen, mit dem sie über die RyR2 in Kontakt stehen.⁸³ Das dadurch normalerweise effiziente Auslösen des Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Ausstroms in Folge eines Aktionspotentials ist bei Herzinsuffizienz somit abgeschwächt und weniger gut koordiniert. Vielmehr kommt es zu einer zeitlichen und räumlichen Asynchronie der cytosolischen Ca^{2+} -Transienten.⁶⁹

Auf der anderen Seite existieren weitere pathophysiologische Mechanismen bei Herzinsuffizienz, wie zum einen die vermehrte Expression des sarkolemmalen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers (NCX) und zum anderen die Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration ($[\text{Na}^+]_i$).^{84, 85} Dies vermag in gewisser Weise die verminderte Ca^{2+} -Beladung des SR zu kompensieren, da unter diesen Voraussetzungen während eines Aktionspotentials verstärkt Ca^{2+} über den rückwärts gerichteten NCX („reverse mode“) in die Zelle strömt.⁶⁹ Jedoch ist die Kinetik des NCX-vermittelten Ca^{2+} -Einstroms wesentlich langsamer, als die des koordinierten Ca^{2+} -Ausstroms aus dem SR. Darüber hinaus ist der sarkolemmale NCX weiter von den Mitochondrien und somit dem MCU entfernt als das SR, welches eine Mikrodomäne mit Mitochondrien bildet. Alles in allem führt dies dazu, dass die Effektivität der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme in insuffizienten Kardiomyozyten deutlich reduziert ist.⁸⁶ Zudem führt eine bei Herzinsuffizienz erhöhte $[\text{Na}^+]_i$ zu einer Beschleunigung des mitochondrialen Ca^{2+} -Exports über den mitochondrialen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCLX) und somit zu einer Reduktion der $[\text{Ca}^{2+}]_m$ im Steady-State.⁷⁶ Hinzu kommt, dass die treibende Kraft für die mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme über den MCU, das mitochondriale Membranpotenzial ($\Delta\Psi_m$), bei Herzinsuffizienz reduziert ist, was letztendlich die mitochondriale Ca^{2+} -Verarmung aggraviert.⁸⁷ Dies resultiert in einer vermehrte Oxidation von NADPH und NADH,^{75, 76} da Ca^{2+} Schlüsselenzyme des Citratzyklus aktiviert und so zum einen NADH regeneriert und zum anderen die Bildung von NADPH durch Citratzyklus-abhängige Enzyme

ermöglicht. Dies könnte zum energetischen Defizit und oxidativem Stress in Kardiomyozyten beitragen.^{75, 76}

Eine andere Untersuchung im Tiermodell der Herzinsuffizienz konnte zeigen, dass die Blockade des NCLX, was die mitochondriale Ca^{2+} -Konzentration erhöht, nicht nur die mitochondriale ROS Emission reduzierte, sondern auch zu einer Verbesserung des kardialen Remodelings, der LV Funktion und von Arrhythmien führte.⁸⁸ Dies steht im Zusammenhang damit, dass ROS maladaptive Remodelingprozesse induzieren, u. a. durch Induktion von Nekrose, Hypertrophie und Fibrose durch Induktion redoxsensibler Signalwege.^{89, 90} Erhöhte Level an ROS fördern darüber hinaus die kontraktile Dysfunktion, indem sie unter anderem die Aktivität der SERCA inhibieren, was eine Beeinträchtigung sowohl von Kontraktion als auch Relaxation begründet.⁹¹ Die diastolische Störung wird durch rückwärtsgerichteten Einstrom von Ca^{2+} über den sarkolemmalen NCX, der durch ROS induziert wird, verschlimmert.⁹² Letztendlich führt das Phänomen des „ROS-induced ROS release“⁹³ zu Arrhythmien und im schlimmsten Fall zu plötzlichem Herztod, da es zu einer Instabilität von $\Delta\Psi_m$ führt, indem die reaktiven Sauerstoffspezies Ionenkanäle aktivieren, die zur Depolarisation der IMM führen.^{94, 95} Aufgrund der Öffnung der Ionenkanäle kommt es außerdem zu einer Oxidation von NAD(P)H, was wiederum die Produktion von neuen ROS beziehungsweise die reduzierte Entgiftung von H_2O_2 bedingt, wodurch das Phänomen seinen Namen erhalten hat.⁹⁵

Letztendlich wird deutlich, dass das Ausmaß des oxidativen Stresses beziehungsweise die Dauer, die eine Herzmuskelzelle oxidativem Stress ausgesetzt ist, kausal mit dem Progress der Herzinsuffizienz verknüpft ist.^{96, 97}

2.6 Fragestellung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, inwieweit in Mäusen mit globalem Taz-KD, was das Krankheitsbild des Barth Syndroms

simulieren soll, die mitochondriale Funktion beeinträchtigt wird, und ob sich dies auch auf die elektromechanische Kopplung als Ursache für die kontraktile Dysfunktion beim Barth Syndrom auswirkt. Da sowohl energetisches Defizit als auch oxidativer Stress charakteristische Merkmale bei Taz-Defizienz in Zellsystemen, aber auch bei Patienten mit Barth Syndrom sind, soll ein besonderes Augenmerk auf mögliche Mechanismen für oxidativen Stress gerichtet werden. Der möglicherweise fehlerhafte Aufbau der IMM und OMM sowie der Mitochondrien-assoziierten Membranen könnten sowohl zu einer gestörten Kommunikation zwischen Mitochondrien und Ca^{2+} -Speichern als auch zu einem Defizit in der mitochondrialen Energetik führen. Von beiden Defekten wissen wir, dass sie oxidativen Stress bedingen können, wobei wir überprüfen wollten, welche Rolle dies bei einem Anstieg der Arbeitslast in Herzmuskelzellen spielt.

Des Weiteren galt es zu untersuchen, ob eine erhöhte ROS-Produktion, für den Fall, dass sie auftritt, bedingt ist durch eine Beeinträchtigung der Calcium-abhängigen antioxidativen Kapazität und/oder durch eine Erhöhung der primären ROS-Produktion an der Atmungskette durch die gestörte Assemblierung der Superkomplexe.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob das Peptid SS31, welches Cardiolipin stabilisiert, es vermag, den Redoxstatus der Zelle und die Produktion von ROS positiv zu beeinflussen.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden uns freundlicherweise von Herrn Professor Peter Rehling, Institut für Zellbiochemie der Universität Göttingen, zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um Mäuse des Stammes C57BL/129S6, die im ROSA26 Genlocus unter Kontrolle eines induzierbaren Promoters das Gen für eine antisense RNA exprimieren. Diese antisense RNA interferiert im Sinne eines Knockdown spezifisch mit der Tafazzin-RNA (Taz-KD).⁹⁸

Die Genexpression der interferierenden RNA wurde durch die Zugabe von Doxycyclin (625 mg/kg) in das Tierfutter induziert. Eine Woche vor der Verpaarung von nicht defizienten Weibchen mit heterozygoten Männchen (jeweils 8 – 10 Wochen alt) wurde mit der Fütterung von Doxycyclin-haltigem Futter begonnen, wobei nur die Weibchen dieses zu fressen bekamen, um vorbeschriebene Probleme mit der männlichen Fertilität zu vermeiden. Während der Verpaarung wurde das spezielle Futter pausiert und erst nach Feststellung der Schwangerschaft wurden die Weibchen wieder auf die Spezial-Nahrung umgestellt. Ebenso erhielten die geborenen Jungtiere kontinuierlich Doxycyclin-haltige Nahrung.

Um den Einfluss von Doxycyclin an sich zu kontrollieren, wurden jegliche Experimente auch an Doxycyclin-behandelten Wildtyp Geschwistertieren durchgeführt.²¹ Im Alter von ungefähr drei bis vier Wochen wurde den Mäusen ein Biopsat des Ohres entnommen, um mit Hilfe dieser Gewebeprobe eine Genotypisierung vorzunehmen.

Mäuse mit einem Knockdown des Tafazzin-Genes zeigen eine 89 % Reduktion des Tetra-Linolsäure-Cardiolipin-Spiegels und eine Akkumulation von Monolysocardiolipin, vergleichbar mit den Veränderungen bei Menschen mit Barth Syndrom. Zudem weisen die Taz-KD Mäuse nach 8 Monaten

ultrastrukturelle Mitochondriendefekte und eine beginnende LV Funktionsstörung auf.^{21, 98}

Im Verlauf unserer Experimente konnten wir aus den uns von Professor Rehling zur Verfügung gestellten Tieren eine eigene Zucht etablieren.

3.1.2 Verwendete Substanzen

3.1.2.1 Grundstock

Substanz	MG [g/mol]	Molari- tät [mM]	Gewicht [g]	Hersteller
Natriumchlorid, NaCl	58.4	1130.1	66.00	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4	136.1	6.0	0.820	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat, Na_2HPO_4	142	5.99	0.850	
Natriumhydrogencarbonat, NaHCO_3	84	120.2	10.10	VWR, Leuven
Kaliumchlorid, KCl	74.6	46.9	3.50	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Magnesiumsulfatheptahydrat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246.5	12.2	3.00	
Phenolrot	376.4	0.32	0.12	
Kalliumhydrogencarbonat, KHCO_3	101	100	10.10	
HEPES	238	100	2,36	

3.1.2.2 Substanzen zur Herstellung der Myozyten-Isolutionslösung

Substanz	MG	Menge	Hersteller
Grundstock		25 ml	
2,3-Butandion-Monoxim, BDM	101	5 ml	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Salzsäure, HCl	36	2-3 Trpf.	
D-(+)-Glukose, C ₆ H ₁₂ O ₆	180	250 mg	
Natriumhydroxid, NaOH	40	2-3 Trpf.	
Taurin, NH ₂ CH ₂ CH ₂ SO ₃ H	125	928 mg	

Auffüllen mit destilliertem Wasser auf 250 ml.

Einstellen des pH-Wertes mit Hilfe von NaOH und HCl auf 7,46.

3.1.2.3 Substanzen zur Herstellung des Stopppuffer 1

Substanz	Konzentration	Menge	Hersteller
Myozyten- Isolutionslösung		9 ml	
FCS(Fetales Kälberserum)		1 ml	Invitrogen, Karlsruhe
CaCl ₂	10 mM	12,5 µl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

3.1.2.4 Substanzen zur Herstellung des Stopppuffer 2

Substanz	Konzentration	Menge	Hersteller
Myozyten-Isolutionslösung		28,5 ml	
FCS (Fetales Kälberserum)		1,5 ml	Invitrogen, Karlsruhe
CaCl ₂	10 mM	37,5 µl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

3.1.2.5 Substanzen zur Herstellung des Liberasepuffers

Substanz	Konzentration	Menge	Hertseller
Myozyten-Isolutionslösung		20 ml	
Trypsin	70 mg/ml	40 µl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
CaCl ₂	10 mM	25,2 µl	
Liberase TH		1,44 mg	Roche Diagnostics, Indianapolis

3.1.2.6 Substanzen zur Herstellung des Zellmediums

Substanz	Konzentration	Hersteller
Medium 199, GlutaMAX	93%	Invitrogen, Karlsruhe
FCS (Fetales Kälberserum)	5%	
HEPES	1%	
Penicillin G (10.000 Units) / Streptomycinsulfat	1%	

3.1.2.7 Substanzen zur Herstellung der Tyrodelösung

Substanz	MG	Konzentration	Hersteller
L-(+)-Ascorbinsäure	176	7,597 g/l	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
D-(+)-Glukose, C ₆ H ₁₂ O ₆	180	1,802 g/l	
Kaliumchlorid, KCl	75	0,373 g/l	
Kalziumchlorid, CaCl ₂	110	1 mM	
Natrium-Hepes, C ₈ H ₁₇ N ₂ O ₄ Na	260	2,603 g/l	
Natriumpyruvat, C ₃ H ₃ NaO ₃	110	0,220 g/l	
Magnesiumchlorid, MgCl ₂	95	0,203 g/l	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid, NaCl	58	7,597 g/l	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

3.1.2.8 Weitere Substanzen zur Messung an der Zellverkürzungsanlage

Substanz	Konzentration	Hersteller
Antimycin A	150 µM	Sigma Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim
FCCP, Carbonyl Cyanid 4- (trifluoromethoxy)phenylhydrazon	5 µM	
Isoprenalin	3 * 10 ⁻⁸ M	
H ₂ O ₂	10 mM	Merck, Darmstadt
Natriumzyanid, NaCN	4 mM	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
SS31	1 nM, 5 nM, 10 nM, 100 nM	GenScript USA Inc., Piscataway, USA

Bei der Messung von MitoSOX wurden 5 µl Antimycin A mit Hilfe einer Pipette direkt auf den Objektträger gegeben.

3.1.2.9 Farbstoffe zur Myozytenfärbung

Farbstoff	Hersteller
MitoSOX Pluronic F-127	Invitrogen, Karlsruhe
DCF Pluronic F-127	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.2.10 Substanz zur Beschichtung der Deckgläschen

Substanz	Konzentration	Hersteller
Laminin aus Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Maus-Sarkom	0,5 mg/ml	Roche Diagnostics, Indianapolis, USA

3.1.2.11 Direkt an den Versuchstieren angewandte Substanzen

Substanz	Menge	Hersteller
Heparin-Natrium aus Schweinedarmmukosa	0,5 ml = 2500 I.E.	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Isofluran	1,5-2 Vol% Isofluran und 0,5 l O ₂ /min	Baxter, Unterschleißheim
Rimadyl Injektionslösung, 1 ml enthält 50 mg Carprofen und 10 mg Benzylalkohol	0,1 ml = 5 mg Carprofen und 1 mg Benzylalkohol	Pfizer GmbH, Karlsruhe
Softasept N Hautdesinfektionsmittel		B. Braun Melsungen AG, Melsungen

3.1.3 Präparations- und Isolationsinstrumentarium

Verwendetes Instrumentarium zur Kanülierung und Perfusion der Herzen

Instrument	Hersteller
Aortic Cannula Ø 1 mm	Hugo Sachs Elektronik – Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten
Langendorff- Perfusionsanlage	
Feinschere 14088-10	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Lauda Ecoline Staredition Wärmethermostat mit Edelstahlbad und Variopumpe	Lauda Dr. R. Wobser, Lauda- Königshofen
Pinzette zum Kanülieren, FD281R	Aesculap, B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Pinzette zur Thorakotomie, 11272-30	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Schere 233-2121	VWR, Darmstadt

3.1.4 Narkosesystem

Die Anlage zur Betäubung der Versuchstiere setzt sich aus folgenden Einzelkomponenten zusammen:

- Fluovac Gas Evacuation System
- Keyfill Adapter
- Oxygen Flowmeter (Fluss 0,5 ml/min mit 5% Isofluran)
- Tube Adapter to Fluosorber
- Vaporizer Key Fill Isoflurane
- Gasflasche (5% CO₂ in 95% O₂), Praxair, Düsseldorf
- Gasdruckminderer, GCE Rhöna, Fulda

Alle Einzelkomponenten ohne Herstellerangaben wurden von der Firma Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH aus March-Hugstetten bezogen.

3.1.5 Anlage zur Messung der Fluoreszenz

Die Anlage setzt sich aus folgenden Einzelkomponenten zusammen:

- Acquisition Computer, Firma DELL
- CFA Option D: Dual Emission option for CFA300
- CFA300 Cell framing adapter
- FSI700 Fluorescence system interface
- MCS100 Myo-Cam-S Digital Variable field rate CCD
- MUS200 μ Step stand alone filter wheel and controller
- PMT400 Photomultiplier sub-system
- PTV100 PMT to Voltage Adapter
- Constant Current / Voltage Isolated Stimulators (DS2A / DS3), Warner Instruments
- Mikroskop Nikon Ti-S/L100, Nikon GmbH Düsseldorf
- Xenon short arc lamp (75W), Ushio Inc. Tokyo
- IONWZ IonWizard Core + Analysis (Software)
- SARCACQ SarcLen Messeinheit für Sarkomerlänge (Software)
- Model TC-324B Heater Controller, Single Channel
- Stimulus Isolation Unit (SIU-102), Warner Instruments
- Filter und Spiegel (s. Tabelle 1), Chroma Technology GmbH, Fürstenfeldbruck

Alle Geräte ohne Herstellerangaben wurden von der Firma IonOptix aus Dublin, Irland bezogen.

3.1.6 Übersicht über die verwendeten optischen Filter und Spiegel

Spiegel/ Bezeichnung	Spiegel [nm]	Transmission [nm]	Farbstoffe	Ort	Typ
T660LP XR		>660	Durchlicht	Mikroskop	
89017bs F/TR /120289	340/490	435/>505	NAD(P)H/F AD ⁺ /DCF	Mikroskop	Strahlenteiler
400DCL P	<400	>400	MitoSOX	Mikroskop	Strahlenteiler
650DCX R	<650	>650	Durchlicht	Vor der Kamera	Strahlenteiler in den Cubes
490DCL P	<490	>490	NAD(P)H/F AD ⁺	PMT Spiegel	Strahlenteiler in den Cubes
Reiner Spiegel	Alles		NAD(P)H/F AD ⁺	PMT Spiegel	Strahlenteiler in den Cubes
D435/35 x		435±17,5	NAD(P)H	Vor den PMT's	Filter
D525/30 x		525±15	FAD ⁺	Vor den PMT's	Filter
D340/12 x		340±6	NAD(P)H	Filterrad (1)	Anregungs- filter hinter der Lampe
S490/ 20x		490±10	FAD ⁺	Filterrad (2)	Anregungs- filter hinter der Lampe
D380±1 5		380±15	MitoSOX	Filterrad (6)	Anregungs- filter hinter der Lampe

Tabelle 13: Übersicht über die verwendeten Spiegel, deren Transmissionen und die Lokalisation im Versuchsaufbau, sowie die Farbstoffe, bei denen der jeweilige Spiegel zum Einsatz kam.

3.1.7 Materialien und Geräte für die Versuchsreihe an Mitochondrien

Instrument/Gerät	Hersteller
Clark-Elektrode, Oxygen Electron control unit	Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, UK
Hamilton Spritze 702 N SYR	Hamilton Messtechnik GmbH, Höchst
Infinite M200 Pro Mikroplatten-Reader	Tecan, Männedorf, Schweiz
Mikrotiter 96-Well UV Microplates	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate	Invitrogen by Life Technologies GmbH, Darmstadt
Micro Amp Optical Adhesive Film	
Kühlzentrifuge, Heraeus Fresco 21	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Wasserbad HAAKE B3 + HAAKE C10	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
ESP 300e Spektrometer mit einem 4102ST Standard-Resonator	Bruker Corporation, Billerica, USA
Photometerküvetten 10 x 10 mm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Potter S	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Mini-PROTEAN Tetra Elektrophorese-Kammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Power Pac Basic Power Supply	
Precision Plus Protein Standards Dual Color	
Schere 233-2121	VWR, Darmstadt
Uhrmacherpinzette	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg

3.1.8 Substanzen für die Versuchsreihe an Mitochondrien

3.1.8.1 Substanzen zur Herstellung der Mitochondrien-Isolutionslösung

Substanz	Konzentration/Menge	Hersteller
D-Mannitol	225 nM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
HEPES	2 nM	
EGTA (Ethylinglycol-bis(aminoethylether)-tetraessigsäure)	1 mM	
Saccharose	75 nM	Merck, Darmstadt
Tris Base (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Einige Trpf.	VWR International, Darmstadt
Tris HCl (Tris Hydrochlorid)	Einige Trpf.	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Einstellen des pH-Wertes mit Hilfe von TrisBase oder Tris HCl auf 7,4.

3.1.8.2 Substanzen zur Herstellung der Mitochondrien-Suspensionslösung

Substanz	Konzentration	Hersteller
D-Mannitol	225 nM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
HEPES	2 nM	
Saccharose	75 nM	Merck, Darmstadt
Tris Base (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Einige Trpf.	VWR International, Darmstadt
Tris HCl (Tris Hydrochlorid)	Einige Trpf.	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Einstellen des pH-Wertes mit Hilfe von TrisBase oder Tris HCl auf 7,4.

3.1.8.3 Substanzen zur Herstellung der BSA/Proteinase-Lösung

Substanz	Konzentration	Hersteller
BSA (Albumin from bovine serum)	4 mg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Proteinase (bakteriell)	1,6 mg/ml	

Das Verhältnis von BSA zu Proteinase betrug 90 zu 10.

3.1.8.4 Weitere zur Mitochondrienisolation benutzte Substanzen

Substanz	Konzentration	Hersteller
Ketavet (Ketaminhydrochlorid)	100 mg/ml	Pfizer GmbH, Karlsruhe
Rompun (Xylazinhydrochlorid)	23,32 mg/ml	Bayer Vital GmbH, Leverkusen

Das Verhältnis von Ketavet zu Rompun betrug 2 zu1.

3.1.8.5 Substanzen zur Herstellung des Atmungspuffers

Substanz	Konzentration/Menge	Hersteller
Kaliumchlorid, KCl	137 mM	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat, KH_2PO_4	2 mM	
Magnesiumchlorid, MgCl_2	2,5 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
HEPES	20 mM	
EGTA (Ethylinglycol-bis(aminoethylether)-tetraessigsäure)	0,5 mM	
Salzsäure, HCl	Einige Tropfen	
Kaliumhydroxid, KOH	Einige Tropfen	

Einstellen des pH-Wertes mit Hilfe von KOH oder HCl auf 7,2.

3.1.8.6 Substratzugabe während der Atmungsmessung

	Substrat	Konzentration (final)	Menge	Hersteller
1.	Pyruvat/Malat-Lösung	500 mM	20 µl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
2.	ADP-Lösung	30 µM	10 µl	
3.	ADP-Lösung	100 µM	10 µl	
4.	ADP-Lösung	300 µM	10 µl	
5.	ADP-Lösung	1 mM	10 µl	
6.	Oligomycin	1,2 µM	10 µl	

3.1.8.7 Zur Proteinbestimmung verwendete Substanzen

Substanz	Hersteller
Reagent A	Bio-Rad, Laboratories GmbH, München
Reagent B	
BSA (Albumin from bovine serum)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

3.1.8.8 Zur NADPH-Messung verwendete Substanzen

Substanz	Konzentration	Hersteller
Atmungspuffer	Zusammensetzung s. o.	
Pyruvat/Malat	5 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
ADP (Adenosine 5'-diphosphate monopotassium salt dihydrate)	30 µM/ 100 µM/ 300 µM/ 1 mM	
Dinitrophenol, DNP	250 µM	
Natriumzyanid, NaCN	2,5 mM	
		Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

3.1.8.9 Zur paramagnetischen Elektronenresonanzspektroskopie
verwendete Substanzen

Substanz	Konzentration	Hersteller
CMH	300 µM	Noxygen
Pyruvat/Malat	25 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
ADP	5 mM/ 10 mM	
Antimycin A	15 µM	
DNP	0,5 mM	

3.1.8.10 Zur Amplex-Red-Messung verwendete Substanzen

Substanz	Konzentration	Hersteller
Atmungspuffer	Zusammensetzung s. o.	
Amplex UltraRed Reagent, AUR	50 µM	Invitrogen by Life Technologies GmbH, Darmstadt
Horseradish Peroxidase, HRP	0,5 U/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
SOD(Superoxide Dismutase from bovine Erythrocytes, zur Umwandlung von $\cdot\text{O}_2^-$ zu H_2O_2)	100 U/ml	
Pyruvat/Malat	5 mM	
ADP (Adenosine 5'- diphosphate monopotassium salt dihydrate)	30 µM/ 100 µM/ 300 µM/ 1 mM	
Antimycin A (from Streptomyces sp.)	15 µM	
Dinitrophenol, DNP	5 mM	

3.1.9 Sonstige Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte

Material / Gerät	Hersteller
Deckgläschen	VWR International, Darmstadt
Discofix C Dreiwegehahn	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Exadrop Tropfenregler mit Infusionsgerät	
Isotone Kochsalzlösung 0,9 %	
Original Perfusorspritze 50 ml	
Aqua destillata	
Ethicon Mersilene Polyesterfaden 5.0	Johnson-Johnson, Neuss
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Falcon, Blue Max. 15 ml und 50 ml	Becton Dickinson, N.J., USA
Polypropylene Conial Tube	
Immersionsöl	Cargille Laboratories Inc., Cedar Grove, N.J., USA
MoliNea plus L, Unterlagen	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Nadel BSS Microlance 3	Becton Dickinson, N.J., USA
Spritze 1ml BD Plastipak	
Pipetten, Eppendorf Reference 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten, Eppendorf Research 10 µl, 100 µl, 1000 µl	
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
SafeSeal Reagiergefäße, 2 ml	Praxair, Düsseldorf
Zellkulturschalen Ø 100 x 20 mm	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschalen Ø 60 x 15 mm	
Binokular, SMZ645	Nikon, Düsseldorf
Feinwaage, ABS 120-4	Kern & Sohn GmbH, Ballingen
Gefrierschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
Magnetrührer CAT 6.1	Ingenieurbüro CAT, M. Zipperer GmbH, Staufen

pH Elektrode SenTix 22	WTW, Weilheim
pH-Meter, Eutech Instruments, pH 510	VWR, Darmstadt
Zentrifuge Galaxy 16DH	
Vakuumpumpe SP392SA	Schwarzer Precision, Essen
Vortex Mixer, SN 41119030	Labnet International, N.J., USA
Wärmeschrank Hereaeus	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0 R	

3.2 Methoden

3.2.1 Methoden zur Messung an Kardiomyozyten

3.2.1.1 Mausmyozytenisolation

Zunächst wurde die Perfusionsanlage dementsprechend vorbereitet, dass ein Kolben mit Perfusionspuffer und der andere mit Liberasepuffer luftblasenfrei gefüllt waren.

Daraufhin wurden der Maus zunächst Heparin und Schmerzmittel (Menge s. Tabelle 11) gespritzt. Diese Substanzen ließ man für ungefähr 10 Minuten einwirken, bevor die Maus mit Isofluran betäubt wurde. Dafür positionierte man ihre Schnauze so, dass sie innerhalb des dafür vorgesehenen Anschlusses des Narkosegerätes für Kleintiere zu liegen kam. War die Narkose tief genug und somit die Reflexe erloschen, dies testete man an Hand des Zwischenzehenreflexes, wurde mit der Desinfektion von Bauch und Thorax mit SoftaSept begonnen. Es folgte die Thorakotomie in Form eines V-förmigen Schnittes vom Bauchnabel in Richtung Axilla. Mit Hilfe einer Pinzette wurde das Sternum fixiert, um das Zwerchfell von den Rippenbögen zu trennen und anschließend die Rippen bis zum Hals zu durchtrennen. Nachdem das Herz auf diese Art und Weise freigelegt wurde, konnte es mit Hilfe einer Feinschere kurz unterhalb des Aortenbogens abgetrennt und in eine Schale gelegt werden. Unter dem Binokular wurde es von jeglichem umliegenden Gewebe getrennt und über die Aorta kanüliert, sodass es mit der Langendorff-Perfusionsanlage verbunden werden konnte. Nun wurde für vier Minuten Myozyten-Isolutionslösung (s. Tabelle 2) und anschließend für ungefähr fünf Minuten Liberasepuffer (s. Tabelle 5) durch das Herz geleitet. Dass das Herz gut verdaut war, erkannte man daran, dass es aufquoll und deutlich klarer wurde, wobei dies lediglich ein Indiz war und wir uns vornehmlich an den zuvor bestimmten Zeiten, die im Bereich von 5 Minuten und 5 bis 15 Sekunden lagen, orientiert haben. Nach abgeschlossener Digestion wurde das Herz unterhalb der Vorhöfe abgeschnitten und in eine Schale mit Myozyten-Isolutionslösung aufgenommen. Nachdem es viermal eingeschnitten wurde, konnte es in eine

andere Schale mit genau 5 ml der Myozyten-Isolutionslösung überführt werden. In diese wurden nun zusätzlich 5 ml des Stopp-Puffer 1 (s. Tabelle 3) gegeben und die beladene Schale für fünf Minuten vorsichtig geschwenkt. Dies verfolgte das Ziel, die Myozyten zu vereinzeln, was wiederum nur, durch die zuvor zugeleiteten Enzyme, die die Zell-Zellkontakte aufgebrochen haben, möglich wurde. Im Anschluss wurde ein Tropfen der Flüssigkeit entnommen, um die Kardiomyozyten unter dem Mikroskop zu beurteilen.

Bei guter Qualität der Präparation, die sich durch gut erkennbare Querstreifung der stabförmigen Zellen und möglichst ohne abgerundete Zellenden darstellt, wurden die gelösten Myozyten in ein 15 ml großes Röhrchen gegeben, damit sie sich in ungefähr acht Minuten am Boden als Pellet absetzen konnten. Der Überstand wurde in ein separates Röhrchen überführt und für eine Minute bei 800 U/min zentrifugiert. Das erste Pellet wurde mit 5 ml Stopp-Puffer 2 (s. Tabelle 4) resuspendiert. Ebenso wurde mit dem durch das Zentrifugieren entstandene zweiten Pellet verfahren, nachdem man auch hier den Überstand verworfen hatte. Im Anschluss daran wurden beide Lösungen vereint und dem Ca^{2+} -Aufbau zugeführt, bei dem alle vier Minuten neue Ca^{2+} -haltige Lösung (s. Tabelle 26) zu den Zellen hinzugegeben wurde.

Sobald dieser Vorgang abgeschlossen war, wurde die Lösung in ein 15 ml Röhrchen überführt. Nach achtminütiger Sedimentation konnte der Überstand abgenommen und zentrifugiert werden. Beide Pellets wurden daraufhin zusammengeführt und zu 25 ml des auf 37 °C vorgewärmten Zellmediums (s. Tabelle 6) hinzugegeben. Die Aufbewahrung der Kardiomyozyten erfolgte bis zu ihrer Verwendung in einem Wärmeschrank bei 37 °C und 5% CO_2 Atmosphäre.



Abbildung 6: Herz in Langendorff-Perfusionsanlage

- A) Komplettes System mit Herz
- B) Nahaufnahme eines in der Anlage hängenden Herzens

Ca^{2+} -Aufbau:

Nacheinander wurden folgende Kalziumlösungen hinzugegeben:

	Substanz	Menge
1.	CaCl_2 10 mM	50 μl
2.	CaCl_2 10 mM	50 μl
3.	CaCl_2 10 mM	100 μl
4.	CaCl_2 100 mM	30 μl
5.	CaCl_2 100 mM	50 μl

3.2.1.2 Beschichtung der Deckgläschen

Um die Kardiomyozyten für die Messungen zu fixieren, wurden die Objektträger mit Laminin beschichtet. Dieses wurde mit Hilfe einer Pipette in einer Menge von 4 μl mittig aufgetragen. Bevor die Zellen nun samt Medium

auf die Deckgläschen transferiert werden konnten, wurden 20 Minuten abgewartet. Um das Anhaften der Myozyten zu gewährleisten, war es empfehlenswert, eine fünfminütige Ruhezeit einzuplanen, ehe mit den Messungen begonnen wurde.

3.2.1.3 Messungen an der Zellverkürzungsanlage

An der Zellverkürzungsanlage von der Firma ION Optix wurden die zuvor präparierten Kardiomyozyten einem definierten Messprotokoll (s. Abbildung 11) ausgesetzt. Dieses diente dazu, physiologischen Stress zu simulieren. Für die Messungen von NADH und FAD^+ waren keine speziellen Vorbereitungen der Kardiomyozyten nötig, wobei bei einigen Messungen im Rahmen dieses Protokolls die Zugabe von SS31 (Konzentration s. Tabelle 8) zur Zellsuspension erfolgte. Für die Durchführung des MitoSOX-beziehungsweise DCF-Protokolls mussten die Zellen jedoch für die Dauer von 30 beziehungsweise 15 Minuten bei einer Temperatur von 37 °C mit dem jeweiligen Farbstoff inkubiert werden (Näheres zur Inkubation s. 3.2.1.4.2 und 3.2.1.4.3). Daraufhin konnten die Messungen beginnen. Dafür wurden einige Tropfen der Zellsuspension, auf einen mit Laminin beschichteten Objektträger gegeben, der zuvor in eine Zellkammer eingespannt wurde, welche sich auf einer Heating Plattform befand. Zur Abdichtung der Kammer wurde Silikonpaste verwendet. Als Gerät, welches die Kardiomyozyten durch Stromreize stimulierte, diente ein selbstkontrollierend arbeitender, auf 100 mA eingestellter Stimulator. Seinen Impuls erfuhr er über einen frequenzvariablen Taktgeber. Weitergeleitet wurde der Stimulationsimpuls mit Hilfe zweier, sich an der Kammer befindenden Platinelektroden, die mit dem Zellmedium in Kontakt standen. Die vorbereitete Kammer, samt Heating Plattform, wurde nun auf das Mikroskop aufgesetzt. Gearbeitet wurde mit einem 40er Öl Immersionsobjektiv. Es folgte der Anschluss, sowohl an ein „customer made“ Zulaufsystem, als auch an ein Auffanggefäß, welches an eine Vakuumpumpe angeschlossen war. Die zugeleiteten Flüssigkeiten wurden per Durchflusserhitzer auf ca. 37 °C erwärmt. Als Lichtquellen dienten zwei verschiedene Lampen. Die eine, erzeugte Licht, das von oben auf den

Objektträger fiel und der Myocam die nötigen Bilder lieferte. Bevor es jedoch auf das Objekt traf musste es einen Filter passieren, den nur Wellenlängen über 660 nm als sogenanntes Durchlicht durchdringen konnten. Die zweite Lichtquelle stellte die Xenon Lampe dar und diente zur Anregung der Farbstoffe. Zusätzlich war ein μ -Stepper vor das Mikroskop geschaltet, der ein Filterradd mit sechs Filterplätzen enthielt. Der jeweilige Filter diente dazu, je nach verwendetem Farbstoff und somit variierender Anregungswellenlänge, einen bestimmten Wellenlängenbereich hindurch zu lassen. Das Licht dieses definierten Wellenlängenbereiches traf daraufhin auf ein in das Mikroskop eingebauten Strahlenteiler der dafür sorgte, dass das einfallende Licht im 90° Winkel reflektiert wurde und somit auf die Zellkammer, inklusiver Kardiomyozyten, auftraf. Das emittierte Licht, entstanden durch die Fluoreszenz der Farbstoffe (MitoSOX und DCF) beziehungsweise die Autofluoreszenz von NAD(P)H und FAD⁺, konnte den Strahlenteiler passieren und daraufhin auf einen Photomultiplier auftreffen. Zuvor wurde es durch, sich in Cubes befindenden, Filtern je nach Wellenlänge verteilt. Der Wechsel der Cubes und somit die Wahl der Filter erfolgte per Hand (s. Abbildung 8 und Abbildung 9). Die durch den Photomultiplier detektierten Photonen wurden durch den selbigen in Spannungssignale umgewandelt und in das Fluorence System Interface weitergeleitet. Dieses Gerät fungierte als Schnittstelle zwischen Photomultiplier, Taktgeber und Computer. Die Aufzeichnung und Analyse, der so in den Computer eintreffenden Daten, erfolgte über die Software Ion Wizard 6.4 revision 1 von Ion Optix LLC. Des Weiteren war die Software in der Lage die Sarkomerlängenverkürzung zu berechnen. Dies erfolgte auf der Grundlage der Bilder der Myo-Cam, einer schwarz-weiß Kamera, die die Zelle in Echtzeit filmte und ihre Aufzeichnungen an den Computer weiterleitete. (Näheres zum Versuchsaufbau s. Abbildung 7)

Nach dem Beenden der Vorbereitungen konnte mit den Aufzeichnungen begonnen werden. Dazu musste zuerst eine geeignete Zelle im Sichtfeld positioniert und scharf gestellt werden. Daraufhin wurde für einen Zeitraum von 120 Sekunden die Normaltyrode (NT, s. Tabelle 7) eingespült und die

Zelle mit 0,5 Hz stimuliert. Diese so genannte Einschlagphase diente der Zelle zur Gewöhnung an die vorherrschenden Versuchsbedingungen. Im Anschluss daran wurde so lange Isoprenalin zugeleitet, bis eine Steigerung der Kontraktilität beobachtet werden konnte. Im Regelfall war dies nach ungefähr 60 Sekunden der Fall. Nun wurde die Frequenz, unter weiterem Zulauf von Isoprenalin, mittels Taktgeber für 180 Sekunden auf 5Hz erhöht. Anschließend wurde sowohl die Flüssigkeitszufuhr wieder auf NT umgestellt, als auch die Frequenz auf 0,5 Hz zurückgedreht. Dieser Zustand wurde für ungefähr 60 Sekunden aufrechterhalten, sodass die Zelle sich von dem zuvor simulierten Stress erholen konnte. Die nachfolgenden Schritte zur Kalibrierung variierten je nach zu messender Substanz (Näheres s. Messprotokoll, Abbildung 11).

Schematischer Versuchsaufbau

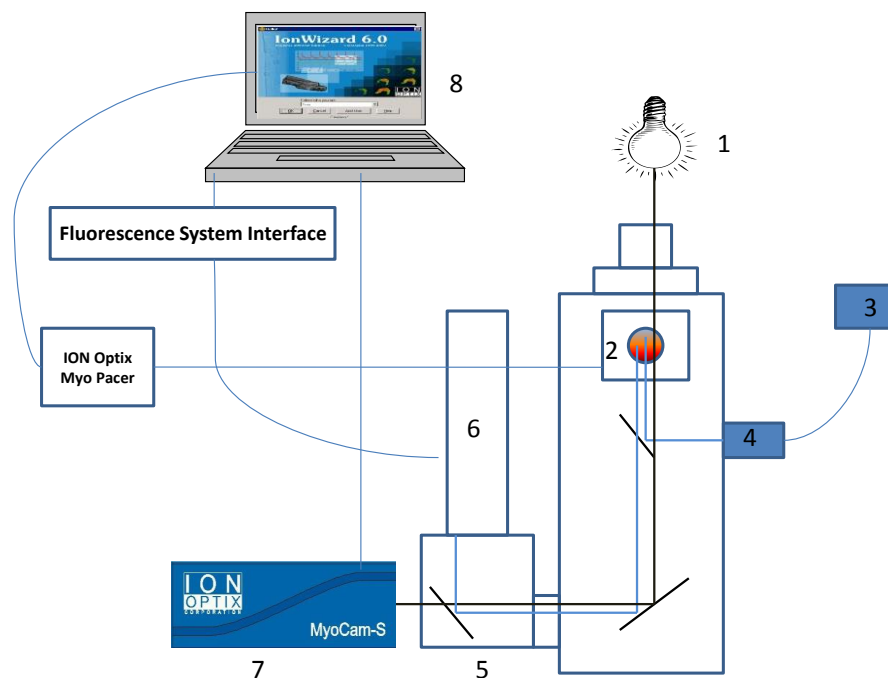


Abbildung 7: Schematische Darstellung der IonOptix-Anlage zur Messung der Fluoreszenzen und der Sarkomerlänge

- 1) Lampe zur Darstellung der Myozyten und zur Sarkomerlängenmessung, schwarze Linie = Durchlicht
- 2) Heating Plattform inklusiver Zellkammer auf Mikroskoptisch
- 3) Xenon Arc Lamp, blaue Linie = Anregungslicht & Emissionslicht der Farbstoffe
- 4) μ -Step mit Filterrad
- 5) Zell- Frame Adapter inklusiver Cubes
- 6) Fotomultiplier 1 bis 3
- 7) MyoCam S
- 8) Computer mit Programm Ion Wizard von IonOptix

Einstellungen der Photomultipliertubes (PMT) I

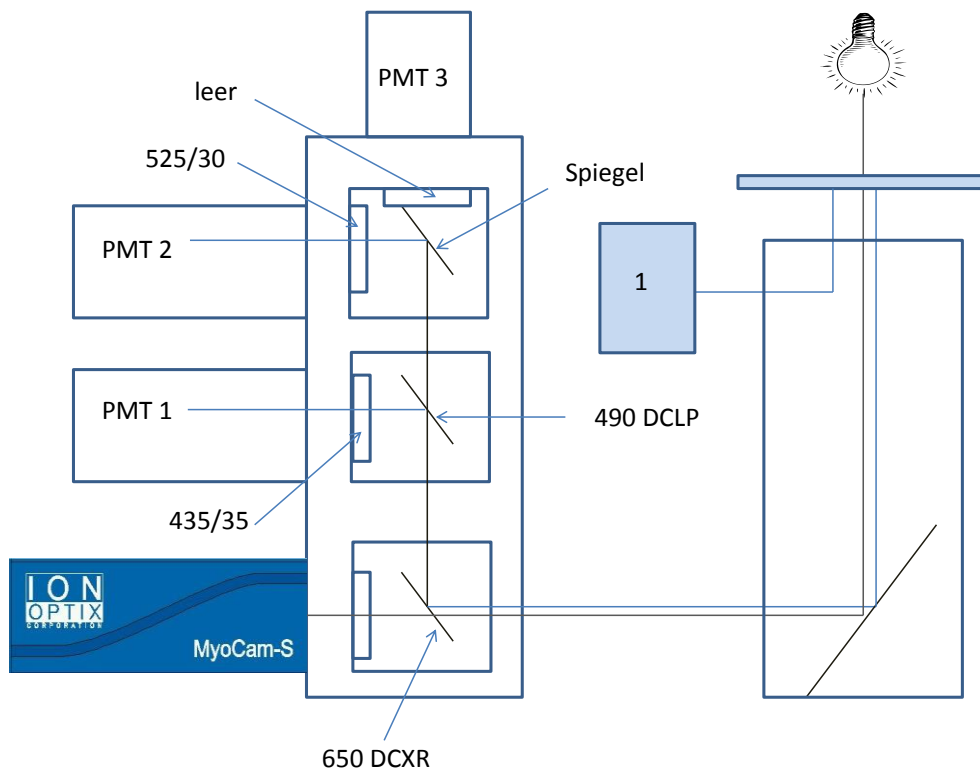


Abbildung 8: PMT-Einstellungen zur Messung der Fluoreszenzen von NAD(P)H/FAD und DCF

1) Xenon Arc Lamp inklusive Filterrad

- Blaue Linie = Anregungslicht & Emissionslicht der Farbstoffe
- Schwarze Linie = Durchlicht
- Die Zahlen neben der Anlage beziehen sich auf die zu verwendenden Spiegel. (Näheres dazu s. Tabelle 13)

Einstellungen der Photomultipliertubes (PMT) II

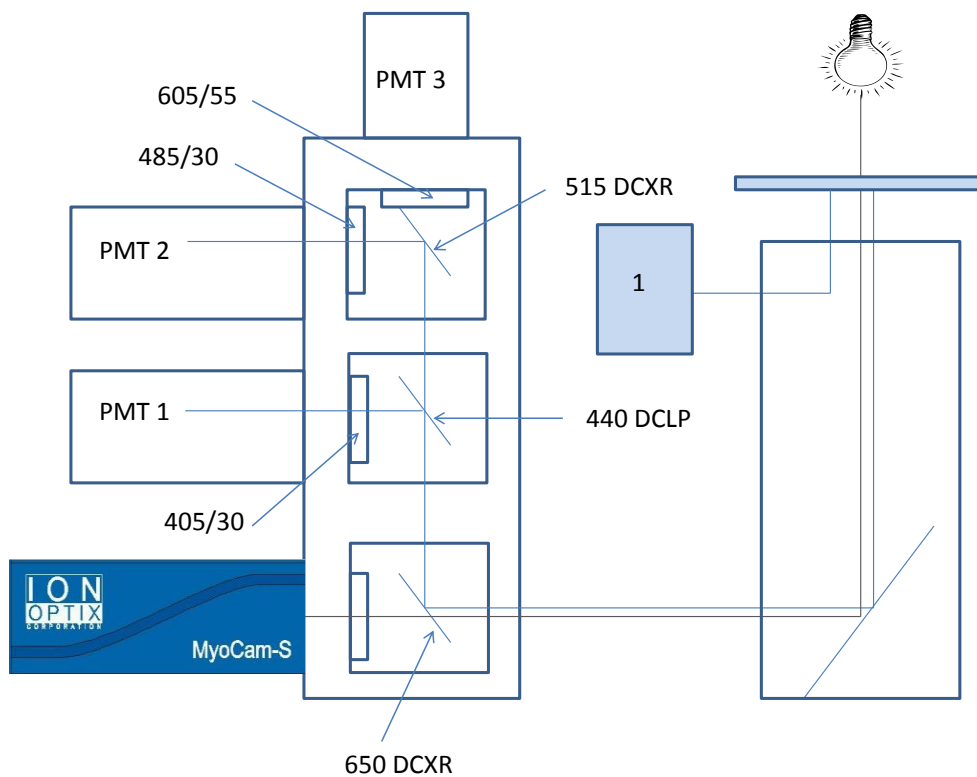


Abbildung 9: PMT-Einstellungen zur Messung der Fluoreszenzen von mitoSOX

1) Xenon Arc Lamp inklusive Filterrad

- Blaue Linie = Anregungslicht & Emissionslicht der Farbstoffe
- Schwarze Linie = Durchlicht
- Die Zahlen neben der Anlage beziehen sich auf die zu verwendenden Spiegel. (Näheres dazu s. Tabelle 13)

Schematische Darstellung der Zulaufanlage

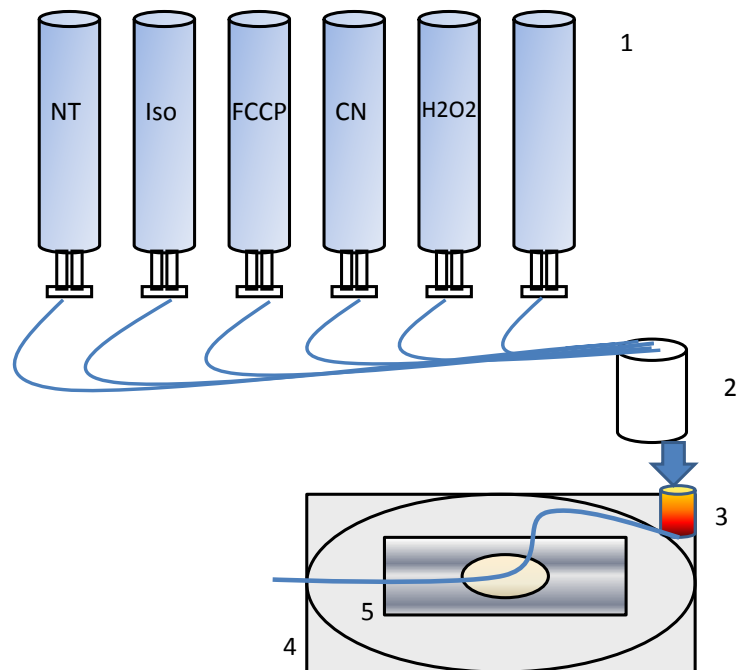


Abbildung 10: Schematische Darstellung der zuleitenden Gefäße und der Messkammer

- 1) Zuführende Gefäße
- 2) Mischkammer
- 3) Heizung
- 4) Messkammer
- 5) Deckgläschen mit Myozyten

Messprotokoll

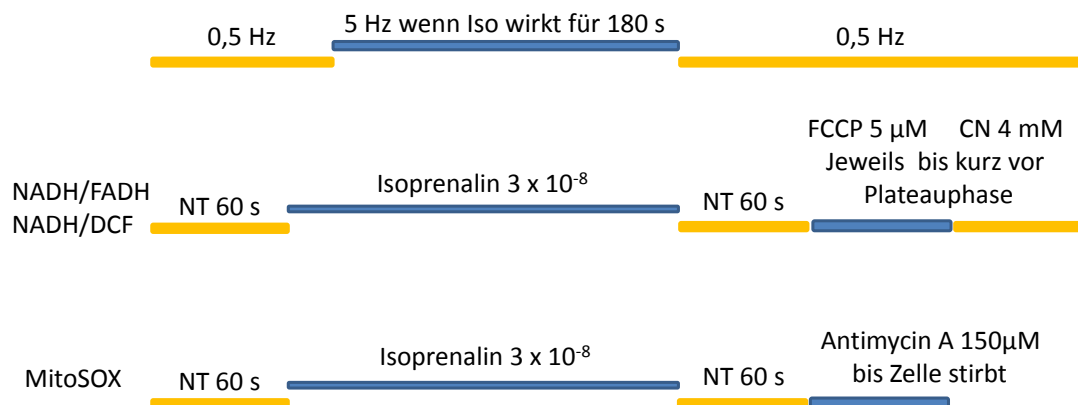


Abbildung 11: Messprotokoll

3.2.1.4 Fluoreszenzfarbstoffe

In den Experimenten wurden zum einen die Autofluoreszenzen von NADH, NADPH und FAD und zum anderen die mitochondriale Superoxidproduktion mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes MitoSOX und die mitochondriale H_2O_2 -Produktion mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes DCF gemessen.

3.2.1.4.1 NAD(P)H/FAD-Autofluoreszenzmessung

NADH fungiert als primäre Elektronenquelle der Atmungskette, da es an Komplex I seine Elektronen abgibt. Um relative Veränderung von NADH im Verlauf des Versuchsprotokolls aufzeichnen zu können, wurde die Autofluoreszenz desselbigen genutzt. An Hand dessen konnte man einen guten Eindruck von der metabolischen Regulation der Kardiomyozyten und ihrem mitochondrialen NADH-Haushalt gewinnen, ohne in ihr System einzugreifen.

NADH absorbiert bei einer Wellenlänge von $\lambda = 340$ nm ultraviolettes Licht und emittiert bei einer Wellenlänge von $\lambda = 450$ nm eine blaue Fluoreszenz. Im Gegensatz dazu ist die Absorption beziehungsweise Fluoreszenz von

NAD bei diesen Wellenlängen deutlich geringer. Um Aufschluss über den NAD(P)H-Haushalt der Mitochondrien zu erlangen, wurde durch die Kalibrierung mit FCCP und CN am Ende einer jeden Messung nur der mitochondriale Anteil des NAD(P)H und nicht der ebenfalls mitbestimmte zytosolische Anteil quantifiziert.

FADH₂ ist Elektronendonator am Komplex II der Atmungskette. Die Autofluoreszenz der oxidierten Form von FADH₂, FAD, kann bei 485 nm angeregt werden, und seine Emission ist bei 525 nm maximal. Da NADH und FAD wichtige Koenzyme einer Großzahl von Enzymen der Atmungskette sind und ihre Fluoreszenzen sich genau entgegengesetzt verhalten, stellt das Verhältnis ihrer Fluoreszenzintensitäten einen direkt messbaren Indikator für den Redox-Status der Zelle beziehungsweise des Mitochondriums dar. Als sehr sensibler Parameter zeigt er zum Beispiel eine erhöhte metabolische Aktivität der Zelle, sprich einen erhöhten Verbrauch an Redoxäquivalenten, als Verschiebung des Verhältnisses zu Gunsten von FAD an. Zur Kalibrierung benötigte man stabile Werte in Form von Plateaus sowohl von NADH, als auch von FAD bei ihrem Minimal- und Maximalwert. Diese wurden zum einen durch die vollständige Oxidation (0% NADH; 100% FAD) unter Zugabe von FCCP, als Entkoppler der Atmungskette, und zum anderen durch die vollständige Reduktion (100% NADH; 0% FAD⁺) unter Zugabe von Cyanid, als Hemmstoff des Komplexes IV der Atmungskette, erreicht.

3.2.1.4.2 Messung der Fluoreszenz von MitoSOX

Der Farbstoff MitoSOX reichert sich selektiv in den Mitochondrien an und zeigt, sobald sich Superoxidradikale (O_2^-) bilden, eine rote Fluoreszenz in einem Wellenlängenbereich von $\lambda = 380 \text{ nm}$ (Absorptionsmaximum) und $\lambda = 580 \text{ nm}$ (Emissionsmaximum). Er ist also ein verlässlicher Indikator für die mitochondriale Superoxidradikalproduktion, wobei die Atmungskette den Hauptteil an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) liefert. Ungefähr 1-3% des von den Mitochondrien an der Atmungskette verbrauchten Sauerstoffs wird nur unzureichend reduziert.⁹⁹ Diese reaktionsfreudigen Elektronen können

schnell mit molekularem Sauerstoff zu Superoxidanionen reagieren, welche die dominierende ROS-Spezies in Mitochondrien darstellen.⁹⁹

Die Färbung der isolierten Kardiomyozyten lief folgendermaßen ab:

- 1 ml der Zellsuspension in ein Eppendorfgefäß überführen
- 5 Minuten Sedimentation
- Überstand verwerfen und Pellet mit 1 ml der Normal Tyrode auffüllen
- 1 µl MitoSOX zu den Zellen geben
- 30 Minuten Inkubation in horizontaler Lage im Wärmeschrank
- 5 Minuten Sedimentation
- Überstand verwerfen und Pellet mit 1 ml der Normal Tyrode auffüllen

Die Lagerung bis zur Verwendung der Zellen erfolgte im Dunkeln.

Antimycin A wurde am Ende einer jeden Messung mit Hilfe einer Eppendorff-Pipette direkt auf den Objektträger gegeben. Es fungierte als Positivkontrolle, da es an den Komplex III der Atmungskette bindet und damit die Übertragung von Elektronen auf das mobile Substrat Cytochrom C, welches die Elektronen im Normalfall weiter auf den Komplex IV übertragen würde, hemmt. Somit bleiben alle Komponenten der Atmungskette vor dem Wirkungsort von Antimycin A reduziert und alle Komponenten dahinter oxidiert. Dadurch wird sowohl der Verbrauch von Sauerstoff an Komplex IV der Atmungskette als auch die Synthese von ATP gehemmt, wodurch es bei Zugabe von Antimycin A zu einer vermehrten $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion an der Atmungskette kommt, die von MitoSox registriert wird und als Positivkontrolle dient.

3.2.1.4.3 Messung der Fluoreszenz von DCF

Der membrangängige und nicht fluoreszierende Farbstoff Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat (H_2DCFDA) wird dazu benutzt, um die Entstehung von ROS anzuzeigen, da er durch ROS irreversibel zu dem nicht

mehr membrangängigen und stark fluoreszierenden Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert wird. Detektiert wird vornehmlich H_2O_2 , jedoch nicht spezifisch, da DCF auch in Anwesenheit von $\cdot\text{O}_2^-$ beziehungsweise ONOO^- gebildet wird. H_2O_2 entsteht in den Mitochondrien mit Hilfe der Superoxiddismutase (Mn-SOD), welche die bereits unter physiologischen Bedingungen während der mitochondrialen Atmung an den Komplexen I und III anfallenden Superoxidanionen dismutiert.⁶⁹ Zusätzlich agiert DCF als Photosensibilisator, indem er das erzeugte Licht absorbiert und die somit aufgenommene Energie auf H_2DCFDA überträgt, was zur erneuten Bildung von DCF und somit Intensivierung der Strahlung führt.⁹⁹

Die Färbung der isolierten Kardiomyozyten lief folgendermaßen ab:

- 1,5 ml der Zellsuspension in ein Eppendorfgefäß überführen
- 5 Minuten Sedimentation
- Überstand verwerfen und Pellet mit 1 ml der Normal Tyrode auffüllen
- 3,5 μl DCF zu den Zellen geben
- 15 Minuten Inkubation in horizontaler Lage im Wärmeschrank
- 5 Minuten Sedimentation im Wärmeschrank
- Überstand verwerfen und Pellet mit 1 ml der Normal Tyrode auffüllen

Die Lagerung bis zur Verwendung der Zellen erfolgte im Dunkeln.

Am Ende einer jeden Messung erfolgte die Zugabe von H_2O_2 , worunter man einen enormen Anstieg des DCF-Signals als Positivkontrolle für die Beladung der Kardiomyozyten beobachten konnte.

3.2.1.5 Auswertung der Messergebnisse

Zur graphischen und statistischen Auswertung wurden die Programme Windows Excel und GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.) verwendet. Zu Beginn erfolgte die Übertragung der generierten Daten aus IonWizard in Windows Excel. Im Falle der Fluoreszenzen wurden alle Messwerte mit

einbezogen. Bei den Zellverkürzungsmessungen flossen lediglich Messwerte zu den vier folgenden Zeitpunkten ein:

- Nach ungefähr 60 Sekunden bei einer Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz
- Unmittelbar vor dem Anheben der Stimulationsfrequenz auf 5 Hz
- Ungefähr 160 Sekunden nach der Frequenzerhöhung auf 5 Hz
- Ungefähr 30 Sekunden nach dem Senken der Stimulationsfrequenz auf 0,5 Hz

Zu jedem dieser Zeitpunkte wertete man sieben bis zehn Verkürzungsamplituden aus, beziehungsweise lediglich drei zum Zeitpunkt unmittelbar vor dem Anheben der Stimulationsfrequenz auf 5 Hz, um deren Mittelwert zu bilden und diesen dann zum Vergleich zwischen transgenen und Wildtyp-Mäusen heranzuziehen. Analysiert wurden dabei einerseits die systolische und die diastolische Zelllänge sowie die sich daraus ergebende Verkürzungsfraction und andererseits die kinetischen Parameter Time-to-Peak und Relaxation-Time.

Die statistische Auswertung erfolgte durch eine two-way ANOVA-Analyse mit Bonferroni posttest beziehungsweise bei den Messungen an isolierten Mitochondrien mit Hilfe eines ungepaarten t-Tests. Als statistisch signifikant wurden Unterschiede erachtet, die bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ lagen. Dargestellt wurden die Ergebnisse als arithmetischer Mittelwert mit dazugehörigem Standardfehler SEM (standard error of the mean).

3.2.2 Methoden zur Messung an Mitochondrien

3.2.2.1 Mitochondrienisolation

Sämtliche Materialien, die für die Isolation benötigt wurden, sollten vorgekühlt beziehungsweise auf Eis gelegt werden. Ebenso sollte die Zentrifuge auf 4 °C eingestellt werden.

Die Maus wurde zunächst mit Rompun/Ketavet betäubt. Die Entnahmeprozedur des Herzens ähnelte der in Kapitel 3.2.1.1 beschriebenen. Anschließend konnte das Herz in einer kleinen, mit Isolationslösung (s. Tabelle 15) befüllten Zellkulturschale freipräpariert werden, bevor die Ventrikel vom Rest getrennt wurden. Daraufhin wurden diese geschwenkt, um das restliche Blut zu entfernen. Die nun sauberen Ventrikel wurden in ein Reaktionsgefäß mit BSA/Proteinase Lösung überführt und klein geschnitten. Im Anschluss wurde für sieben Minuten homogenisiert, bevor weitere BSA/Proteinase-Lösung (500 µl) hinzugefügt wurde. Es folgte eine weitere Homogenisierung für sieben Minuten. Die Suspension wurde nun in ein frisches Reaktionsgefäß gegeben, woraufhin sich folgende Zentrifugationsschritte anschlossen:

- 5 Minuten bei 400 g zentrifugieren
- das Pellet verwerfen und den Überstand, der den Mitochondrien entsprach, in ein neues Reaktionsgefäß überführen
- 10 Minuten bei 7700 g zentrifugieren und den Überstand, der nun dem Cytosol entsprach, in ein neues Reaktionsgefäß geben und auf Eis lagern
- das Pellet in 400 µl Mitochondrien-Suspensionslösung (s. Tabelle 16) resuspendieren und anschließend auf 1 ml Mitochondrien-Suspensionslösung auffüllen
- 5 Minuten bei 7700 g zentrifugieren
- Überstand verwerfen und das Pellet in gleicher Weise resuspendieren und auf 1 ml Mitochondrien-Suspensionslösung auffüllen

- 5 Minuten bei 7700 g zentrifugieren, Überstand verwerfen und das Pellet in 100 µl Mitochondrien-Suspensionslösung resuspendieren

Die Mitochondrien standen nun zur weiteren Verwendung zur Verfügung.

3.2.2.2 Atmungsmessung

Die Messungen dienten der Ermittlung des Sauerstoffverbrauchs der Mitochondrien und fanden an der mit dem Computer verbundenen Clark-Elektrode, statt. Die Messdaten wurden durch das Messprogramm "Oxygraph Plus" aufgezeichnet. Zu den Vorbereitungen zählten neben dem Erwärmen des Wasserbades auf 37 Grad Celsius, die Kalibrierung der Elektrode mit Atmungspuffer und Natrium-Ditionit. Dazu wurde der Anfangswert unter Zugabe von Atmungspuffer in Abhängigkeit von einer Temperatur von 37 °C und einem Umgebungsdruck von 1 hPa ermittelt. Zusätzlich wurde der 0%-Prozent-Wert bestimmt, indem Natrium-Ditionit hinzugegeben wurde, welches den gesamten Sauerstoff bindet.

Daraufhin konnte mit den eigentlichen Messungen begonnen werden, wobei die Messkammer vor jedem Experiment mindestens zehn Mal mit H₂O gespült werden sollte.

Das Volumen des zu messenden Gemischs betrug zwei Milliliter und setzte sich aus Atmungspuffer und Mitochondrien zusammen. Der Proteingehalt desgleichen musste immer 400 µg betragen. Dies bedeutete, dass die Proteinkonzentration der eingesetzten Mitochondrien, die zuvor nach Lowry et al. (s. Kapitel 3.2.2.3) bestimmt wurde, entscheidend war, da sich aus ihr das benötigte Volumen an Mitochondrien ergab. Es wurde nun also zuerst die zuvor berechnete Menge an Atmungspuffer in die Messkammer gegeben, der Magnetrührer aktiviert und auf ein stabiles Signal gewartet. Sobald dies der Fall war, konnten die Mitochondrien mit einer Pipettenspitze dazugegeben und der Deckel zur Messkammer verschlossen werden. Über eine Hamilton-Spritze konnten nun nacheinander verschiedene Substrate hinzugegeben werden, wobei darauf zu achten war, dass dieser Schritt erst erfolgen konnte, wenn sich das Signal jeweils auf ein stabiles Niveau eingependelt hatte. Jede neue Zugabe wurde hierbei im Versuchsverlauf

markiert. Nach Abschluss der Experimente wurde die Kammer mit KCl-Lösung (1 mM) befüllt.

3.2.2.3 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde modifiziert nach Lowry et al. durchgeführt. Dazu wurden 2 µl des Mitochondrienlysats mit 18 µl destilliertem Wasser versetzt. Unter Zugabe von 100 µl Reagenz A bildete sich ein blau-violetter Biuret-Komplex, die Bildung von Molybdänblau wurde durch die Zugabe von 800 µl Reagenz B induziert. Nachdem die Lösung im Vortex gemischt wurde, folgte die Inkubation bei Raumtemperatur für 15 Minuten. Anschließend wurde die Extinktion der Probe bei 750 nm gegen einen Leerwert gemessen und an Hand dessen die Proteinkonzentration mit Hilfe einer Standardkurve berechnet. Diese Kurve ergab sich durch die Messung von definierten BSA (Bovines Serum Albumin)-Konzentrationen. Die Konzentration jeder Probe wurde dreifach bestimmt, der zugehörige Mittelwert wurde als definitive Proteinkonzentration verwendet.

3.2.2.4 NAD(P)H-Messung

Das Experiment diente dazu, den mitochondrialen NADPH-Pool mit Hilfe eines Fluoreszenz-Platten-Readers und 96-Well UV-Platten zu bestimmen, wobei es vor allem darum ging, den NADPH-Gehalt während der Zugabe verschiedener ADP-Konzentrationen zu untersuchen. Die Messungen fanden bei 37 °C und in Atmungspuffer statt. Jede Minute erfolgte eine Dreifachbestimmung der Fluoreszenzintensität von NADPH, mit nachfolgender Berechnung des Mittelwertes. Da die Messung unter vier verschiedenen ADP-Konzentrationen stattfand, wurden acht Well (Vertiefung in den Platten), das heißt pro ADP-Bedingung jeweils ein Well mit Taz-KD Mitochondrien und eines mit WT Mitochondrien vorbereitet. Zunächst erfolgte die Detektion des basalen NADPH-Pools, indem sich pro Well lediglich 80 µg Mitochondrien, zusätzlich zum Atmungspuffer, befanden. Nach vier Minuten wurden 10 µl der Pyruvat/Malat-Lösung und nach weiteren sechs Minuten 10 µl der jeweiligen ADP-Konzentration hinzugeben (s. Tabelle 22). Es folgte

eine dreiminütige Messung, an die sich die Schritte zur Kalibrierung anschlossen. Dafür wurde zunächst der Maximalwert durch die Zugabe von 10 µl Cyanid, als Hemmstoff des Komplexes IV der Atmungskette, bestimmt. Woraufhin nach dreiminütiger Messung die Ermittlung des Minimalwertes, durch Zugabe des Entkopplers Dinitrophenol (10 µl) folgte. Die Messergebnisse wurden jeweils als prozentualer Wert des Maximalwertes, nach Abzug der minimalen Fluoreszenzrate angegeben.

3.2.2.5 Paramagnetische Elektronenresonanzspektroskopie

Die Resonanzmessung diente der Detektion von Superoxidradikalen und wurde mit Hilfe eines Spektrometers durchgeführt. Zu Beginn wurden die Mitochondrien für drei Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden sie, je nach zu messender Bedingung, mit verschiedenen Substanzen (s. Pipettierschema, 3.2.2.5.1) versetzt, wobei die Zugabe von CMH bei jeder Messung den Schluss markierte. CMH (1-Hydroxy-3-Methoxycarbonyl-2,2,5,5-Tetramethylpyrrolidine) diente als Radikalfänger, sodass das entstandene CM- Radikal Rückschlüsse auf die produzierte Menge an $\cdot\text{O}_2^-$ Radikalen lieferte.

Das gesamte Probenmaterial wurde nun vor Messbeginn in eine Glaskapillare eingesaugt. Diese wurde mit Silikonpaste abgedichtet, bevor sie in den zum Spektrometer gehörenden und auf 37 °C erwärmten Glaskapillarenhalter gesetzt wurde. Daraufhin wurde das Messprotokoll aktiviert, was bedeutete dass sich das Gemisch für 8 Minuten in einem Magnetfeld der Stärke 0,1 mT befand und mit einem Mikrowellenfeld von 20 mW bestrahlt wurde. Die Messdaten wurden von der Software Medeia aufgezeichnet. Es wurde dabei sowohl der Verlauf als auch die tatsächliche Menge der Superoxidradikalproduktion betrachtet. Dies wurde durch die Messung einer Referenzprobe bekannter Radikalkonzentration ermöglicht.

3.2.2.5.1 Pippetierschema

Bedingung	Pyruvat/Malat	Mitochondrien	CMH	Weitere Substanzen
Pyruvat/Malat	10 µl	20 µl	10 µl	10 µl Atmungspuffer
ADP	10 µl	20 µl	10 µl	10 ml ADP
ADP/ DNP	10 µl	20 µl	10 µl	10 µl ADP/DNP
ADP/Antimycin A	10 µl	20 µl	10 µl	10 µl ADP/ Antimycin A

3.2.2.6 Amplex Red Messung

Die Messungen am Fluoreszenz- Platten- Reader dienen der Ermittlung der H_2O_2 -Emission der Mitochondrien. Diese wurde mit Hilfe des H_2O_2 -sensitiven und spezifisch fluoreszierenden Farbstoffes Amplex®UltraRed (AUR) sichtbar gemacht. Dafür reagierte AUR mit H_2O_2 zu dem Endprodukt Resorfin in einem Verhältnis von 1:1, wobei Horseradish Peroxidase (HRP) diese Reaktion katalysierte. Durch die Extinktionsmessungen des Resorfins (Anregung: 535 nm, Emission: 590 nm) konnten Rückschlüsse auf die Produktion von H_2O_2 gezogen werden. Die Messungen selbst erfolgten entweder an den Mitochondrien alleine oder aber nach Zugabe von Pyruvat/ Malat (P/M), ADP, DNP als ein Entkoppler der Atmungskette oder Antimycin A. Zur Versuchsdurchführung wurden 96-Well Platten benutzt, wobei pro Well 30 µg Mitochondrien verwendet wurden. Die Messungen wurden allesamt bei 37 °C und unter Verwendung von Atmungspuffer durchgeführt. Die Messdauer betrug zwei Stunden. Währenddessen fand alle zwei Minuten eine Dreifachbestimmung der Werte statt. Die Daten wurden über das Programm Tecan GENios Pro Reader abgegriffen.

3.2.2.6.1 Pipettierschema für die jeweiligen Messungen (in μl)

	Mito	P/M	ADP [30 μM]	ADP [100 μM]	ADP [300 μM]	ADP [1mM]	DNP	Antimycin A
Atmungs- puffer	20	20	10	10	10	10	0	0
Mitochon- drien (Mito)	10	10	10	10	10	10	10	10
AUR	170	170	170	170	170	170	170	170
ADP	0	0	10	10	10	10	0	0
DNP	0	0	0	0	0	0	10	0
Antimycin A	0	0	0	0	0	0	0	10

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss der Tafazzin-Defizienz auf die Funktion von isolierten Mitochondrien

4.1.1 Atmungsmessung

Die Auswirkungen der Tafazzin-Defizienz auf den Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien wurden mit Hilfe der Clark-Elektrode nach oben beschriebenem Versuchsablauf (s. 3.2.2.2) untersucht. Zunächst wurde die basale Atmung der Mitochondrien unter Zugabe der Komplex I Substrate Pyruvat und Malat bestimmt. Dies entspricht dem sog. „State 2“ der Atmungsmessung. Anschließend wurde die Atmungskette durch die Zugabe aufsteigender ADP-Konzentrationen („State 3“) stimuliert, was den Elektronenflux entlang der Atmungskette beschleunigt und somit O₂ am Komplex IV verbraucht. Die Zugabe von Oligomycin hemmt die ATP-Synthese und somit den Sauerstoffverbrauch. Dieses Stadium bezeichnen wir als „State 4“, was normalerweise die Atmung nach Verbrauch von ADP kennzeichnet. In diesen Experimenten wurde kein Unterschied in der Atmungsgeschwindigkeit zwischen kardialen Taz-KD und WT Mitochondrien im State 2, 3 oder 4 beobachtet (Abbildung 12A). In weiterführenden Experimenten der AG Maack konnte nach Erhöhung der Gesamtzahl der Experimente allerdings eine moderat verringerte Atmungskettenaktivität in Taz-KD Mitochondrien beobachtet werden.

Setzt man nun die Werte bei verschiedenen ADP Konzentrationen ins Verhältnis zu State 2 oder State 4, so ergibt sich der sog. respiratorische Quotient (Abbildung 12B). Dieser gibt Auskunft über die Qualität der Mitochondrienisolation als auch der Atmungskettenaktivität, da niedriger O₂-Verbrauch im State 2 bzw. State 4 eine Intaktheit der inneren Mitochondrienmembran bedeutet. Auch hinsichtlich des respiratorischen Quotienten konnte kein Unterschied zwischen WT und Taz-KD Mitochondrien beobachtet werden.

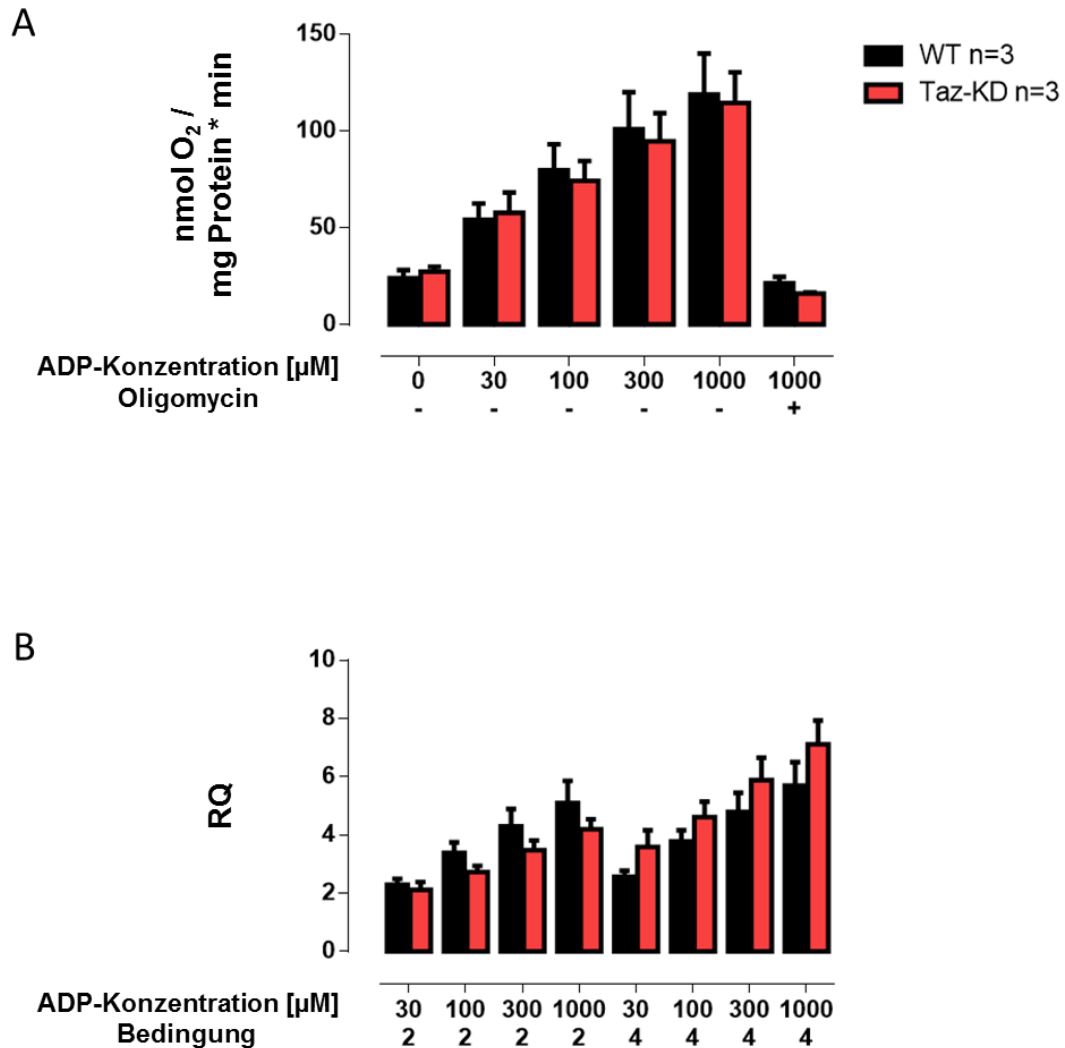


Abbildung 12: Atmungsmessung an isolierten Mitochondrien von WT (n=3) und Taz-KD (n=3) Kardiomyozyten.

A, Verbrauch an Sauerstoff während der verschiedenen vorherrschenden Versuchsbedingungen. Alle Versuche wurden in der Gegenwart einer Pyruvat/Malat-Lösung (500 mM) durchgeführt. Die jeweiligen ADP-Konzentrationen und ob eine Zugabe von Oligomycin (1,2 µM) erfolgte sind an der X-Achse abzulesen. B, Respiratorischer Quotient (RQ), bei dem die verschiedenen ADP-Bedingungen, die sich an Hand der Konzentrationen unterscheiden, zum einen ins Verhältnis gesetzt werden zu State 2 (Pyruvat- und Malat-Zugabe) und zum anderen ins Verhältnis gesetzt werden zu State 4 (Oligomycin-Zugabe). Indikator für die Qualität der Abläufe innerhalb der Atmungskette. Dargestellt sind die Mittelwerte mit zugehörigem SEM.

4.1.2 NADPH-Messung

Der Einfluss der Tafazzin-Defizienz auf den Redoxstatus des NAD(P)H-Pools, vor allem während der Stimulation der Atmungskette mittels ADP, wurde mit Hilfe eines Fluoreszenz-Platten-Readers untersucht. Die Ergebnisse wurden als absolute Werte der NAD(P)H Autofluoreszenz angegeben. Der NAD(P)H Redoxstatus, gemessen vor jeglicher Substratzugabe, war in kardialen Taz-KD im Vergleich zu WT Mitochondrien leicht oxidiert (Abbildung 13, $p < 0,05$).

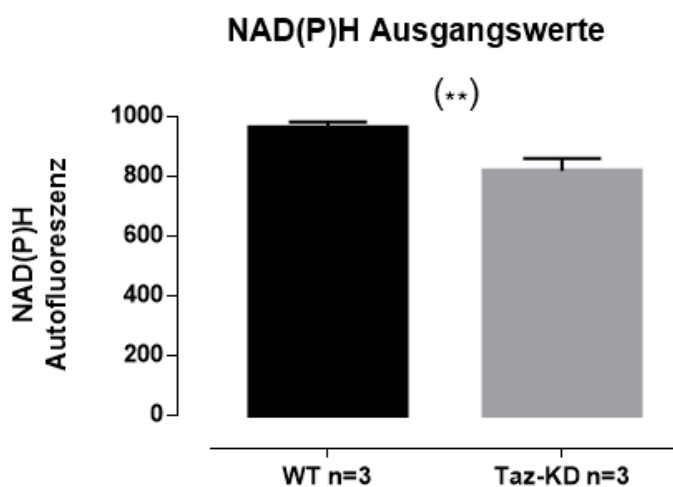


Abbildung 13: NADPH-Autofluoreszenz vor Substratzugabe in isolierten Mitochondrien von WT (n=3) und Taz-KD (n=3) Kardiomyozyten.

Angabe der absoluten Messergebnisse. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte mit zugehörigem SEM. ** = $p < 0,05$ im ungepaarten T-Test.

Abbildung 14 zeigt die Autofluoreszenz von NADPH im Experimentverlauf unter der jeweiligen ADP-Konzentration. Durch die Zugabe von Substrat (Pyruvat/Malat) bildet der Citratzyklus NADH und NADPH, was zur Zunahme der NAD(P)H Autofluoreszenz führt. In der Abwesenheit von ADP ist der Redoxstatus so reduziert, da kaum Elektronen an die Atmungskette abgegeben werden. Erst nach Zugabe von ADP in unterschiedlichen Konzentrationen (0,03 mM – 1 mM) kommt es zu einer konzentrationsabhängigen Oxidation des NAD(P)H Redoxstatus, der sich allerdings zwischen den Genotypen nicht unterschied. Durch die Zugabe von

Cyanid als Hemmstoff des Komplex IV der Atmungskette wird der NAD(P)H-Pool wieder regeneriert, wobei die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Regeneration keine signifikanten Unterschiede zwischen den Taz-defizienten und WT Mitochondrien aufwiesen. Schließlich erfolgt die Zugabe von Dinitrophenol, einem Entkoppler der Atmungskette. Durch den Zusammenbruch des Protonengradienten kommt es zu einer schnellen Oxidation des NADPH-Redoxstatus der Mitochondrien. Signifikante Unterschiede haben sich im Experimentverlauf bei keiner ADP-Konzentration ergeben.

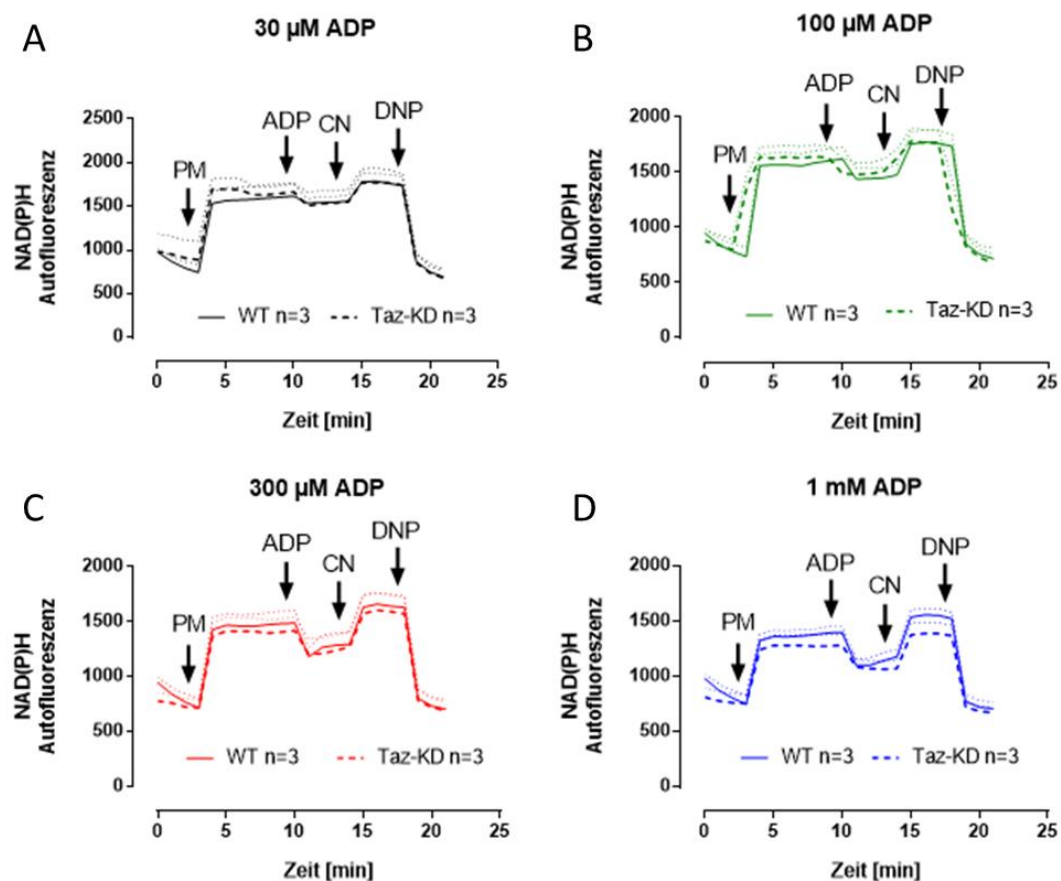


Abbildung 14: NADPH-Autofluoreszenz in isolierten Mitochondrien von WT (n=3) und Taz-KD (n=3) Kardiomyozyten unter verschiedenen ADP-Konzentrationen.

A-D, Angabe der absoluten Messergebnisse. Die Pfeile markieren die Zugabe der jeweiligen Substanz (PM = Pyruvat/Malat, ADP = Adenosindiphosphat, CN = Cyanid, DNP = Dinitrophenol). Konzentration Pyruvat/Malat: 5 mM; Konzentration ADP: 30 μ M (A), 100 μ M (B), 300 μ M (C), 1 mM (D); Konzentration Dinitrophenol: 250 μ M; Konzentration Cyanid: 2,5 mM. Dargestellt sind die Mittelwerte mit zugehörigem SEM.

4.1.3 Superoxidproduktion

Um die Auswirkung der Tafazzin-Defizienz auf die Superoxidproduktion von isolierten Mitochondrien zu untersuchen, wurden Experimente mit Elektronen Spin Resonanz (ESR) durchgeführt. Durch das vorhergehende Messen einer Referenzprobe bekannter Radikalkonzentrationen konnte hierbei die Menge an produziertem $\cdot\text{O}_2^-$ für jede Bedingung quantifiziert werden (Abbildung 15). Beide Gruppen produzieren unter basalen Versuchsbedingungen, wenn lediglich Pyruvat und Malat als Substrat vorliegen, eine ähnliche Menge an Superoxidradikalen. Unter Einfluss von ADP, vor allem in höherer Konzentration (1 mM), sinkt die Superoxidproduktion sowohl der Taz-KD als auch der WT Mitochondrien auf ungefähr die Hälfte ab. Durch die Zugabe von Dinitrophenol als Entkoppler der Atmungskette oder Antimycin A, als Hemmstoff des Komplexes III der Atmungskette, steigt die Produktion in beiden Gruppen auf ungefähr dasselbe Maß an.

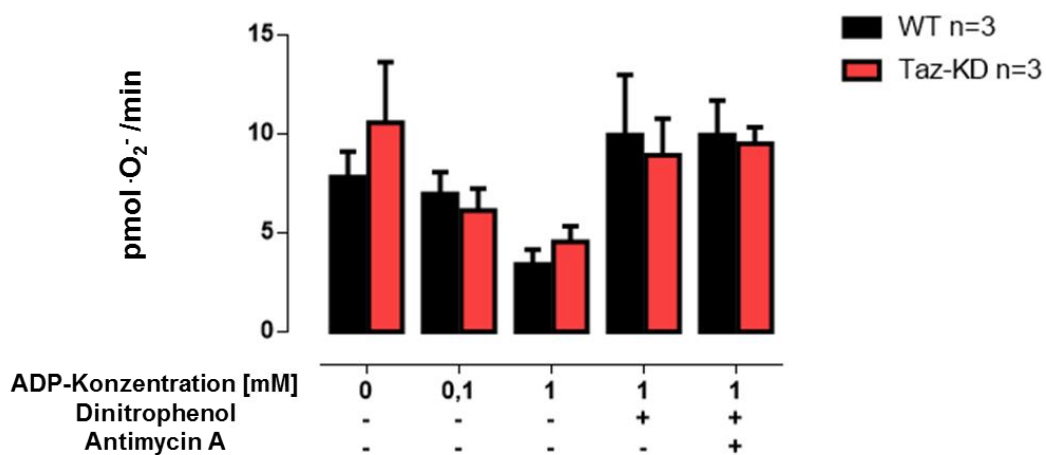


Abbildung 15: Superoxidproduktion isolierter Mitochondrien von WT (n=3) und Taz-KD (n=3) Kardiomyozyten.

Alle Versuche wurden in Gegenwart einer Pyruvat/Malat-Lösung (25 mM) durchgeführt. Die übrigen vorherrschenden Versuchsbedingungen sind dem Schema der x-Achse zu entnehmen (jeweils gekennzeichnet mit + und – bzw. jeweiliger ADP-Konzentration). Konzentration Dinitrophenol: 0,5 mM; Konzentration Antimycin A: 15 μM . Dargestellt sind die Mittelwerte mit zugehörigem SEM.

4.1.4 H₂O₂-Produktion

Die Detektion der H₂O₂-Produktion mittels AmplexRed-Messung ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Taz-KD und WT Mitochondrien (Abbildung 16). Die basale Rate liegt bei beiden Gruppen zwischen 2 bis 2,5 pmol H₂O₂/(mg*min). Nach der Zugabe von Pyruvat und Malat erfolgt ein deutlicher Anstieg der mitochondrialen H₂O₂-Produktion, sowohl bei den Taz-KD als auch WT Mitochondrien. Während der Stimulation der Mitochondrien mit verschiedenen ADP-Konzentrationen sinkt die Rate an produziertem H₂O₂ leicht ab, jedoch ohne Unterschiede zwischen Taz-KD und WT Mitochondrien. Nach der Zugabe des Entkopplers Dinitrophenol zeigen beide Gruppen eine vergleichbare Erzeugung von H₂O₂. Die Positivkontrolle mittels Antimycin A, die über eine vermehrte Bildung von Superoxid am Komplex III eine deutliche Zunahme der H₂O₂ Emission bewirkt, liefert ebenfalls keine Unterschiede zwischen WT und Taz-KD Mitochondrien.

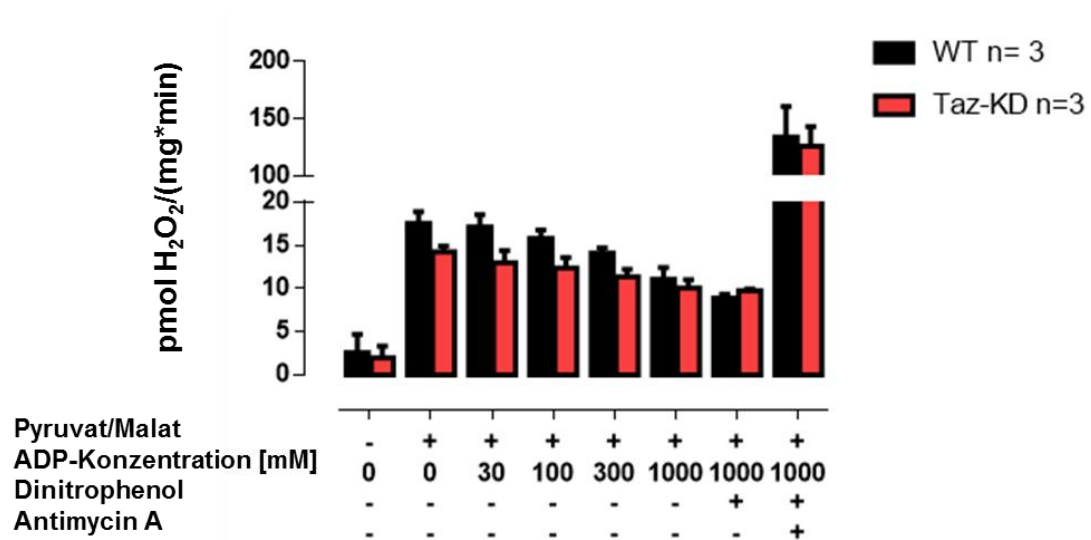


Abbildung 16: H₂O₂-Produktion in isolierten Mitochondrien von WT (n=3) und Taz-KD (n=3) Kardiomyozyten.

H₂O₂-Produktion im Verlauf des Experimentes. Vorherrschende Versuchsbedingungen sind dem Schema der x-Achse zu entnehmen. Konzentration Pyruvat/Malat: 5 mM; Konzentration Dinitrophenol: 5 mM; Konzentration Antimycin A: 15 µM. Dargestellt sind die Mittelwerte mit zugehörigem SEM.

4.2 Einfluss der Tafazzin-Defizienz auf die Funktion von isolierten Herzmuskelzellen

4.2.1 Kontraktion

Der Einfluss des Tafazzin-Knockdown auf die Verkürzungsfunktion der Kardiomyozyten wurde mit dem ION-Optix Mikroskop System anhand des zuvor beschriebenen Messprotokolls (s. Abbildung 11) untersucht. Die Zellverkürzung der Myozyten von Taz-KD und WT Mäusen wurde an vier unterschiedlichen Zeitpunkten miteinander verglichen. Die Abbildung 17 zeigt ein exemplarisches Messfenster, in dem jeweils die vier Messpunkte, benannt mit I, II, III, IV, gekennzeichnet sind, die in unsere Auswertung mit eingeflossen sind. Zeitpunkt I beschreibt dabei den Zeitpunkt ca. 60 Sekunden nach Beginn der Messungen, zu dem sich die Kardiomyozyten äquilibriert hatten. Nach dem Einspülen von Isoprenalin, wenn der β -Adrenozeptoragonist seine Wirkung entfaltet, erfolgte die Detektion von Messpunkt II. Messwert III stellt den Zeitpunkt 160 Sekunden nach Erhöhen der Stimulationsfrequenz auf 5 Hz unter fortlaufender Isoprenalin Exposition dar. In der Erholungsphase, in der die Stimulationsfrequenz wieder auf 0,5 Hz gesenkt wurde und Isoprenalin aus der Zellkammer ausgewaschen wurde, wurde Messpunkt IV ermittelt. Zu jedem dieser Zeitpunkte wurde sowohl die systolische und diastolische Sarkomerlänge als auch die fraktionelle Sarkomerverkürzung, die Zeit bis zur maximalen Sarkomerverkürzung und die Zeit bis zur 50- beziehungsweise 90-prozentigen Sarkomerrelaxation bestimmt.

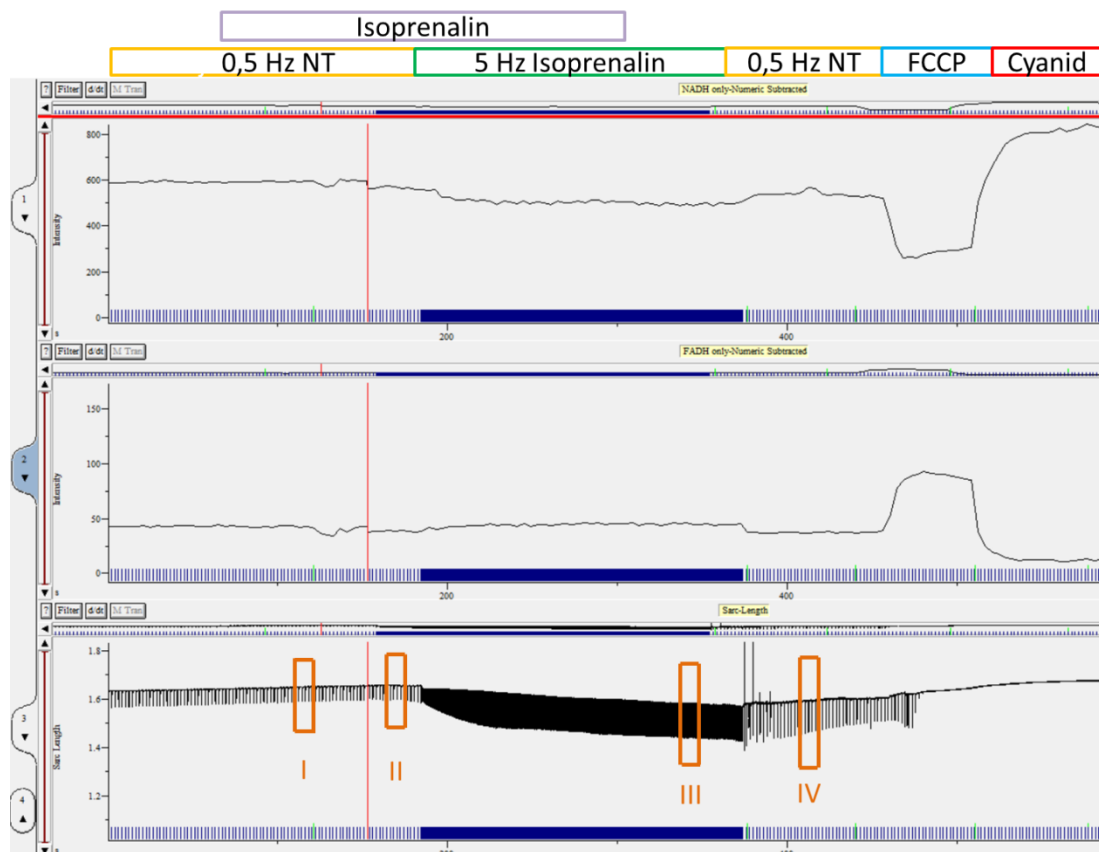


Abbildung 17: Repräsentative Aufzeichnung eines NAD(P)H/FAD- und Kontraktilitätsexperimentes.

I-IV: ausgewertete Zeitpunkte der Kontraktilitätsmessungen, zugeleitete Flüssigkeiten und Stimulationsfrequenz oben angegeben.

Abbildung 18 zeigt sowohl die systolische als auch die diastolische Sarkomerlänge im Verlauf des Experimentes. Signifikante Unterschiede können in Bezug auf die diastolische Sarkomerlänge beobachtet werden (two-way ANOVA $p < 0,001$). Vor allem unter erhöhter Arbeitslast und während der Erholungsphase verfügen die Kardiomyozyten der Tafazzin-defizienten Mäuse über eine deutlich geringere diastolische Länge. Auch die systolische Sarkomerlänge zeigt signifikante Unterschiede beider Gruppen (two-way ANOVA $p < 0,0001$), die sich hier jedoch vor allem unter basalen Bedingungen (0.5 Hz) und während des Wirkeintrittes von Isoprenalin bemerkbar machen ($p < 0,001$). Hierbei weisen die Kardiomyozyten der Taz-KD Mäuse die kürzere systolische Länge auf. Zu bedenken ist allerdings, dass die Kardiomyozyten der Taz-KD Mäuse, im Vergleich zu den WT

Mäusen, auch zu diesen Zeitpunkten bereits über eine verminderte diastolische Sarkomerlänge verfügen.

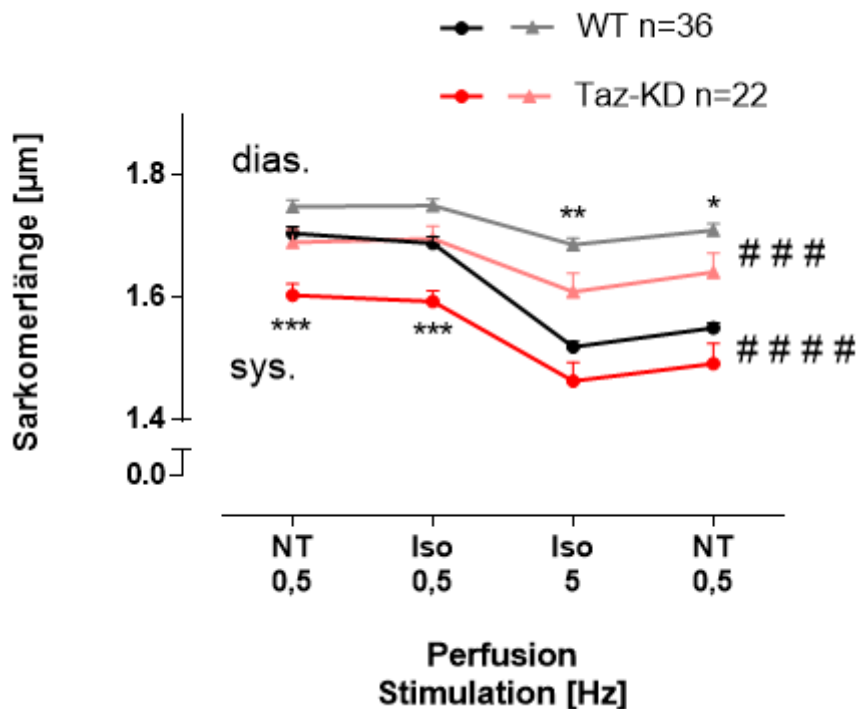


Abbildung 18: Diastolische und systolische Sarkomerlänge in WT (n=36) und Taz-KD (n=22) Kardiomyozyten.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit zugehörigem SEM zum jeweiligen Messzeitpunkt I-IV. ### = $p < 0,001$; #### = $p < 0,0001$ in der two-way ANOVA, * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ im Bonferroni Posttest.

Die Verkürzungsfraction (Abbildung 19), angegeben in % vom Ausgangswert in der Diastole, ist bei den Taz-KD Mäusen zu Beginn der Messungen ungefähr doppelt so groß im Vergleich zur Kontrollgruppe. Unter Erhöhung der Arbeitslast nimmt sie allerdings bei beiden Versuchstier-Gruppen auf das gleiche Niveau zu. Dies entspricht einer geringeren Zunahme der Verkürzungsfraction der Taz-KD Kardiomyozyten im Vergleich mit den WT Kardiomyozyten während physiologischem Stress.

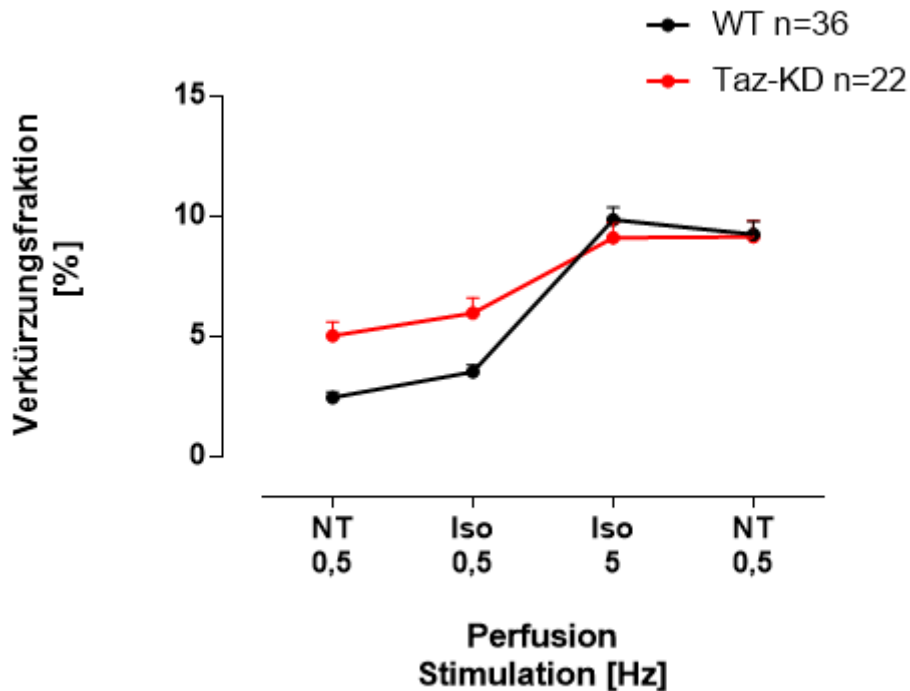


Abbildung 19: Fraktionelle Verkürzung in WT (n=36) und Taz-KD (n=22) Kardiomyozyten.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit zugehörigem SEM zum jeweiligen Messzeitpunkt I-IV.

Die Zeit zur maximalen Sarkomerverkürzung nahm in WT Myozyten, wie erwartet, unter β -adrenerger Stimulation und Zunahme der Stimulationsfrequenz deutlich ab (Abbildung 20). Nach Herabsetzen der Stimulationsfrequenz und Auswaschen von Isoprenalin nimmt die Zeit zum Maximum („Time-to-Peak“; TTP) wieder zu. Im Gegensatz dazu weisen die Taz-KD Kardiomyozyten bereits unter basalen Bedingungen eine beschleunigte Zeit bis zur maximalen Verkürzung auf. Durch Zugabe von Isoprenalin und Erhöhen der Arbeitslast kann diese Zeit allerdings nicht weiter beschleunigt werden. Erst nach Beenden des simulierten Stresses kommt es zu einer Zunahme der Time-to-Peak auf das gleiche Niveau wie das der WT Kardiomyozyten. Über den gesamten Experimentverlauf ergeben sich allerdings in der two-way ANOVA keine signifikanten Unterschiede.

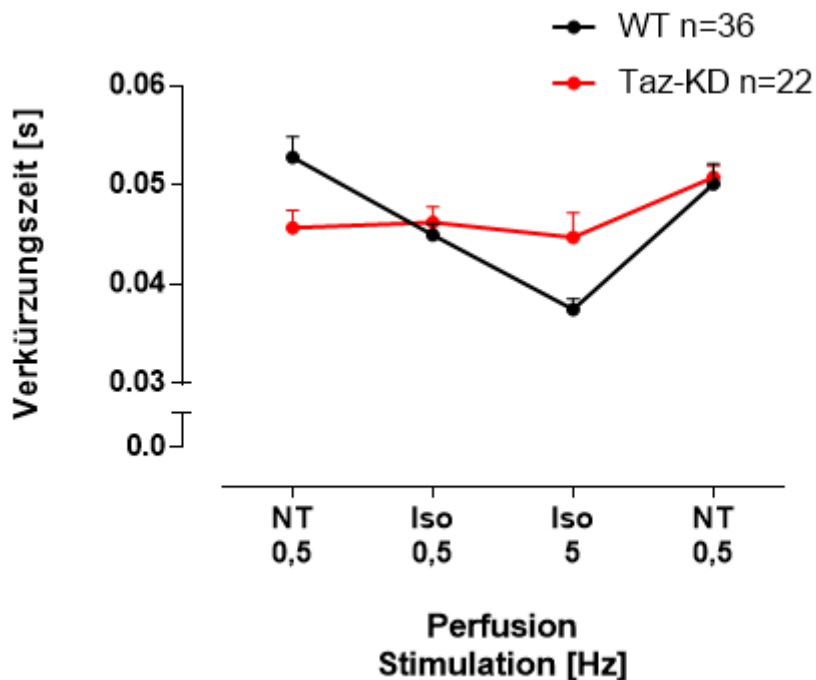


Abbildung 20: Zeit bis zur maximalen Verkürzung (Time-to-Peak) in WT (n=36) und Taz-KD (n=22) Kardiomyozyten.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit zugehörigem SEM zum jeweiligen Messzeitpunkt I-IV.

Hinsichtlich der diastolischen Geschwindigkeit der Wiederverlängerung der Sarkomerlänge ist in WT Myozyten zu beobachten, dass diese unter β -adrenerger Stimulation und Zunahme der Stimulationsfrequenz ebenfalls deutlich zunimmt, was zu einer Verkürzung der Zeit zur 50%igen und 90%igen Wiederverlängerung führt (Abbildung 21). Bei den Taz-KD Kardiomyozyten hingegen ist, ähnlich wie bereits bei der Verkürzungszeit beschrieben, eine gewisse Voraktivierung zu erkennen. Bereits unter basalen Bedingungen verfügen sie über eine kürzere Relaxationszeit, die sich allerdings unter Simulation von physiologischem Stress durch Zugabe von Isoprenalin und Frequenzerhöhung nicht weiter beschleunigen lässt. Diese Beobachtungen entsprechen lediglich Tendenzen, da über den gesamten Experimentverlauf hinsichtlich $RT_{50\%}$ und $RT_{90\%}$ keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen festzustellen sind.

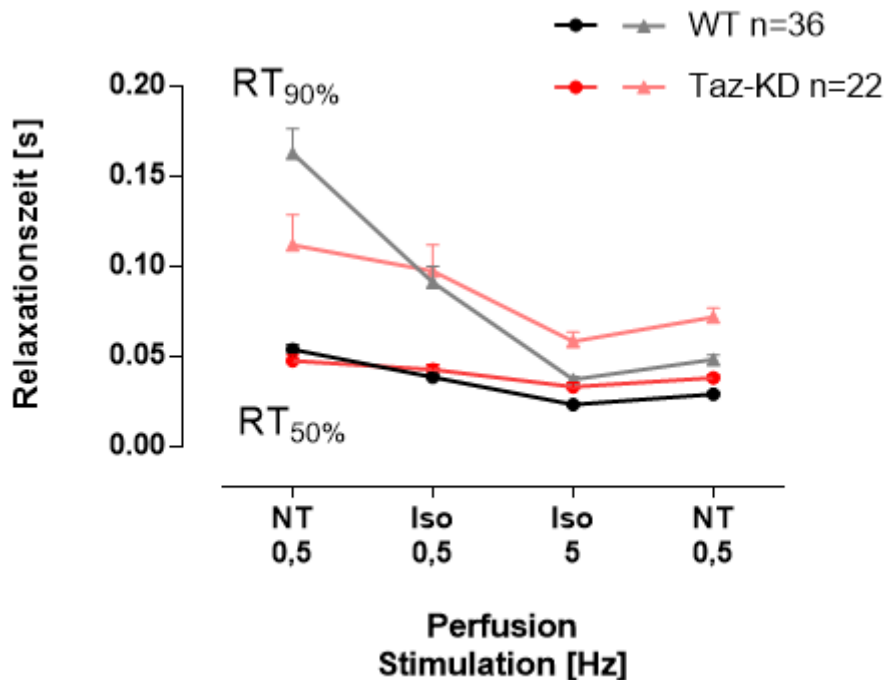


Abbildung 21: Relaxationszeiten in WT (n=36) und Taz-KD (n=22) Kardiomyozyten.

Zeit bis zur 50%igen und 90%igen Relaxation vom Ausgangswert der maximalen Verkürzung. Dargestellt sind die Mittelwerte mit zugehörigem SEM zum jeweiligen Messzeitpunkt I-IV.

4.2.2 Redoxstatus von NAD(P)H/NAD(P)⁺ und FADH₂/FAD

Die Autofluoreszenzmessungen von NAD(P)H und FAD wurden laut Messprotokoll durchgeführt und erlauben einen Rückschluss auf den mitochondrialen Redoxstatus der untersuchten Kardiomyozyten (Abbildung 22). Es ist hierbei wichtig zu wissen, dass eine Oxidation von NAD(P)H mit einer Abnahme der Fluoreszenz assoziiert ist, während die Oxidation von FAD einen Anstieg der Autofluoreszenz verursacht. Der Redoxstatus von NAD(P)H/NAD(P)⁺ und FADH₂/FAD war unter basalen Bedingungen vergleichbar zwischen Kardiomyozyten von WT und Taz-KD Mäusen und etwa zu 52% reduziert. Der Redoxstatus von FADH₂/FAD war zu Beginn des Experimentes ebenfalls vergleichbar in Taz-KD und WT Myozyten und etwa zu 65% reduziert.

Während des Anhebens der Stimulationsfrequenz auf 5 Hz ist in WT Myozyten eine leichte Oxidation von sowohl NAD(P)H als auch FAD zu beobachten, die allerdings binnen weniger Sekunden wieder ihr vorheriges steady-state erreicht. Aus früheren Arbeiten⁷⁶ ist bekannt, dass die initiale Oxidation von NADH/NAD⁺ und FADH₂/FAD auf eine Beschleunigung der Atmung mit vermehrtem Verbrauch von NADH und FADH₂ (an Komplex I und II der Atmungskette) zurückzuführen ist (sog. „undershoot“), während sich die anschließende Regeneration („recovery“) durch eine Akkumulation von Ca²⁺ in Mitochondrien erklärt. Typisch ist ebenfalls die leicht überschießende Reduktion des Redoxstatus (sog. „overshoot“) nach Herabsetzen der Stimulationsfrequenz von 5 auf 0.5 Hz (besonders im NAD(P)H Signal zu beobachten), was auf eine noch durch Ca²⁺ erhöhte Aktivität des Citratzyklus zurückzuführen ist. Die anschließende Re-Äquilibrierung des Redoxstatus ist auf die nach Aussetzen der hochfrequenten Stimulation wieder absinkende mitochondriale Ca²⁺-Konzentration zu erklären (siehe hierzu Maack et al., 2006⁷⁶).

In dieser Hinsicht ist interessant, dass es in Taz-KD Myozyten zu einer ausgeprägten Oxidation („undershoot“) von sowohl NAD(P)H als auch FAD ohne erkennbare Regeneration kommt, was ggf. auf eine unzureichende Ca²⁺-induzierte Aktivierung des Citratzyklus zurückzuführen sein könnte. Am Ende der Stimulation kommt es in Taz-KD Myozyten zu einer raschen Normalisierung des Redoxstatus von NAD(P)H und FAD auf das Ausgangsniveau, allerdings ohne erkennbaren „overshoot“, was ebenfalls auf eine fehlende mitochondriale Ca²⁺-Akkumulation mit konsekutiver Citratzyklus Aktivierung hinweisen könnte.

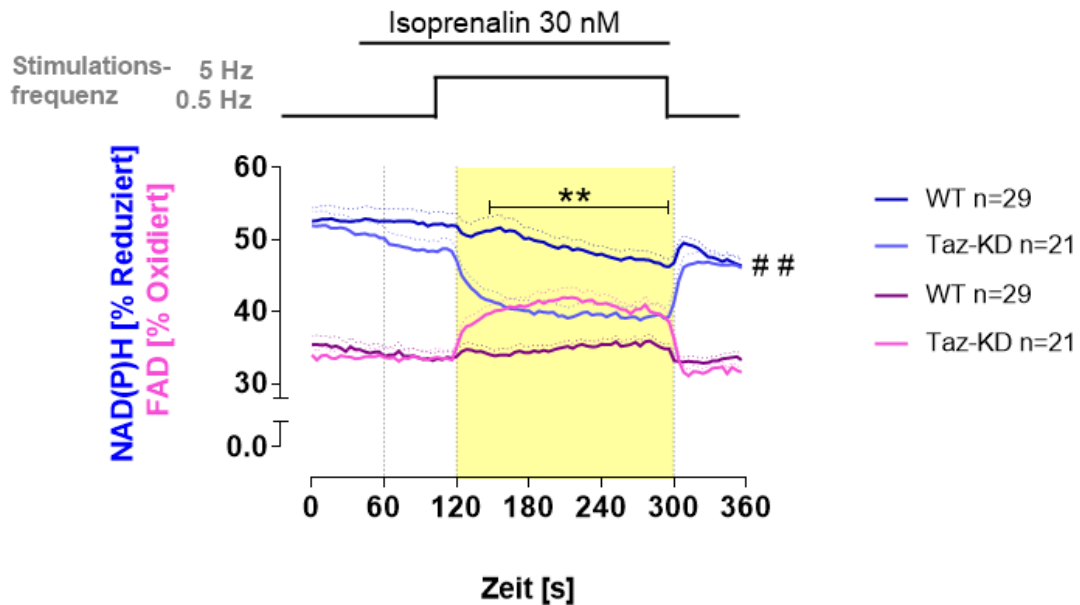


Abbildung 22: Redoxstatus der WT (n=29) und Taz-KD (n=21) Kardiomyozyten im Experimentverlauf.

Gegenläufige Autofluoreszenzen von NAD(P)H und FAD, angegeben in % der am Ende kalibrierten Gesamtmenge an NAD(P)H und FAD. Dargestellt sind die Mittelwerte mit zugehörigem SEM. ## = $p < 0,01$ in der two-way ANOVA, ** = $p < 0,01$ im Bonferroni Posttest.

Da sich die Fluoreszenz von NAD(P)H und FAD bei Oxidation und Reduktion gegenläufig verhält, stellt das Verhältnis von NAD(P)H zu FAD Fluoreszenz einen sensitiven und gut reproduzierbaren Parameter des mitochondrialen Redoxstatus dar, der auch Bewegungsartefakte korrigiert (Abbildung 23). Es zeigt sich auch in dieser Darstellung eine deutliche Oxidation des mitochondrialen Redoxstatus in Taz-KD Myozyten, während der Redoxstatus in WT Myozyten während des Arbeitslastwechsels konstant gehalten wird.

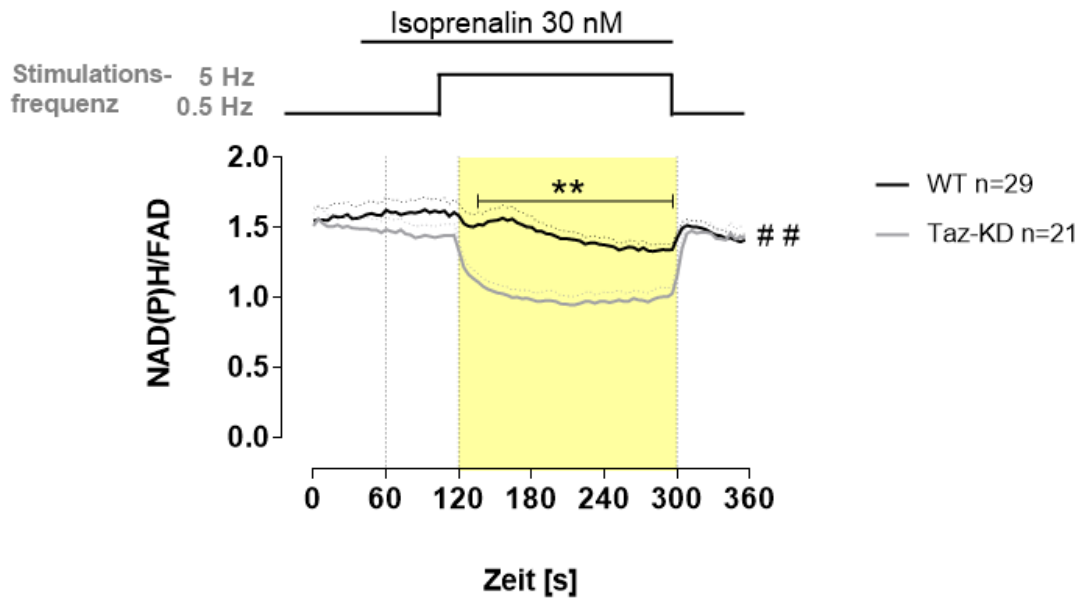


Abbildung 23: Verhältnis von NAD(P)H und FAD in WT (n=29) und Taz-KD (n=21) Kardiomyozyten im Experimentverlauf, als Indikator für den Redoxstatus.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit zugehörigem SEM. ## = $p < 0,01$ in der two-way ANOVA, ** = $p < 0,01$ im Bonferroni Posttest.

4.2.3 Kardiomyozytenfunktion in der Gegenwart von SS31

SS31 interagiert mit Cardiolipin und verhindert dessen oxidative Beschädigung. Die Auswirkungen von SS31 auf die Kardiomyozytenfunktion wurden nach kurzzeitiger Inkubation der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen (1 nM, 5 nM, 10 nM und 100 nM) von SS31 nach dem gleichen Messprotokoll untersucht. Zunächst werden die Zellen der WT Mäuse mit und ohne SS31 verglichen (Abbildung 24). Hierbei fällt auf, dass signifikante Unterschiede in der diastolischen Sarkomerlänge bestehen (two-way ANOVA $p < 0,05$), die sich vor allem während der Erholungsphase offenbaren. Die Myozyten mit vorheriger Behandlung mit SS31 weisen dabei eine größere diastolische Ausdehnung auf als die der Kontrollgruppe. Sowohl bei der systolischen Länge als auch bei der Verkürzungsfraction (Abbildung 25) und der Zeit bis zur maximalen Verkürzung (Abbildung 26) sind keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen festzustellen.

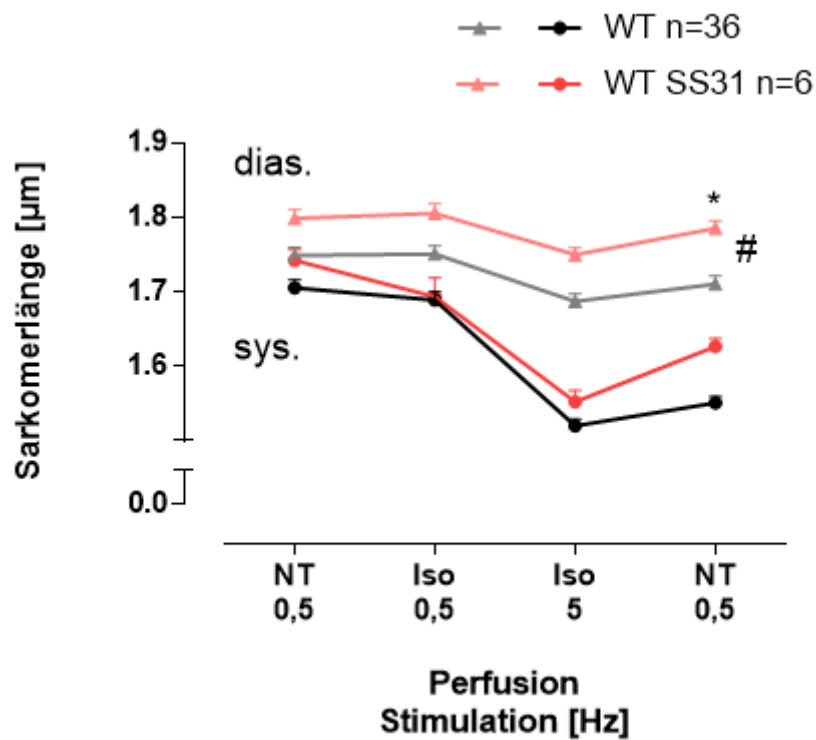


Abbildung 24: Sarkomerlänge in WT (n=36) Kardiomyozyten im Vergleich zu WT (n=6) Kardiomyozyten nach Behandlung mit SS31 im Experimentverlauf.

Die SS31 Konzentrationen, mit denen die Kardiomyozyten beladen wurden, betrugen zweimal 1 nM, einmal 10 nM und dreimal 100 nM. Dargestellt sind die Mittelwerte mit zugehörigem SEM zum jeweiligen Messzeitpunkt I-IV. # = $p < 0.05$ in der two-way ANOVA, * = $p < 0,05$ im Bonferroni Posttest.

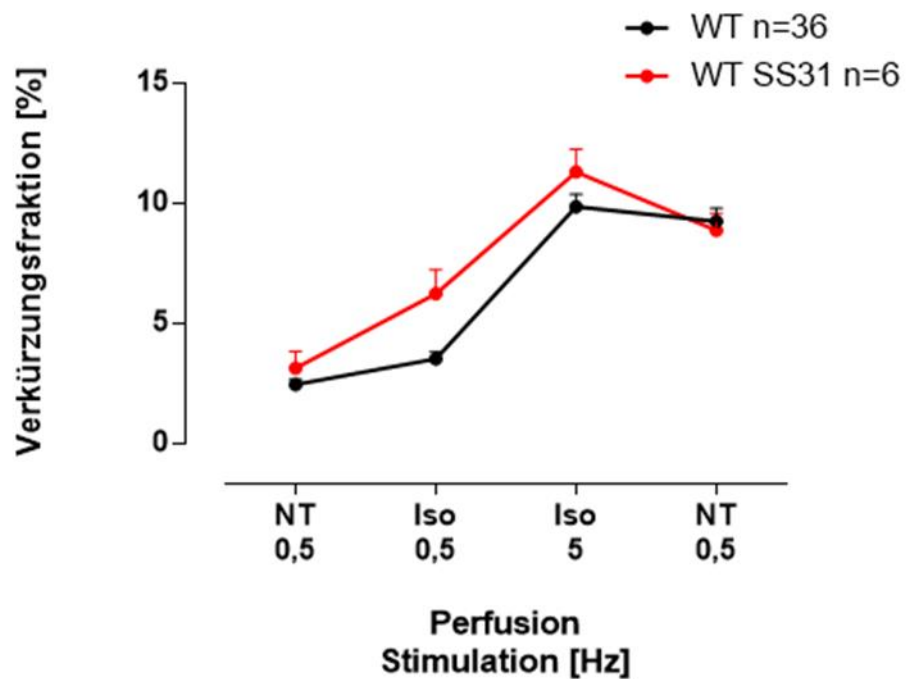


Abbildung 25: Fraktionelle Verkürzung in WT (n=36) Kardiomyozyten im Vergleich zu WT (n=6) Kardiomyozyten nach Behandlung mit SS31 im Experimentverlauf.

Die SS31 Konzentrationen, mit denen die Kardiomyozyten beladen wurden, betrugen zweimal 1 nM, einmal 10 nM und dreimal 100 nM. Dargestellt sind die Mittelwerte mit zugehörigem SEM zum jeweiligen Messzeitpunkt I-IV.

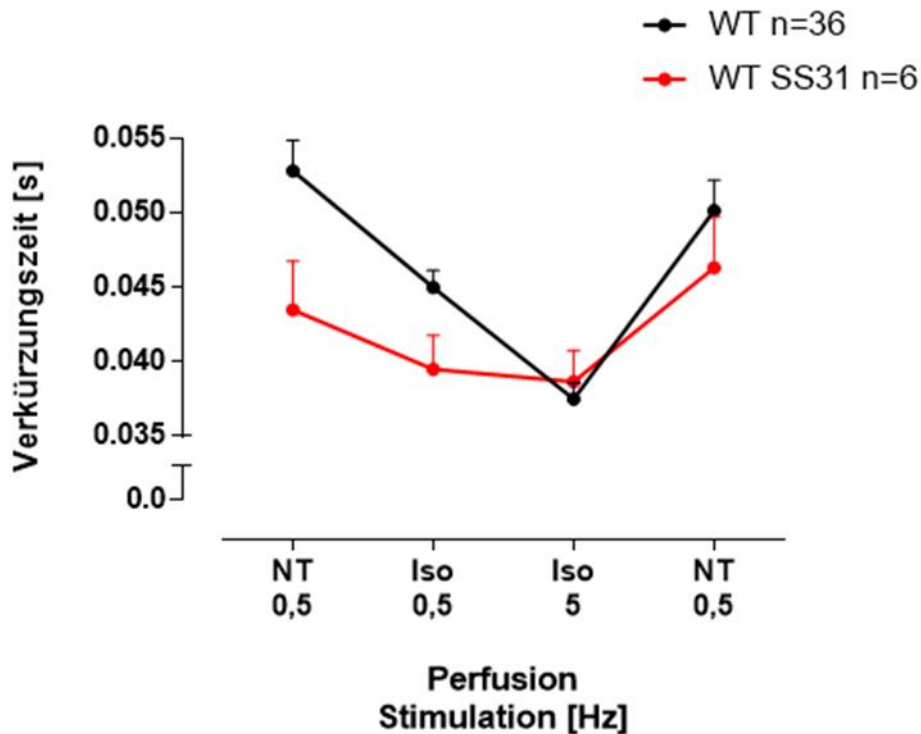


Abbildung 26: Zeit bis zur maximalen Verkürzung (Time-to-Peak) in WT (n=36) Kardiomyozyten im Vergleich zu WT (n=6) Kardiomyozyten nach Behandlung mit SS31 im Experimentverlauf.

Die SS31 Konzentrationen, mit denen die Kardiomyozyten beladen wurden, betrugen zweimal 1 nM, einmal 10 nM und dreimal 100 nM. Dargestellt sind die Mittelwerte mit zugehörigem SEM zum jeweiligen Messzeitpunkt I-IV.

Die Relaxationszeit (Abbildung 27) ist jedoch signifikant unterschiedlich ($RT_{50\%}$: two-way ANOVA $p < 0,05$). Diejenigen Zellen, die mit SS31 beladen sind, benötigen während der Einschlagphase im Schnitt knapp 20 ms weniger und zu dem Zeitpunkt an dem Isoprenalin wirkt rund 15 ms weniger um sich auf die Hälfte der Ausgangslänge zu entspannen ($p < 0,05$). Auch die Zeit, die die Zellen benötigen, um sich zu 90 % zu erholen weist Unterschiede in diesen Bereichen auf, die jedoch unterhalb des Signifikanzniveaus bleiben.

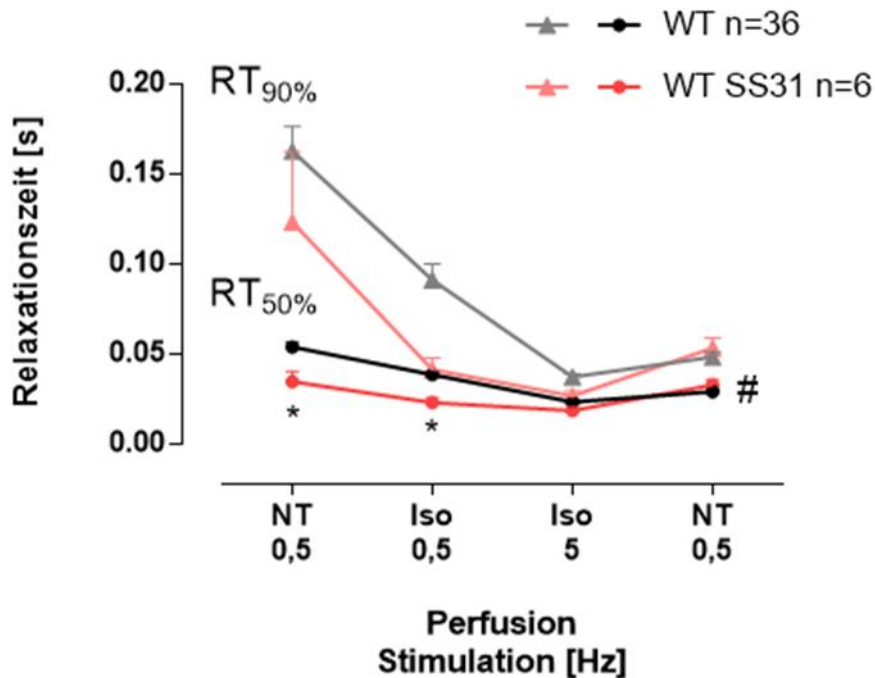


Abbildung 27: Relaxationszeiten in WT (n=36) Kardiomyozyten im Vergleich zu WT (n=6) Kardiomyozyten nach Behandlung mit SS31 im Experimentverlauf.

Zeit bis zur 50%igen und 90%igen Relaxation vom Ausgangswert der maximalen Verkürzung. Die SS31 Konzentrationen, mit denen die Kardiomyozyten beladen wurden, betrugen zweimal 1 nM, einmal 10 nM und dreimal 100 nM. Dargestellt sind die Mittelwerte mit zugehörigem SEM zum jeweiligen Messzeitpunkt I-IV. # = $p < 0.05$ in der two-way ANOVA, * = $p < 0,05$ im Bonferroni Posttest.

In Abbildung 26 bis Abbildung 28 sind die Kontraktilitätsparameter der Myozyten aus Taz-defizienten Mäusen mit und ohne vorherige Inkubation mit SS31 dargestellt. Hierbei sind zwischen beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede in der diastolischen und der systolischen Länge (Abbildung 28) über die gesamte Dauer des Experimentes festzustellen. Tendenziell ist die diastolische Spannung im Bereich der erhöhten Arbeitslast etwas verbessert bei den Myozyten mit SS31.

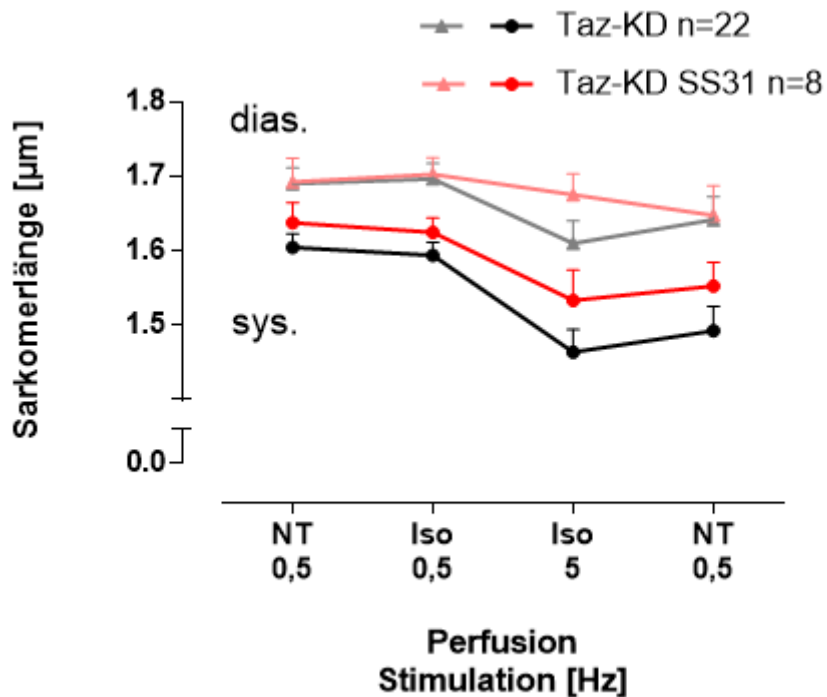


Abbildung 28: Sarkomerlänge in Taz-KD (n=22) Kardiomyozyten im Vergleich zu Taz-KD (n=8) Kardiomyozyten nach Behandlung mit SS31 im Experimentverlauf.

Die SS31 Konzentrationen, mit denen die Kardiomyozyten beladen wurden, betrugen dreimal 1 nM, dreimal 5 nM und zweimal 10 nM. Dargestellt sind die Mittelwerte mit zugehörigem SEM zum jeweiligen Messzeitpunkt I-IV.

Die Verkürzungsfraction (Abbildung 29) weicht lediglich im Bereich der Erholungsphase ein wenig auseinander, wobei die Zellen mit SS31 weniger fraktionelle Verkürzung aufweisen. Die Unterschiede bleiben jedoch unterhalb des Signifikanzniveaus.

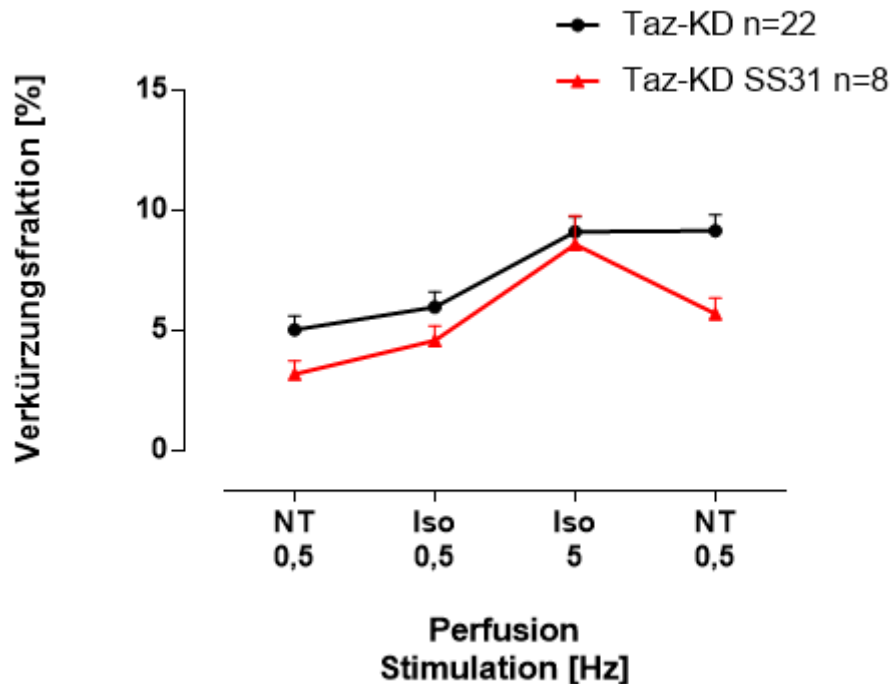


Abbildung 29: Fraktionelle Verkürzung in Taz-KD (n=22) Kardiomyozyten im Vergleich zu Taz-KD (n=8) Kardiomyozyten nach Behandlung mit SS31 im Experimentverlauf.

Die SS31 Konzentrationen, mit denen die Kardiomyozyten beladen wurden, betrugen dreimal 1 nM, dreimal 5 nM und zweimal 10 nM. Dargestellt sind die Mittelwerte mit zugehörigem SEM zum jeweiligen Messzeitpunkt I-IV.

Die Zeit bis zur maximalen Verkürzung (Abbildung 30) zeigt eine signifikante Differenz zwischen beiden Gruppen (two-way ANOVA $p < 0,01$). Die Kardiomyozyten mit SS31-Behandlung benötigen im Schnitt über das gesamte Experiment betrachtet sechs Millisekunden weniger, um sich maximal zu verkürzen. Vor allem in der Erholungsphase, in der die Taz-KD Zellen ohne SS31 beinahe die doppelte Zeit benötigen, werden die Unterschiede offenbar.

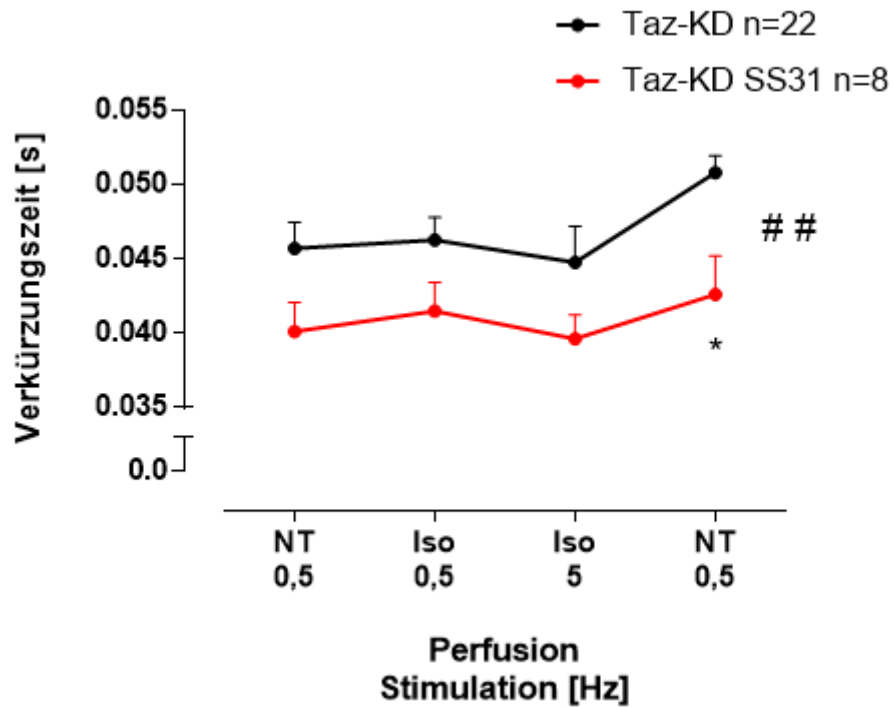


Abbildung 30: Zeit bis zur maximalen Verkürzung (Time-to-Peak) in Taz-KD (n=22) Kardiomyozyten im Vergleich zu Taz-KD (n=8) Kardiomyozyten nach Behandlung mit SS31 im Experimentverlauf.

Die SS31 Konzentrationen, mit denen die Kardiomyozyten beladen wurden, betrugen dreimal 1 nM, dreimal 5 nM und zweimal 10 nM. Dargestellt sind die Mittelwerte mit zugehörigem SEM zum jeweiligen Messzeitpunkt I-IV. ## = $p < 0.01$ in der two-way ANOVA, * = $p < 0,05$ im Bonferroni Posttest.

Während der Relaxation (Abbildung 31) verhalten sich beide Zellgruppen annähernd gleich.

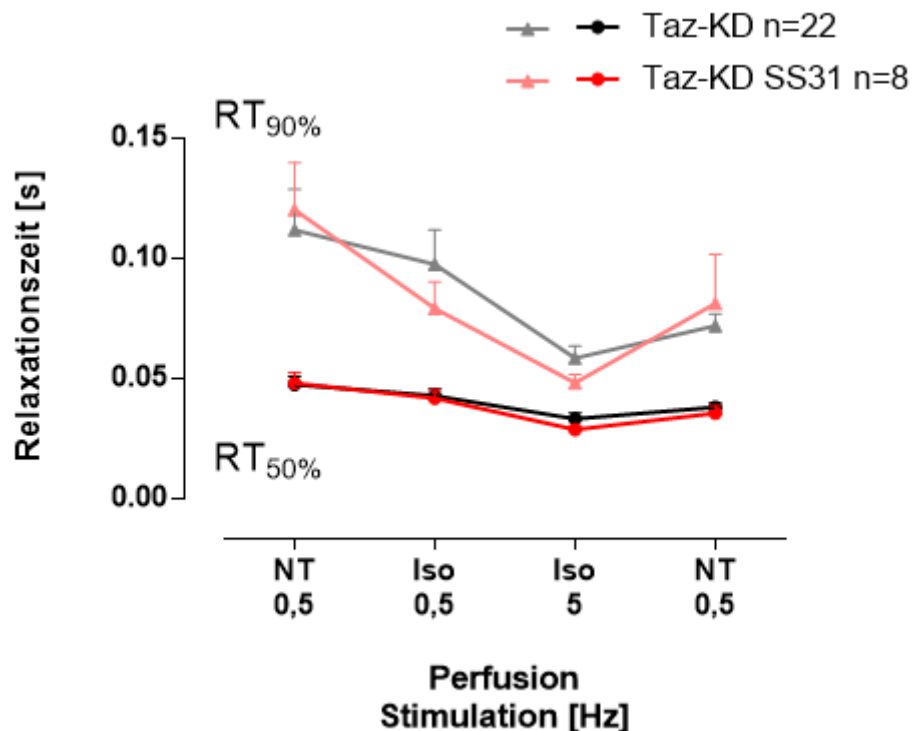


Abbildung 31: Relaxationszeiten in Taz-KD (n=22) Kardiomyozyten im Vergleich zu Taz-KD (n=8) Kardiomyozyten nach Behandlung mit SS31 im Experimentverlauf.

Zeit bis zur 50%igen und 90%igen Relaxation vom Ausgangswert der maximalen Verkürzung. Die SS31 Konzentrationen, mit denen die Kardiomyozyten beladen wurden, betrugen dreimal 1 nM, dreimal 5 nM und zweimal 10 nM. Dargestellt sind die Mittelwerte mit zugehörigem SEM zum jeweiligen Messzeitpunkt I-IV.

4.2.4 Einfluss von SS31 auf den mitochondrialen Redoxstatus von NAD(P)H und FAD

Um zu untersuchen, inwieweit SS31 den mitochondrialen Redoxstatus in Kardiomyozyten beeinflussen kann, wurde das bewährte Messprotokoll an Taz-defizienten und nicht-defizienten Kardiomyozyten, die zuvor jeweils mit SS31 behandelt wurden, durchgeführt. Daraufhin wurden die erhobenen Daten mit Taz-KD und WT Zellen ohne SS31-Behandlung verglichen. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf das NAD(P)H-Signal der beiden Wildtyp Gruppen (Abbildung 32A). Betrachtet man jedoch das FAD-Signal, kommt es durch die Inkubation der WT Kardiomyozyten mit SS31 während der Erholungsphase zu einer signifikant stärkeren Oxidation (two-way ANOVA $p < 0,01$). Das Verhältnis von NAD(P)H zu FAD als Indikator

für den Redoxstatus (Abbildung 32B) zeigt zwar eine deutliche Tendenz der mit SS31-behandelten Zellen hin zu einem höheren Oxidationslevel, jedoch sind die Unterschiede nicht signifikant.

Betrachtet man die Ergebnisse in Kardiomyozyten von Taz-defizienten Mäusen (Abbildung 33A), stellt man weder für das NAD(P)H-, noch für das FAD-Signal einen signifikanten Unterschied zwischen behandelten und nicht behandelten Myozyten fest. Beide Gruppen erfahren während β -adrenerger Stimulation eine transiente Oxidation, die zwar deutlich stärker ausgeprägt ist als bei den WT Zellen, sich jedoch durch SS31 nicht beeinflussen lässt.

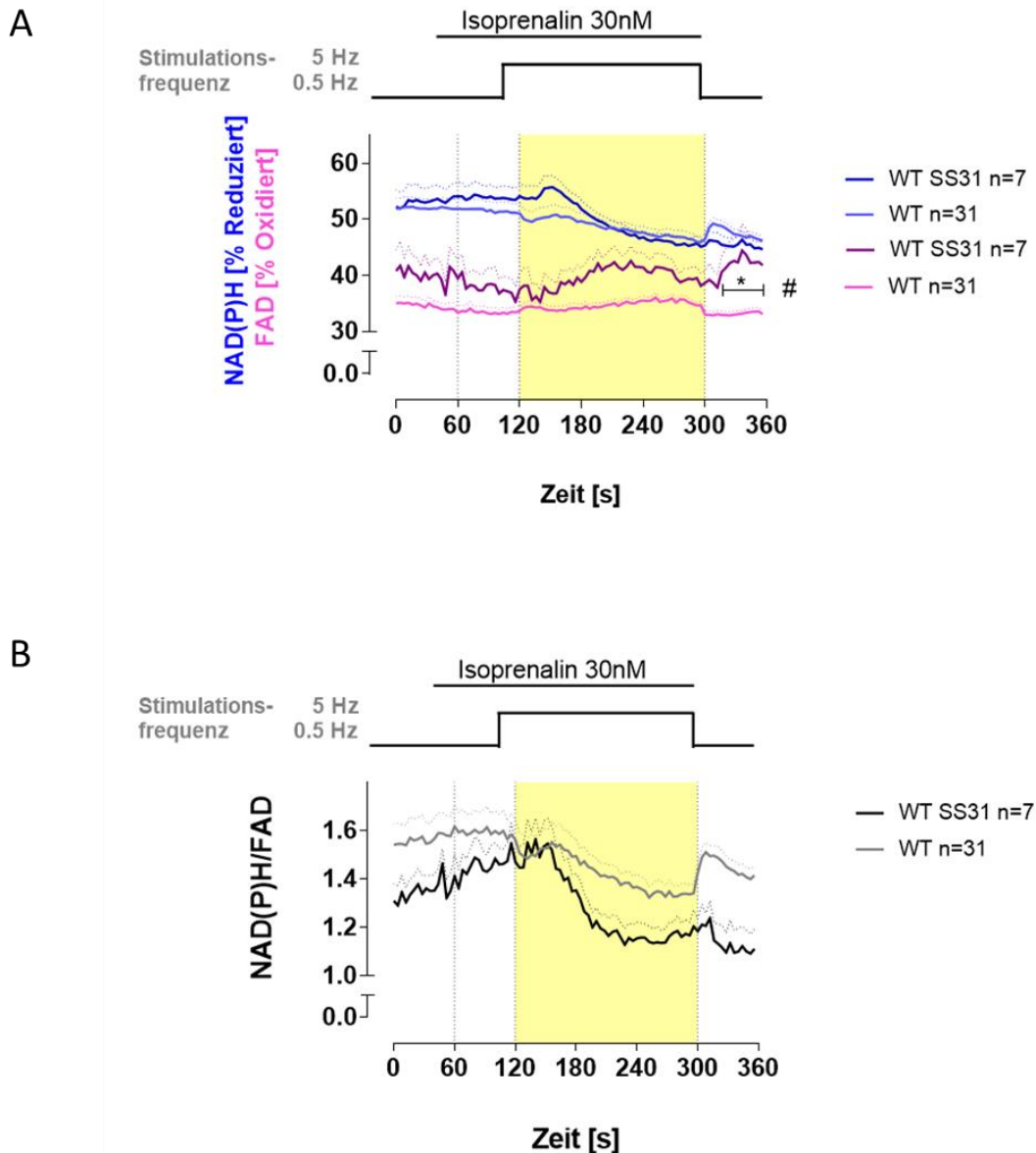


Abbildung 32: Redoxstatus der WT (n=31) Kardiomyozyten im Vergleich zu WT (n=6) Kardiomyozyten mit SS31-Behandlung im Experimentverlauf.

A, Sich gegenläufig verhaltende Autofluoreszenzen von NAD(P)H und FAD, angegeben in % der am Ende kalibrierten Gesamtmenge an NAD(P)H und FAD, mit transientser Oxidation während einer Stimulationsfrequenz von 5 Hz in beiden Gruppen. B, Verhältnis von NAD(P)H und FAD, als Indikator für den Redoxstatus. Die SS31 Konzentrationen, mit denen die Kardiomyozyten beladen wurden, betrugen dreimal 1 nM, einmal 10 nM und dreimal 100 nM. Dargestellt sind die Mittelwerte mit zugehörigem SEM. # = $p < 0.05$ in der two-way ANOVA, * = $p < 0.05$ im Bonferroni Posttest.

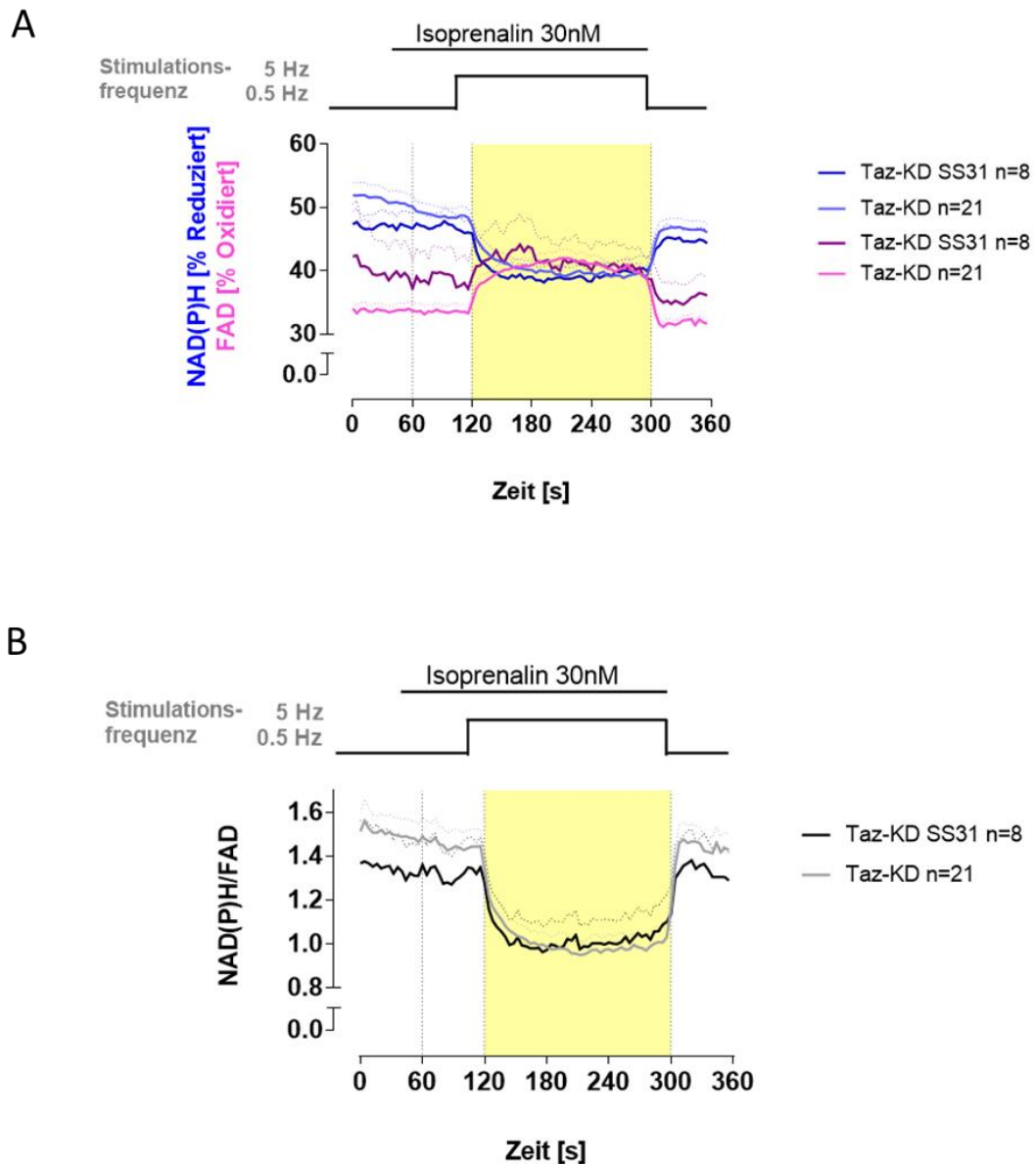


Abbildung 33: Redoxstatus der Taz-KD (n=21) Kardiomyozyten im Vergleich zu Taz-KD (n=8) Kardiomyozyten mit SS31-Behandlung im Experimentverlauf.

A, Sich gegenläufig verhaltende Autofluoreszenzen von NAD(P)H und FAD, angegeben in % der am Ende kalibrierten Gesamtmenge an NAD(P)H und FAD, mit ausgeprägter transientser Oxidation während einer Stimulationsfrequenz von 5 Hz in beiden Gruppen. B, Verhältnis von NAD(P)H und FAD, als Indikator für den Redoxstatus. Die SS31 Konzentrationen, mit denen die Kardiomyozyten beladen wurden, betrugen dreimal 1 nM, dreimal 5 nM und zweimal 10 nM. Dargestellt sind die Mittelwerte mit zugehörigem SEM.

4.2.5 Mitochondriale Superoxidproduktion

Mit Hilfe des Farbstoffes MitoSOX sollte die Auswirkung der Tafazzin-Defizienz auf die Superoxidproduktion der Mitochondrien untersucht werden. Die Messungen wurden nach MitoSOX-Messprotokoll (s. Abbildung 11) durchgeführt und die Messergebnisse als Fluoreszenzintensität F zum jeweiligen Messzeitpunkt, bezogen auf die zu Beginn gemessene Fluoreszenzintensität F_0 , angegeben (Abbildung 34). Es war allerdings festzustellen, dass die Zellen, sowohl WT als auch Taz-KD, den Farbstoff an sich sehr schlecht vertragen. Aus diesem Grund und auch da es sich bei den WT Zellen nur um eine sehr geringe Anzahl an gemessenen Zellen handelt und somit eine hohe Irrtumswahrscheinlichkeit nicht ausgeschlossen werden kann, sind die erhobenen Daten mit Vorsicht zu verwenden. Es deutet sich jedoch an, dass die Superoxidproduktion der Taz-KD Kardiomyozyten unter β -adrenerger Stimulation nicht zunimmt, sondern eher geringer ist und über das gesamte Experiment betrachtet relativ konstant bleibt.

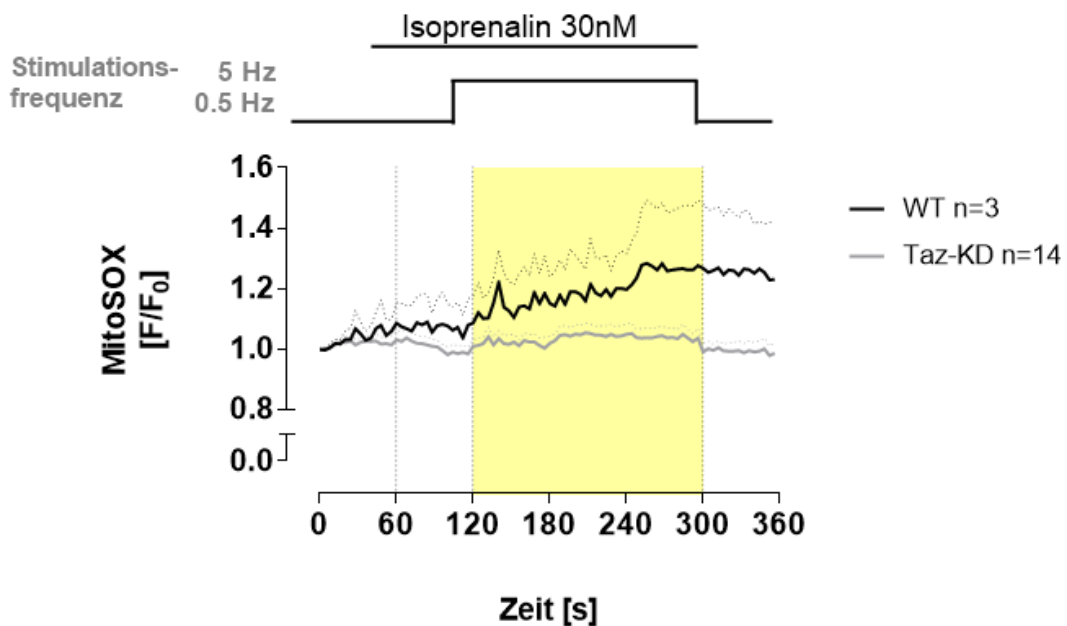


Abbildung 34: Mitochondriale Superoxidproduktion in WT (n=3) und Taz-KD (n=14) Kardiomyozyten im Experimentverlauf, gemessen mit Hilfe des Farbstoffes MitoSOX. Angabe des Messergebnisses in Bezug auf die basale Fluoreszenzintensität des MitoSOX-Signals. Dargestellt sind die Mittelwerte mit zugehörigem SEM.

4.2.6 Mitochondriale ROS-Produktion

Mit Hilfe des Farbstoffes Dichlorofluorescein (DCF) sollte die Auswirkung der Tafazzin-Defizienz auf die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies untersucht werden. Das Messergebnis bezieht sich vor allem, jedoch nicht im Speziellen, auf die Entstehung von H_2O_2 , da dieses vornehmlich detektiert wurde. Die Messungen wurden nach DCF-Messprotokoll (s. Abbildung 11) durchgeführt und die Messergebnisse als Fluoreszenzintensität F zum jeweiligen Messzeitpunkt, bezogen auf die zu Beginn gemessene Fluoreszenzintensität F_0 , angegeben (Abbildung 35). Sowohl bei den WT als auch Taz-KD Kardiomyozyten zeigt sich der stetige Anstieg des H_2O_2 -Gehaltes über den gesamten Experimentverlauf. Der Ausgangspunkt beider Kurven ist nahezu identisch und auch im Experimentverlauf ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen.

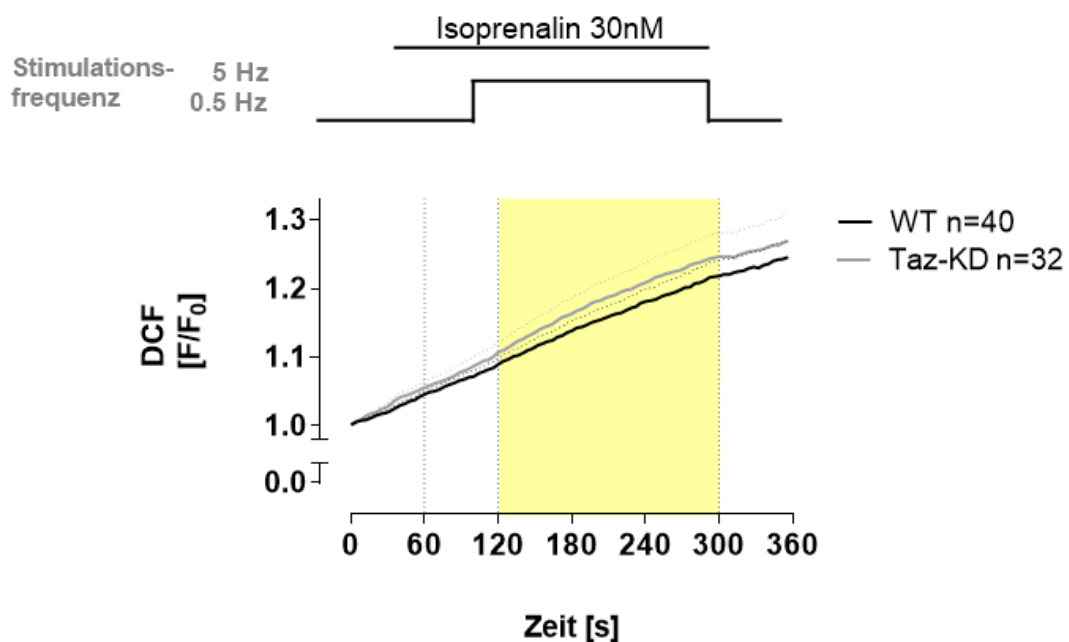


Abbildung 35: Mitochondriale ROS-Produktion in WT (n=40) und Taz-KD (n=32) Kardiomyozyten im Experimentverlauf, gemessen mit Hilfe des Farbstoffes DCF.

Angabe des Messergebnisses in Bezug auf die basale Fluoreszenzintensität des DCF-Signals. Dargestellt sind die Mittelwerte mit zugehörigem SEM.

Am Ende einer jeden Messung mit dem Farbstoff DCF erfolgte die Zugabe von 1 mM extrazellulärem H_2O_2 , worunter man einen deutlichen Anstieg des

DCF-Signals als Positivkontrolle für die DCF-Beladung der Kardiomyozyten beobachten konnte. Hinsichtlich der Reaktion auf eben diese Zugabe von H_2O_2 zeigt sich ein signifikanter Unterschied (ungepaarter T-Test $p < 0,0001$) zwischen beiden Gruppen. So weisen die Taz-KD Kardiomyozyten ein deutlich geringeres Ansprechen auf H_2O_2 als die WT Kardiomyozyten auf.

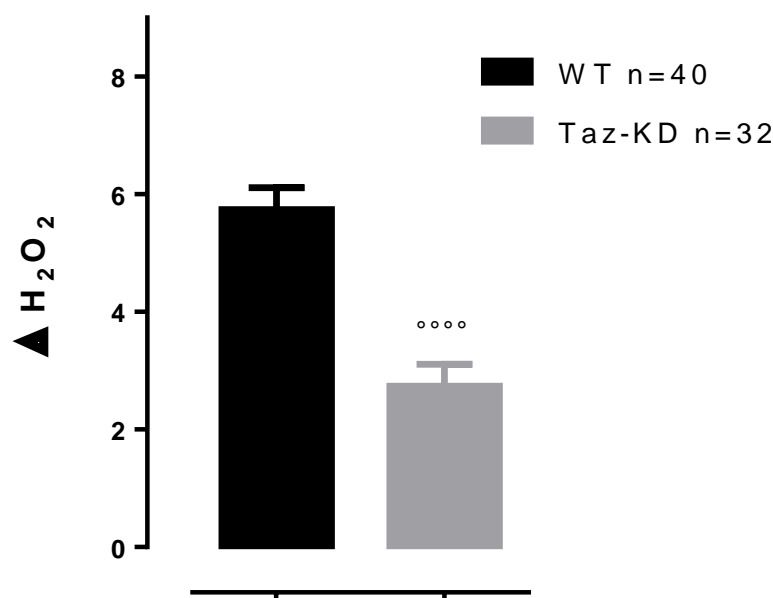


Abbildung 36: Ansprechen auf H_2O_2 in WT und Taz-KD Kardiomyozyten

Differenz vor und nach Zugabe von H_2O_2 am Ende eines jeden Experimentes mit DCF. Dargestellt sind die Mittelwerte mit zugehörigem SEM. $^{****} = p < 0,0001$ im ungepaarten T-Test.

4.2.7 Intrazelluläre Calcium-Konzentration

Die Auswirkung der Tafazzin-Defizienz auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration wurde mit Hilfe des Farbstoffes Indo-1 AM ermittelt. Diese Experimente wurden von den Medizinisch-Technischen Assistentinnen Nina Schnellbach und Michelle Gulentz durchgeführt und mir freundlicherweise zur Auswertung zur Verfügung gestellt. Das Prinzip der Messungen basiert darauf, dass das Emissionsmaximum des Farbstoff Indo-1 in seiner ungebundenen Form bei 485nm liegt und sich durch die Bindung von Ca^{2+} hin zu 405 nm verschiebt. Durch die Detektion beider Emissionsmaxima werden beide Formen des Farbstoffes gemessen und daraufhin ins Verhältnis gesetzt. Dadurch ergibt sich eine sehr sensitive Methode zur

Messung kleinster Veränderungen in der intrazellulären Calcium-Konzentration (Abbildung 37). Es fällt auf, dass die Calciumkonzentration der Taz-KD Myozyten über den gesamten Experimentverlauf relativ konstant bleibt, wohingegen sie bei den WT Myozyten während der Arbeitslasterhöhung, sprich der Zugabe von Isoprenalin und transienter Erhöhung der Stimulationsfrequenz auf 5 Hz, einen ausgeprägten Anstieg erfährt. Trotz eines Absinkens der Calciumkonzentration in den WT Zellen in der Erholungsphase bleibt der Unterschied zwischen beiden Zellreihen statistisch signifikant. Diese Unterschiede fallen in gleichem Maße während der Systole und der Diastole auf.

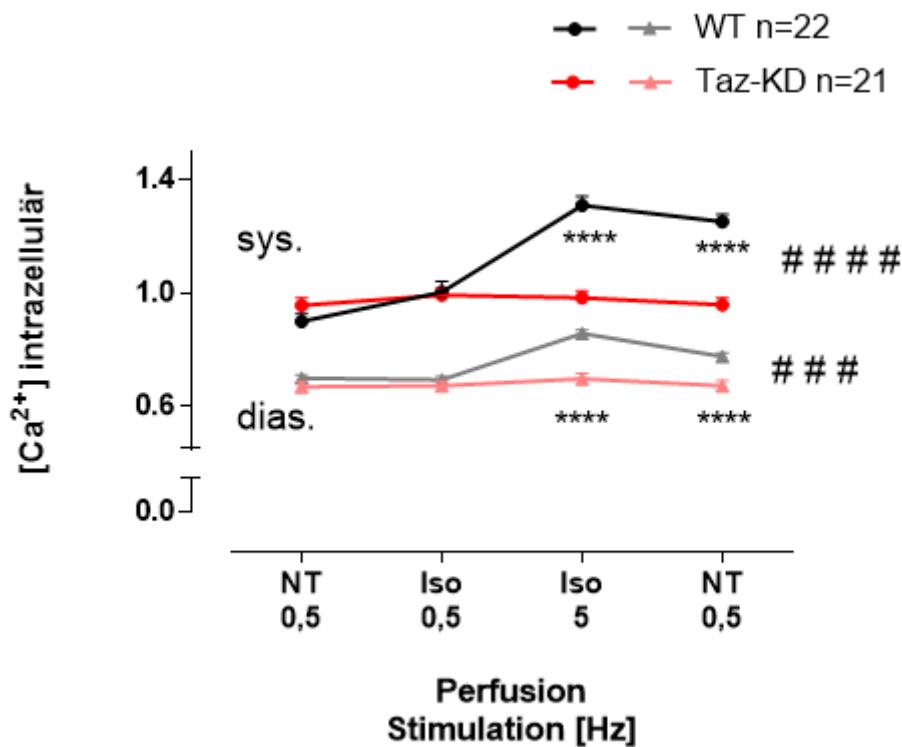


Abbildung 37: Intrazelluläre Calciumkonzentration in WT (n=22) und Taz-KD (n=21) Kardiomyozyten während der Systole und der Diastole im Experimentverlauf, gemessen mit Hilfe des Farbstoffes Indo.

Die Calciumkonzentration ergibt sich aus dem Verhältnis der Calcium-gebundenen Form des Farbstoffes zu der ungebundenen Form des Farbstoffes, ermittelt durch die Aufzeichnung beider Emissionsmaxima (405 nm/485 nm). Dargestellt sind die Mittelwerte mit zugehörigem SEM zum jeweiligen Messzeitpunkt I-IV. ### = $p < 0.001$; #### = $p < 0,0001$ in der two-way ANOVA, **** = $p < 0,0001$ im Bonferroni Posttest.

4.2.8 Mitochondriales Membranpotential

In denselben Zellen, in denen die Messung der Fluoreszenz von Indo-1 erfolgte, wurde gleichzeitig die Fluoreszenz des Farbstoffes Tetramethylrhodamin-Methylester (TMRM) detektiert, mit dessen Hilfe die Auswirkung der Tafazzin-Defizienz auf das mitochondriale Membranpotential $\Delta\psi_m$ untersucht werden sollte. Der Farbstoff ist in der Lage, die Zellmembran und die mitochondrialen Membranen zu durchdringen und dank seiner positiven Ladung in den negativ geladenen Mitochondrien zu akkumulieren. Auf diese Weise können Veränderungen im mitochondrialen Membranpotential detektiert werden. Die Messergebnisse wurden als Fluoreszenzintensität F zum jeweiligen Messzeitpunkt, bezogen auf die zu Beginn gemessene Fluoreszenzintensität F_0 , angegeben. Über den gesamten Experimentverlauf zeigt sich in beiden Messgruppen ein stabiles $\Delta\psi_m$, wobei es lediglich gegen Ende zu einem unwesentlichen (nicht signifikanten) Abfall des mitochondrialen Membranpotentials in der Gruppe der Taz-KD Kardiomyozyten kommt.

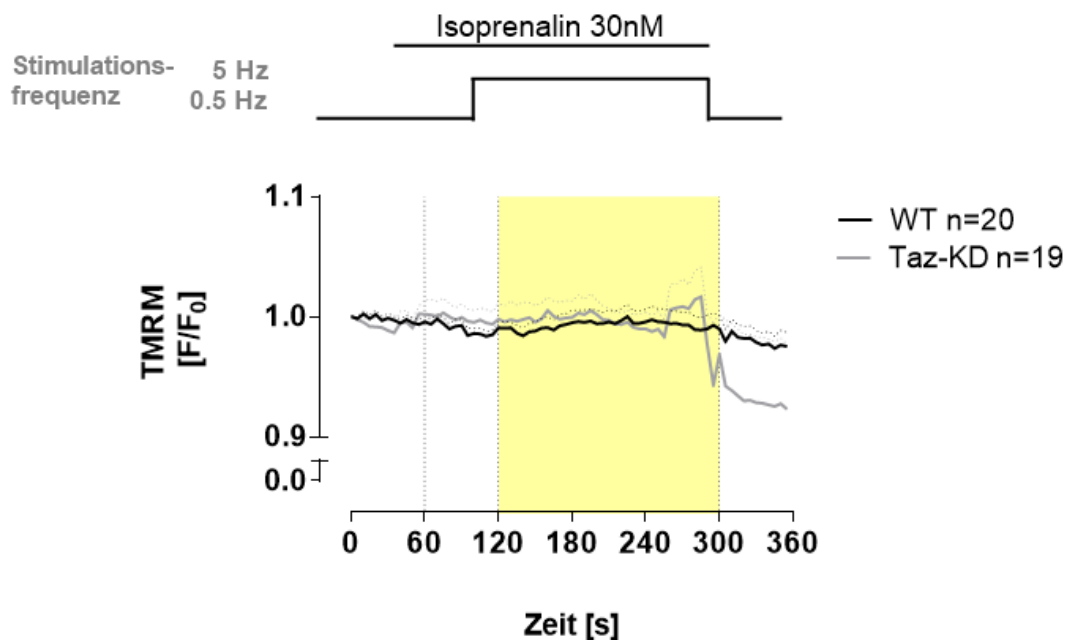


Abbildung 38: Mitochondriales Membranpotential $\Delta\psi_m$ in WT (n=20) und Taz-KD (n=19) Kardiomyozyten im Experimentverlauf, gemessen mit Hilfe des Farbstoffes TMRM.

Angabe des Messergebnisses in Bezug auf die basale Fluoreszenzintensität des TMRM-Signals. Dargestellt sind die Mittelwerte mit zugehörigem SEM.

5 Diskussion

Die im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Experimente verfolgten die Absicht, weitere Einblicke in die Pathophysiologie des Barth Syndroms zu gewinnen, vor allem in Hinblick auf mögliche Prozesse, die die Entwicklung einer Herzinsuffizienz begünstigen könnten. Hierbei wurden insbesondere die Konsequenzen der Tafazzin-Deletion auf die mitochondriale Funktion, die Prozesse der elektromechanischen Kopplung sowie die Regulation der mitochondrialen Energetik untersucht. Parameter, die dazu unter anderem bestimmt wurden, sind zum einen die Kontraktilität der Kardiomyozyten, ihr Redoxstatus, ihre intrazelluläre Calcium-Konzentration und zum anderen die Funktionalität der Atmungskette, sowie der mitochondriale Pool an NAD(P)H und FADH₂. Da Defekte sowohl in der elektromechanischen Kopplung als auch in der mitochondrialen Energetik vermehrt oxidativen Stress bedingen können, wurde außerdem die Produktion von H₂O₂ und $\cdot\text{O}_2^-$ untersucht. Als Probenmaterial dienten Kardiomyozyten und isolierte Mitochondrien von Tafazzin-defizienten Mäusen und Tieren der WT Kontrollgruppe ohne den induzierten *Taz*-Knockdown, der letztendlich zu einer Veränderung im Cardiolipin-Muster führt. Zum Zeitpunkt der Messungen waren die Tiere beider Gruppen in einem Alter von acht bis zehn Wochen. Basierend auf früheren Arbeiten (Acehan, JBC 2011) und auch unseren eigenen Ergebnissen (nicht gezeigt) bestanden zu diesem Zeitpunkt noch keine Zeichen einer Herzinsuffizienz.

5.1 Auswirkung der Tafazzin-Defizienz auf die kontraktile Funktion der Kardiomyozyten und die elektromechanische Kopplung

Der klinische Phänotyp des Barth Syndrom zeigt sich in Form einer Kardiomyopathie, meist mit nur mild eingeschränkter Ejektionsfraktion.^{17, 26} In echokardiographischen Untersuchungen, durchgeführt durch die AG Maack, am ebenfalls von uns verwendeten Tiermodell konnte gezeigt werden, dass

die Mäuse im Alter von 50 Wochen bei einer erhaltenen EF von 55% eine diastolische Dysfunktion und kleinere linke Ventrikel aufwiesen.

Stammzellen, die von Patienten mit Barth Syndrom gewonnen wurden, verfügten allerdings über eine geringere systolische Spannung und ein geringeres Ausmaß der Verkürzung der Zelle an sich, was letztendlich einer systolischen Funktionseinschränkung gleichkommt.⁴⁵ Unsere Experimente konnten die Ergebnisse in Bezug auf die systolische Dysfunktion nicht bestätigen. Dagegen zeigte sich bei uns eine signifikant kürzere systolische Länge der Tafazzin-defizienten Kardiomyozyten, was im Endeffekt einer größeren systolischen Spannung gleichkommt ($p < 0,0001$). Was wir anhand unserer Messungen vielmehr feststellen konnten, war eine diastolische Funktionsstörung. Diese offenbarte sich vor allem während erhöhter Belastung durch β -adrenerge Stimulation und Stimulationsfrequenz-Erhöhung. In dieser Phase zeigten die Taz-KD gegenüber WT Kardiomyozyten eine geringere end-diastolische Sarkomerlänge und eine verlangsamte diastolische Wiederverlängerungsgeschwindigkeit. Echokardiographisch zeigte sich in 50 Wochen (aber noch nicht in 10 Wochen) alten Mäusen ebenfalls eine diastolische Dysfunktion, die insbesondere durch einen Verlust der E-Welle, welche die passive Füllung des linken Ventrikels über die Mitralklappe abbildet, gekennzeichnet ist.

Ebenfalls passend zu unseren frequenzabhängigen Beobachtungen ist die Tatsache, dass auch Patienten mit diastolischer Herzinsuffizienz eine Intoleranz gegenüber Belastung zeigen,¹⁰⁰ die dadurch begründet ist, dass das Herz nicht in der Lage ist, bei Anstrengung sein Schlagvolumen, gemäß des Frank-Starling-Mechanismus durch Erhöhen des enddiastolischen Volumens, zu vergrößern.¹⁰¹ Bei Betrachtung der klinischen Daten von Patienten mit Barth Syndrom wird offenbar, dass tatsächlich die meisten (stabilen) Patienten eine formal erhaltene LV Funktion aufweisen mit einer mittleren LVEF von 50% und nur wenigen Fällen von Patienten mit einer hochgradig eingeschränkten LV Funktion.²⁶

So können die Ergebnisse unserer Arbeit zeigen, dass beim Barth Syndrom zuerst die diastolische Dysfunktion im Vordergrund steht, bevor sich eine systolische Insuffizienz ausprägt. Die Unterschiede zu den Ergebnissen der Studie an Stammzellen von Patienten mit Barth Syndrom sind derzeit ungeklärt, könnte jedoch auch in methodischen Unterschieden begründet sein. Die von uns verwendeten Herzmuskelzellen stammen aus einer lebenden Maus, während in der Studie mit den Stammzellen diese von Patienten aus Biopsien gewonnen wurden und im weiteren Verlauf in vitro zu annähernd adulten Kardiomyozyten differenziert wurden.⁴⁵ Insofern bleibt noch offen, inwieweit Stammzellen adulte Kardiomyozyten in ihrem Kontraktionsverhalten repräsentieren können.

Die Ursache der diastolischen Funktionsstörung der Tafazzin-defizienten Kardiomyozyten könnte unter anderem an einem gestörten Calcium-Handling liegen.¹⁰² In diesem Zusammenhang konnte unsere Arbeitsgruppe interessante weitere Daten generieren. So führte Dr. M. Kohlhaas Experimente an isolierten Kardiomyozyten mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik durch, die dazu dienten, sowohl den mitochondrialen als auch den cytosolischen Calcium-Gehalt zu bestimmen. Dabei zeigte sich ein fehlender Anstieg der mitochondrialen Calcium-Konzentration unter Arbeitslasterhöhung bei den Taz-defizienten Myozyten, wohingegen die Kontrollgruppe bei physiologischem Stress ihre systolische und diastolische Calcium-Konzentration deutlich erhöhen konnte (Abbildung 39A). Diese notwendige Anpassungsreaktion blieb bei den Kardiomyozyten mit *Taz*-Knockdown demzufolge aus. Auch in den Experimenten mit dem Farbstoff Indo-1 war dieses Phänomen zu beobachten, wobei hierbei lediglich die intrazelluläre Calcium-Konzentration gemessen werden konnte und somit eine Unterscheidung zwischen cytosolisch und mitochondrial nicht möglich war. Der Unterschied zwischen Taz-KD und WT Kardiomyozyten ergab sich hierbei durch das Ausbleiben einer adäquaten Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration in der Gruppe der Taz-KD Zellen während β -adrenerger Stimulation und Frequenzerhöhung und lag bei diesen Messungen sogar im Bereich eines Signifikanzniveaus von kleiner 0,0001

($p < 0,0001$). Abbildung 39B zeigt zudem, dass das Verhältnis zwischen mitochondrialem diastolischen Calcium und cytosolischem systolischem Calcium, welches einen guten Indikator für die mitochondriale Aufnahmeeffektivität darstellt, in den Myozyten mit Tafazzin-Defizienz signifikant erniedrigt ist. Dies beruht ebenfalls darauf, dass die Calcium-Konzentration im Gegensatz zur Kontrollgruppe über den gesamten Experimentverlauf hinweg stabil auf einem Niveau bleibt.

Weitere Experimente, die unter der Leitung von Dr. A. Nickel durchgeführt wurden, gehen sogar noch ein Stück weiter und zeigen, dass Mitochondrien der Tafazzin-defizienten Zellen fast gar kein Calcium aufnehmen (Abbildung 40). Die Messungen fanden an isolierten Mitochondrien statt, wobei im Abstand eines festen Zeitintervalles die Zugabe von 10 μM Calciumchlorid (CaCl_2) erfolgte und die extramitochondriale Calciumkonzentration durch die Zugabe eines Farbstoffes, der nicht in die Mitochondrien eindringen kann und somit nur Calcium außerhalb desselbigen detektieren kann, über den gesamten Experimentverlauf hinweg gemessen wurde. Bei den WT-Mitochondrien kam es dabei lediglich zu einem kurzen Calcium-Peak jedes Mal nach der Zugabe von CaCl_2 , was bedeutet, dass das Calcium unmittelbar in das Mitochondrium aufgenommen wurde und somit nicht mehr zu detektieren war. Der Graph der transgenen Mitochondrien lieferte dahingegen ein gänzlich anderes Bild. Nach jeder Calciumchlorid-Zugabe erreichte die Calcium-Konzentration ein neues Plateau, ohne wieder ein wenig, geschweige denn auf den Ausgangswert abzusinken. Dies bedeutet, dass außer zu Beginn des Experimentes keinerlei Calcium-Aufnahme in das Mitochondrium stattfand.

Die Frage, die sich stellt, ist, worin der Grund für diese fehlende, jedoch so notwendige Calcium-Aufnahme besteht. Laut unseren Experimenten mit dem Farbstoff TMRM liegt es nicht an einem zusammengebrochenen mitochondrialen Membranpotential, da dieses über den gesamten Experimentverlauf nahezu konstant geblieben ist. Somit bleibt als plausible Erklärung ein Defekt des mitochondrialen Calcium-Uniporters (MCU).

Tatsächlich konnten wir in von Dr. M. Hohl durchgeführten Protein-Analysen mittels Western-Blot zeigen, dass es in Tafazzin-defizienten Herzmuskelzellen zu einer Herabregulierung des MCU kommt (Abbildung 41). Dieser MCU Defekt beruht gegebenenfalls auf Veränderungen der MAMs, die in Tafazzin-defizienten Mäusen beobachtet werden konnten.²¹ So ist es möglich, dass die Umgestaltung eben dieser Mitochondrien-assoziierten Membranen zu einer verletzten Integrität des MCU führt, was letztendlich die Aufnahme von Calcium behindern würde. Eine weitere Möglichkeit, die diskutiert wird, liegt in der Integrität des Calcium-Uniporters an sich. Da der MCU ein Multi-Protein-Komplex ist, welcher sich aus mehreren porenbildenden und regulatorischen Untereinheiten zusammensetzt, hängt seine Funktion von dem Zusammenspiel der einzelnen beteiligten Proteine ab.¹⁰³ Bei einer gestörten Komplexbildung, wie sie möglicherweise durch aberrante Cardiolipinformen bedingt wird, könnte es zu einem verminderten Nachweis des MCU und somit zu einer gestörten beziehungsweise fehlenden Ca^{2+} -Aufnahme kommen.

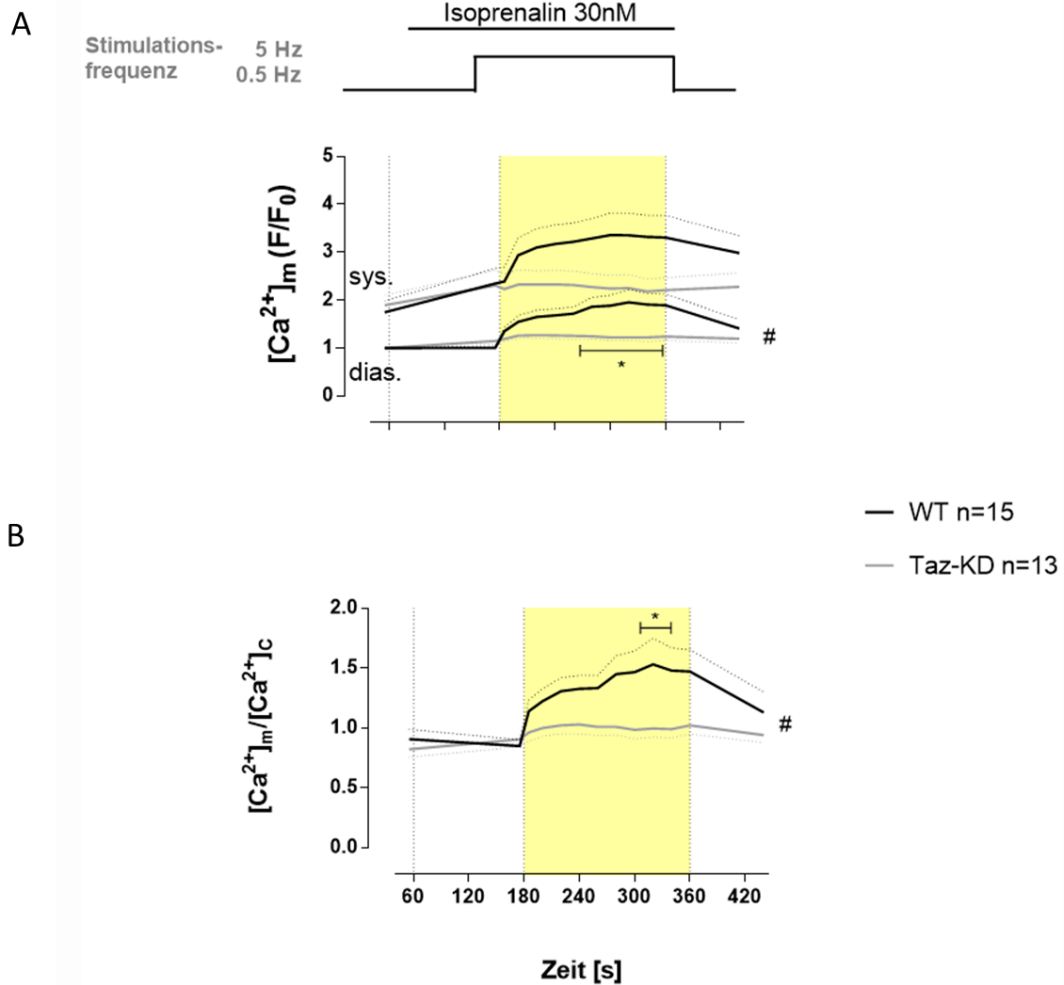


Abbildung 39: Calcium-Haushalt der WT (n=15) und Taz-KD (n=13) Kardiomyozyten im Experimentverlauf.

A, Mitochondriale Calciumkonzentration während der Systole und der Diastole, angegeben in Bezug auf die basale Calcium-Konzentration. B, Verhältnis des mitochondrialen diastolischen Calciums zu dem cytosolischen systolischen Calcium, als Indikator für die mitochondriale Calcium-Aufnahmeeffektivität. Dargestellt sind die Mittelwerte mit zugehörigem SEM. # = $p < 0.05$ in der two-way ANOVA, * = $p < 0.05$ bis $p < 0.01$ im Bonferroni Posttest. Daten von Kohlhaas, Nickel, Hohl & Maack, 2015

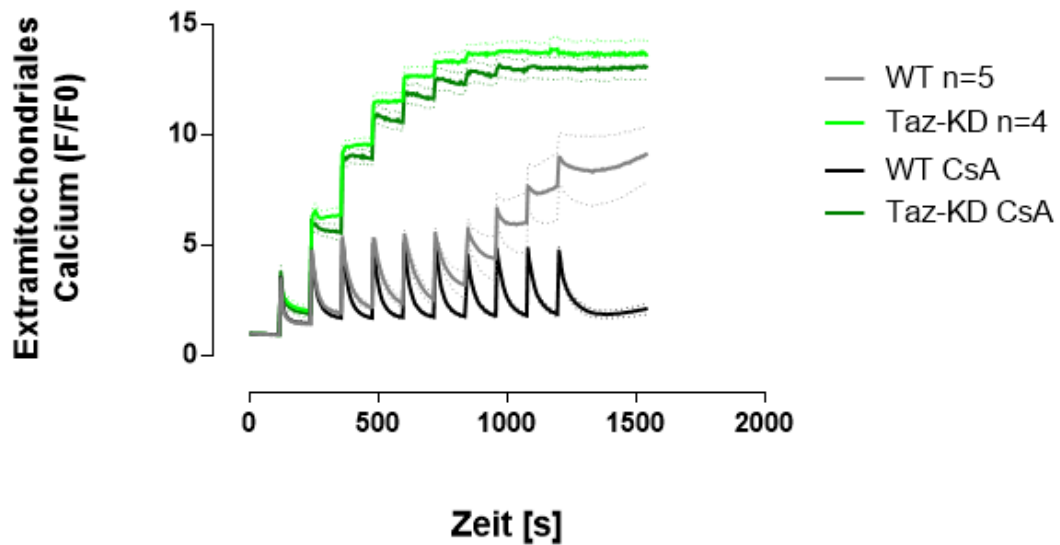


Abbildung 40: Calcium-Aufnahmekapazität der WT (n=5) und Taz-KD (n=4) Mitochondrien im Experimentverlauf.

Angabe des Messergebnisses in Bezug auf die basale Calcium-Konzentration. Unter dem Einfluss von Cyclosporin A (Cs A), als Inhibitor der Protein Tyrosin Phosphatase (PTP), wird mitochondriales Calcium nicht freigesetzt, folglich kein Anstieg des extramitochondrialen Calciums bei den WT-Mitochondrien. Gleiches Verhalten mit und ohne Cyclosporin A bei den Taz-KD Mitochondrien zeigt, dass ein mitochondrialer Aufnahmefekt vorliegt und das Problem nicht in einem mitochondrialen Leck begründet ist. Dargestellt sind die Mittelwerte mit zugehörigem SEM. Daten von Kohlhaas, Nickel, Hohl & Maack, 2015

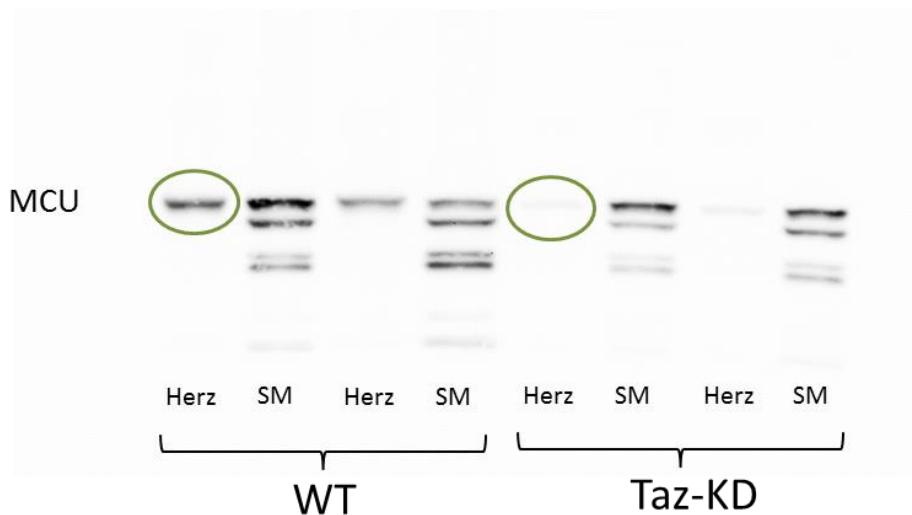


Abbildung 41: Protein-Analyse des MCU in Mitochondrien aus Herz- und Skelettmuskelzellen.

Graphische Darstellung der Expressionsrate des MCU (markiert) in Mitochondrien aus Herz- und Skelettmuskel (SM). Daten von Kohlhaas, Nickel, Hohl & Maack, 2015

5.2 Auswirkung der Tafazzin-Defizienz auf den Redoxstatus der Kardiomyozyten

In unseren Experimenten konnten wir signifikante Unterschiede zwischen den Tafazzin-defizienten Mäusen und den Tieren der Kontrollgruppe feststellen. So zeigten die transgenen Kardiomyozyten eine deutlich stärkere Oxidation, vor allem nach Anheben der Arbeitslast ($p < 0,01$). Es stellt sich die Frage, woher diese vermehrte Oxidation rührt.

Während einer physiologischen Arbeitsbelastung, bei uns simuliert durch die Zugabe des β -Adrenorezeptor-Agonisten Isoprenalin und das Anheben der Stimulationsfrequenz, fällt vermehrt ADP an, welches mit Hilfe der oxidativen Phosphorylierung in ATP umgewandelt werden muss. Dies bedeutet, dass NADH und FADH_2 mehr Elektronen an die Atmungskette liefern müssen, um die „Protonen-bewegende Kraft“ ($\Delta\mu\text{H}$) aufrechtzuerhalten. Letztendlich führt dies zu einer vermehrten Oxidation, die jedoch unter physiologischen Umständen dadurch kompensiert wird, dass mit Hilfe der β -adrenergen Stimulation die cytosolischen Ca^{2+} -Transienten erhöht werden und somit auch mehr Calcium in das Innere der Mitochondrien gelangt, welches dort durch das Aktivieren geschwindigkeitsbestimmender Enzyme des Citratzyklus die Regeneration von NAD^+ und FAD fördert.^{9, 69} Im Falle unserer Untersuchungen könnte die verminderte Regeneration der Reduktionsäquivalente in einer herabgesetzten Stimulation des Citratzyklus aufgrund der verminderten mitochondrialen Calciumaufnahme liegen. So könnte generell die Passage der inneren Mitochondrienmembran für Ca^{2+} erschwert sein, da Cardiolipin eine wichtige Rolle für die Membranfluidität und die osmotische Stabilität eben dieser Membran spielt.^{50, 51} Dies könnte unter anderem einen Defekt des MCU bedingen, sodass sich der Befund, den wir in den NADH/FAD- Experimenten erheben konnten, gut mit denen im vorherigen Abschnitt beschriebenen Entdeckungen unsererseits bezüglich Calcium-Handling und Herabregulation des MCU auf Proteinebene deckt. Zusätzlich zu dem Aspekt der allgemeinen Membranfluidität und der osmotischen Stabilität der IMM haben neue Experimente gezeigt, dass der

MCU ein Multi-Protein-Komplex ist, dessen Assemblierung möglicherweise durch aberrante Cardiolipinformen gestört wird. Durch die fehlende Integrität kommt es zu einem Funktionsverlust des Ca^{2+} -Transporters. Ein weiterer möglicher Grund für die gestörte Ca^{2+} -Aufnahme könnte in den vorbeschriebenen Veränderungen der Mitochondrien-assoziierten Membranen (MAMs) liegen. So ist bekannt, dass die MAMs, die vom SR gebildet werden und enorm wichtig für das Ca^{2+} -Handling sind, bei Tafazzin-defizienten Mäusen bereits im Alter von 2 Monaten Veränderungen im Sinne einer Erweiterung aufweisen.²¹ Gestützt wird diese Beobachtung durch die Experimente von Li et al.⁵⁸, die eine beeinträchtigte Expression des „Linker“-Proteins Mitofusin 2 (Mfn2) aufgrund eines pathologischen Cardiolipin-Remodeling feststellen konnten. Durch diesen Defekt kommt es zu einer Verkleinerung der Kontaktfläche zwischen SR und Mitochondrium und folglich zu einer gestörten Interaktion der beiden Organellen und einem erschwerten Calcium-Übertritt in das Mitochondrium.⁵⁸

Letztendlich führen sowohl der Ansatz über den MCU als auch über die MAMs zu einer geringeren Regeneration von NAD^+ und FAD und somit einem Verschieben des Redoxstatus hin zur Oxidation. Passend dazu konnte in Experimenten an pluripotenten Stammzellen ein geringerer Gehalt an ATP in den Tafazzin-defizienten Zellen festgestellt werden,⁴⁵ wofür der erhöhte Oxidationsgrad ein möglicher Grund sein könnte.

5.3 Auswirkung der Tafazzin-Defizienz auf die mitochondriale ROS-Produktion und die mitochondriale Atmung

Verschiedene Experimente an pluripotenten Stammzellen zeigten eine erhöhte ROS-Produktion, jeweils gemessen mit Hilfe fluoreszenz-basierter Farbstoffe.^{44, 45} In unseren Experimenten mit dem Farbstoff DCF stellten wir keine Unterschiede zwischen WT und Taz-KD Kardiomyozyten fest. Allerdings erwiesen sich die Messungen als schwierig, da wenige transgene Zellen das Messprotokoll bis zum Schluss durchhielten und sich somit das

Erstellen der Positivkontrolle am Ende einer jeden Messung problematisch gestaltete.

Für eine vermehrte Entstehung von ROS gibt es prinzipiell zwei Erklärungsmöglichkeiten. So könnte sie einerseits durch eine verminderte Calcium-abhängige antioxidative Kapazität oder andererseits durch eine gestörte Funktion der Atmungskette hervorgerufen werden.

Wie bereits zuvor erläutert, konnten wir feststellen, dass eine Tafazzin-Defizienz, vermutlich durch eine gestörte Calcium-Aufnahme in das Mitochondrium aufgrund der Herabregulation des MCU zu einer vermehrten Oxidation von NADH und FADH₂ führt. Ursächlich hierfür ist die reduzierte Ca²⁺-abhängige Aktivierung des Citratzyklus. Folgerichtig steht dem Mitochondrium weniger NADPH zur Verfügung (s. Abbildung 5), welches eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Enzyme spielt, welche für die Elimination von H₂O₂ benötigt werden. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die antioxidative Funktion des Mitochondriums von der Calcium-abhängigen Aktivierung des Citratzyklus abhängt, die im Falle des Barth-Syndroms, wie vorangehend beschrieben, eingeschränkt sein könnte. Möglicherweise spielen diese Prozesse erst zu einem späteren Zeitpunkt eine Rolle, da in unseren Experimenten kein Unterschied zwischen beiden Messgruppen erhoben werden konnte und sogar die DCF-Fluoreszenz in Taz-KD Kardiomyozyten nach der Zugabe von externem H₂O₂ weniger gesteigert wurde. Offenbar kommt es zunächst sogar zu einer Heraufregulation der antioxidativen Kapazität. So konnten weiterführende Experimente unserer Arbeitsgruppe eine vermehrte Expression von Katalase und Gluthation-Peroxidase, beides Enzyme, die der Elimination von H₂O₂ dienen,^{69, 104} nachweisen. Diese erhöhte antioxidative Kapazität konnte nur in einem Alter von 10 Wochen nachgewiesen werden. Mäuse, die bereits ein Alter von 20 oder 50 Wochen erreicht hatten, verfügten nicht mehr über eine höhere Expression der genannten Enzyme. Dies würde auch zu den von Acehan et al.²¹ erhobenen echokardiographischen Befunden passen, dass sich eine Herzinsuffizienz erst später ausbildet. Die Superoxiddismutase

wandelt $\cdot\text{O}_2^-$ zügig in H_2O_2 um und wurde in Taz-KD weder über- noch unterexprimiert nachgewiesen. Dies erklärt, warum wir bei unseren Experimenten mit Hilfe des Farbstoffes MitoSOX keine Tendenz zur vermehrten ROS-Produktion feststellen konnten. Zusätzlich bleibt zu sagen, dass die Kardiomyozyten beider Gruppen den Farbstoff sehr schlecht vertragen haben, in dem Sinne, dass die Zellausbeute im Allgemeinen sehr reduziert war und die Kardiomyozyten scheinbar so angegriffen waren, dass sie verstärkt zu Arrhythmien neigten. Dies erschwerte nicht nur die Messungen an sich, sondern auch die Auswertung der Messergebnisse. Wang et al.⁴⁵ nutzten für ihre ROS-Experimente ebenfalls den Farbstoff MitoSOX. Hier stellt sich die Frage, warum der Farbstoff für diese Zellen deutlich verträglicher zu sein schien. Zum einen könnte es daran liegen, dass sie in ihren Experimenten Stammzellen untersucht haben und keine murinen Kardiomyozyten, wobei naheliegend ist, dass sie sich in ihren Eigenschaften unterscheiden. Zum anderen könnte in unserem Fall das Futter der Mäuse, welches mit Doxycyclin versetzt ist, um den Knockdown zu induzieren, eine Rolle spielen. Dafür spricht, dass sowohl die transgenen als auch die nicht transgenen Zellen betroffen waren.

Eine geringere Funktionalität der Atmungskette lässt sich durch eine gestörte Assemblierung der Atmungsketten-Komplexe zu Superkomplexen begründen. So stellten Dudek et al.⁴⁴ eine geringere Zahl oder sogar ein komplettes Fehlen von Superkomplexen in Tafazzin-defizienten Stammzellen fest. Superkomplexe sind jedoch für die effiziente Übertragung der Elektronen an der Atmungskette enorm wichtig, so dass es bei einem nicht Vorhandensein eben dieser zu einem Elektronen-Leck kommt, was schließlich in eine vermehrte Produktion von ROS mündet.⁴⁴ Schlussendlich führt die insuffiziente Elektronenübertragung auch zu einer verminderten mitochondrialen Atmung. Dies konnten wir mit Hilfe von Atmungsmessungen (allerdings erst nach Erhöhen der Zahl der Experimente jenseits meiner eigenen Arbeit) bestätigen. So stellten wir bei den Taz-KD Mitochondrien am Ende (nicht jedoch nach den ersten Experimenten, wie hier gezeigt) eine verminderte Atmung unter dem Einfluss von ADP fest, was bedeuten könnte,

dass die Elektronen-Transportkapazität vor allem unter Stimulation eingeschränkt ist. Die Anpassung an physiologischen Stress ist in Taz-KD Mitochondrien somit deutlich herabgesetzt. Wang et al. konnten ebenfalls eine stark eingeschränkte respiratorische Kapazität feststellen.⁴⁵ Das Ergebnis einer geringeren mitochondrialen Atmung ist letztendlich eine verminderte ATP-Produktion, die wie bereits zuvor erwähnt, in den Messungen von Wang et al. gezeigt werden konnte.⁴⁵ Insgesamt betrachtet führt die Tafazzin-Defizienz demnach nicht nur zu einem geringeren Angebot an Elektronen durch eine verminderte Regeneration der Reduktionsäquivalente, sondern auch zu einer schlechteren Verwertung der zur Verfügung stehenden Elektronen durch eine gestörte Superkomplex-Assemblierung.

Der Erklärungsansatz über die Herabregulation des MCU wird durch unsere Experimente an isolierten Mitochondrien untermauert. So konnten wir in unseren Experimenten zur NADPH-Pool-Bestimmung, vorbehaltlich einer sehr geringen n-Zahl, keine signifikanten Unterschiede zwischen transgenen und nicht-transgenen Mitochondrien feststellen. Des Weiteren zeigte sich weder eine vermehrte Superoxid- noch eine gesteigerte H₂O₂-Produktion der Taz-KD Mitochondrien. Dies bedeutet, dass die Unterschiede im Redoxstatus nur dann auftreten, wenn die Mitochondrien in den Kontext der Zellen integriert sind und dort die aufgrund eines Defektes des MCU fehlende Ca²⁺-Aufnahme während beta-adrenerger Stimulation den Redox Shift einleitet.

5.4 Der Effekt von SS31 auf die Kontraktilität und den Redoxstatus Tafazzin-defizienter Kardiomyozyten

Cardiolipin und Cytochrom C gehen eine enge Verbindung miteinander ein, die einem sensiblen Gleichgewicht unterliegt. Je nach dem, in welcher Form sie miteinander interagieren, liegt Cytochrom C entweder als Peroxidase oder als Elektronentransporter vor. Als Peroxidase greift es Cardiolipin an und oxidiert es somit. Dies führt zu erheblichen Schäden, die zum einen die

Cristae-Struktur betreffen und zum anderen dazu führen, dass Cytochrom C aus der inneren Mitochondrienmembran entlassen wird. Durch die geringere Krümmung der Cristae-Struktur kommt es zu einem Auseinandergleiten der Superkomplexe und somit zu einer ineffizient ablaufenden Elektronenübertragung an der Atmungskette, sowie zu einem Elektronenleck, das letztendlich die vermehrte Produktion von ROS hervorruft. Das Peptid SS31 vermag diese Schäden zu verhindern, indem es selektiv an Cardiolipin bindet und bei der Interaktion dessen mit Cytochrom C die Elektronentransportfunktion favorisiert.²³

Dieser Effekt war bis jetzt durch in-vitro und an isolierten Mitochondrien durchgeführten Experimenten bestätigt worden.^{23, 47} Inwieweit sich der Effekt ebenfalls an isolierten Kardiomyozyten feststellen lässt, analysierten wir durch die Inkubation der zu untersuchenden Zellen mit SS31. Die Behandlung der Tafazzin-defizienten Myozyten verbesserte deren systolische Funktion, vor allem in Bezug auf ihre Verkürzungszeit. Diese war im Vergleich zur Kontrollgruppe, die in diesem Fall aus transgenen Kardiomyozyten ohne SS31-Zugabe bestand, signifikant verringert ($p < 0,01$). Dieser Effekt könnte möglicherweise das Ergebnis einer verbesserten ATP-Bereitstellung sein, die durch das effizientere Ablauen der Elektronenübertragung an der Atmungskette und somit einer gesteigerten oxidativen Phosphorylierung zu erklären wäre. Eine weitere Erklärung für die verbesserte Kontraktilität könnte die verminderte Produktion von ROS liefern. So ist bekannt, dass reaktive Sauerstoffspezies die Aktivität der SERCA inhibieren und somit die kontraktile Funktion beeinträchtigen.⁹¹ Möglicherweise kann SS31 dies durch Stabilisierung der Cristae-Region und somit dem Abwenden eines Elektronenleckes verhindern. Es stellt sich allerdings die Frage, ob dieser Effekt nach der akuten Behandlung der Kardiomyozyten mit SS31 eine derart große Rolle spielt, da in Bezug auf den Redoxstatus keine wesentlichen Unterschiede zwischen beiden Gruppen auszumachen waren. Dies könnte den Schluss zulassen, dass in der Akutphase nach der Anwendung von SS31 vielmehr die Bereitstellung an ATP, als der ROS-abhängige Effekt im Vordergrund steht.

Auch in den nicht-transgenen Kardiomyozyten sind Unterschiede zwischen den Proben mit und ohne SS31 aufgefallen. So zeigten sich die Zellen mit SS31-Behandlung deutlich verbessert in ihrer diastolischen Funktion, insbesondere benötigen sie weniger Zeit, um sich auf 50 % der Ausgangslänge zu relaxieren. Dies könnte damit in Zusammenhang stehen, dass Cardiolipin nicht nur aufgrund des Barth Syndroms, sondern auch im Zuge einer erhöhten ROS-Produktion Veränderungen erfährt. Da diese selbst unter physiologischen Bedingungen in geringem Maße existiert, scheint es, als ob SS31 auch auf die Wildtyp-Kardiomyozyten einen positiven Einfluss hat.

Bei der Beurteilung dieser Experimentreihe ist jedoch der Einfluss der Umgebungsumstände zu bedenken, da die Untersuchungen mit und ohne SS31 nicht an derselben Zellpopulation durchgeführt worden sind. So kann die unterschiedliche Qualität der Isolation an verschiedenen Messtagen eine mögliche Fehlerquelle darstellen.

5.5 Ausblick

Um die Pathophysiologie des Barth Syndroms sowie die Tafazzin-Defizienz an sich noch genauer zu untersuchen, könnte man die Experimente in gewissen Punkten variieren beziehungsweise vertiefen. Zum Zeitpunkt unserer Messungen waren die Mäuse ungefähr zwei Monate alt. Ein Versuch wäre es nun, die Kontraktilitätsmessungen zu einem späteren Termin, sprich einem fortgeschrittenem Stadium der Herzinsuffizienz, durchzuführen. Acht Monate, wie bei Acehan et al.²¹ sind bei unserem Experimentansatz sicherlich keine Option, jedoch könnte man versuchen das Alter der Mäuse auf 4 Monate festzulegen. Interessant wäre es zu beobachten, ob sich bis dahin, im Gegensatz zu unseren Ergebnissen, eine systolische Dysfunktion ausgebildet hat oder weiterhin die diastolische Dysfunktion im Vordergrund steht. Des Weiteren sollte über die Möglichkeit nachgedacht werden, das Messprotokoll der H₂O₂-Experimente mit dem Farbstoff DCF abzukürzen, um ein Versterben der Zelle vor dem Ausführen der Positivkontrolle zu

verhindern. Dies könnte einen Weg hin zu validen Daten bezüglich der ROS-Produktion darstellen. Zudem sollten auch hier Experimente an älteren Mäusen durchgeführt werden, um zu untersuchen, ob ggf. eine vermehrte ROS-Produktion erst später auftritt. Das größte Potential steckt mit Sicherheit in der Erweiterung der Untersuchungen hinsichtlich SS31, da Cardiolipin dessen Zielstruktur darstellt und somit die Versuchsgruppen durch die Tafazzin-Defizienz einwandfrei definiert sind. Vorstellbar wäre es, die Mäuse diesbezüglich einer Langzeitbehandlung mit dem Peptid bereits *in vivo* auszusetzen und daraufhin weiterführende Experimente durchzuführen. In erster Linie sollten diese der Ermittlung von ROS und der Funktionalität der Atmungskette dienen, da SS31 durch seine Cardiolipin-stabilisierende Wirkung diese pathophysiologischen Mechanismen der Herzinsuffizienz zu beeinflussen scheint. Zudem wären Untersuchungen interessant, in wieweit Cardiolipin die Integrität des MCU beeinflusst und ob SS31 auch in dieser Hinsicht positive Wirkung auf die aberranten Cardiolipin-Formen entfalten kann, sodass die Herabregulation des MCU auf Proteinebene verringert wird.

6 Literaturverzeichnis

1. Wynne J and Braunwald E. *Harrisons Innere Medizin*. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag; 2009¹⁷.
2. Mann DL, Vollert JO, Möckel M and Dietz R. *Harrisons Innere Medizin*. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag; 2009¹⁷.
3. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, Falk V, Gonzalez-Juanatey JR, Harjola VP, Jankowska EA, Jessup M, Linde C, Nihoyannopoulos P, Parissis JT, Pieske B, Riley JP, Rosano GMC, Ruilope LM, Ruschitzka F, Rutten FH and van der Meer P. 2016 ESC Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2016;69:1167.
4. Reddy YN and Borlaug BA. Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Curr Probl Cardiol*. 2016;41:145-88.
5. Watkins H, Ashrafian H and Redwood C. Inherited cardiomyopathies. *The New England journal of medicine*. 2011;364:1643-56.
6. Kumar S, Stevenson WG and John RM. Arrhythmias in Dilated Cardiomyopathy. *Cardiac electrophysiology clinics*. 2015;7:221-233.
7. McNally EM, Golbus JR and Puckelwartz MJ. Genetic mutations and mechanisms in dilated cardiomyopathy. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123:19-26.
8. Finsterer J and Kothari S. Cardiac manifestations of primary mitochondrial disorders. *International journal of cardiology*. 2014;177:754-63.
9. Maack C and O'Rourke B. Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics. *Basic research in cardiology*. 2007;102:369-92.
10. Harris DA and Das AM. Control of mitochondrial ATP synthesis in the heart. *The Biochemical journal*. 1991;280 (Pt 3):561-73.
11. Mootha VK, Arai AE and Balaban RS. Maximum oxidative phosphorylation capacity of the mammalian heart. *The American journal of physiology*. 1997;272:H769-75.
12. Balaban RS. Cardiac energy metabolism homeostasis: role of cytosolic calcium. *J Mol Cell Cardiol*. 2002;34:1259-71.
13. Barth PG, Scholte HR, Berden JA, Van der Klei-Van Moorsel JM, Luyt-Houwen IE, Van 't Veer-Korthof ET, Van der Harten JJ and Sobotka-Plojhar MA. An X-linked mitochondrial disease affecting cardiac muscle, skeletal muscle and neutrophil leucocytes. *Journal of the neurological sciences*. 1983;62:327-55.
14. Clarke SL, Bowron A, Gonzalez IL, Groves SJ, Newbury-Ecob R, Clayton N, Martin RP, Tsai-Goodman B, Garratt V, Ashworth M, Bowen VM, McCurdy KR, Damin MK, Spencer CT, Toth MJ, Kelley RI and Steward CG. Barth syndrome. *Orphanet journal of rare diseases*. 2013;8:23.
15. Vreken P, Valianpour F, Nijtmans LG, Grivell LA, Plecko B, Wanders RJ and Barth PG. Defective remodeling of cardiolipin and phosphatidylglycerol in Barth syndrome. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000;279:378-82.
16. Website BSF. <https://www.barthsyndrome.org>. 2015, kürzlich befragt.
17. Roberts AE, Nixon C, Steward CG, Gauvreau K, Maisenbacher M, Fletcher M, Geva J, Byrne BJ and Spencer CT. The Barth Syndrome Registry: distinguishing disease characteristics and growth data from a

- longitudinal study. *American journal of medical genetics Part A*. 2012;158A:2726-32.
18. Bione S, D'Adamo P, Maestrini E, Gedeon AK, Bolhuis PA and Toniolo D. A novel X-linked gene, G4.5. is responsible for Barth syndrome. *Nature genetics*. 1996;12:385-9.
 19. Foundation HTGVDotBS. <https://www.barthsyndrome.org/CMFiles/ScienceResearch/TAZ/HumanTAZGeneVariantsMarch282015LS.xls>. 2015.
 20. Xu Y, Malhotra A, Ren M and Schlame M. The enzymatic function of tafazzin. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281:39217-24.
 21. Acehan D, Vaz F, Houtkooper RH, James J, Moore V, Tokunaga C, Kulik W, Wansapura J, Toth MJ, Strauss A and Khuchua Z. Cardiac and skeletal muscle defects in a mouse model of human Barth syndrome. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286:899-908.
 22. Claypool SM, Whited K, Srijumnong S, Han X and Koehler CM. Barth syndrome mutations that cause tafazzin complex lability. *The Journal of cell biology*. 2011;192:447-62.
 23. Szeto HH. First-in-class cardiolipin-protective compound as a therapeutic agent to restore mitochondrial bioenergetics. *British journal of pharmacology*. 2014;171:2029-50.
 24. Ades LC, Gedeon AK, Wilson MJ, Latham M, Partington MW, Mulley JC, Nelson J, Lui K and Sillence DO. Barth syndrome: clinical features and confirmation of gene localisation to distal Xq28. *American journal of medical genetics*. 1993;45:327-34.
 25. Brady AN, Shehata BM and Fernhoff PM. X-linked fetal cardiomyopathy caused by a novel mutation in the TAZ gene. *Prenatal diagnosis*. 2006;26:462-5.
 26. Spencer CT, Bryant RM, Day J, Gonzalez IL, Colan SD, Thompson WR, Berthry J, Redfearn SP and Byrne BJ. Cardiac and clinical phenotype in Barth syndrome. *Pediatrics*. 2006;118:e337-46.
 27. Barth PG, Valianpour F, Bowen VM, Lam J, Duran M, Vaz FM and Wanders RJ. X-linked cardioskeletal myopathy and neutropenia (Barth syndrome): an update. *American journal of medical genetics Part A*. 2004;126A:349-54.
 28. Barth PG, Wanders RJ and Vreken P. X-linked cardioskeletal myopathy and neutropenia (Barth syndrome)-MIM 302060. *The Journal of pediatrics*. 1999;135:273-6.
 29. Kelley RI, Cheatham JP, Clark BJ, Nigro MA, Powell BR, Sherwood GW, Sladky JT and Swisher WP. X-linked dilated cardiomyopathy with neutropenia, growth retardation, and 3-methylglutaconic aciduria. *The Journal of pediatrics*. 1991;119:738-47.
 30. Cantlay AM, Shokrollahi K, Allen JT, Lunt PW, Newbury-Ecob RA and Steward CG. Genetic analysis of the G4.5 gene in families with suspected Barth syndrome. *The Journal of pediatrics*. 1999;135:311-5.
 31. Schmidt MR, Birkebaek N, Gonzalez I and Sunde L. Barth syndrome without 3-methylglutaconic aciduria. *Acta paediatrica*. 2004;93:419-21.
 32. Donati MA, Malvagia S, Pasquini E, Morrone A, La Marca G, Garavaglia B, Toniolo D and Zammarchi E. Barth syndrome presenting with acute metabolic decompensation in the neonatal period. *Journal of inherited metabolic disease*. 2006;29:684.

33. Hastings R, Steward C, Tsai-Goodman B and Newbury-Ecob R. Dymorphology of Barth syndrome. *Clinical dysmorphology*. 2009;18:185-7.
34. Bowron A, Frost R, Powers VE, Thomas PH, Heales SJ and Steward CG. Diagnosis of Barth syndrome using a novel LC-MS/MS method for leukocyte cardiolipin analysis. *Journal of inherited metabolic disease*. 2013;36:741-6.
35. Herzinsuffizienz EPG. http://leitlinien.dgk.org/files/2013_Pocket-Leitlinien_Herzinsuffizienz_Update_2012_Internet.pdf. 2012.
36. Mangat J, Lunnon-Wood T, Rees P, Elliott M and Burch M. Successful cardiac transplantation in Barth syndrome--single-centre experience of four patients. *Pediatric transplantation*. 2007;11:327-31.
37. Dedieu N, Giardini A, Steward CG, Fenton M, Karimova A, Hsia TY and Burch M. Successful mechanical circulatory support for 251 days in a child with intermittent severe neutropenia due to Barth syndrome. *Pediatric transplantation*. 2013;17:E46-9.
38. Huhta JC, Pomerance HH and Barness EG. Clinicopathologic conference: Barth Syndrome. *Fetal and pediatric pathology*. 2005;24:239-54.
39. Mileykovskaya E, Zhang M and Dowhan W. Cardiolipin in energy transducing membranes. *Biochemistry Biokhimiia*. 2005;70:154-8.
40. Acehan D, Khuchua Z, Houtkooper RH, Malhotra A, Kaufman J, Vaz FM, Ren M, Rockman HA, Stokes DL and Schlame M. Distinct effects of tafazzin deletion in differentiated and undifferentiated mitochondria. *Mitochondrion*. 2009;9:86-95.
41. Kiebish MA, Han X, Cheng H, Chuang JH and Seyfried TN. Cardiolipin and electron transport chain abnormalities in mouse brain tumor mitochondria: lipidomic evidence supporting the Warburg theory of cancer. *Journal of lipid research*. 2008;49:2545-56.
42. Brandner K, Mick DU, Frazier AE, Taylor RD, Meisinger C and Rehling P. Taz1, an outer mitochondrial membrane protein, affects stability and assembly of inner membrane protein complexes: implications for Barth Syndrome. *Molecular biology of the cell*. 2005;16:5202-14.
43. Zhang M, Mileykovskaya E and Dowhan W. Cardiolipin is essential for organization of complexes III and IV into a supercomplex in intact yeast mitochondria. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280:29403-8.
44. Dudek J, Cheng IF, Balleininger M, Vaz FM, Streckfuss-Bomeke K, Hubscher D, Vukotic M, Wanders RJ, Rehling P and Guan K. Cardiolipin deficiency affects respiratory chain function and organization in an induced pluripotent stem cell model of Barth syndrome. *Stem cell research*. 2013;11:806-19.
45. Wang G, McCain ML, Yang L, He A, Pasqualini FS, Agarwal A, Yuan H, Jiang D, Zhang D, Zangi L, Geva J, Roberts AE, Ma Q, Ding J, Chen J, Wang DZ, Li K, Wang J, Wanders RJ, Kulik W, Vaz FM, Laflamme MA, Murry CE, Chien KR, Kelley RI, Church GM, Parker KK and Pu WT. Modeling the mitochondrial cardiomyopathy of Barth syndrome with induced pluripotent stem cell and heart-on-chip technologies. *Nature medicine*. 2014;20:616-23.
46. Paradies G, Petrosillo G, Paradies V and Ruggiero FM. Mitochondrial dysfunction in brain aging: role of oxidative stress and cardiolipin. *Neurochemistry international*. 2011;58:447-57.

47. Birk AV, Liu S, Soong Y, Mills W, Singh P, Warren JD, Seshan SV, Pardee JD and Szeto HH. The mitochondrial-targeted compound SS-31 re-energizes ischemic mitochondria by interacting with cardiolipin. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2013;24:1250-61.
48. Zhao K, Zhao GM, Wu D, Soong Y, Birk AV, Schiller PW and Szeto HH. Cell-permeable peptide antioxidants targeted to inner mitochondrial membrane inhibit mitochondrial swelling, oxidative cell death, and reperfusion injury. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279:34682-90.
49. Birk AV, Chao WM, Bracken C, Warren JD and Szeto HH. Targeting mitochondrial cardiolipin and the cytochrome c/cardiolipin complex to promote electron transport and optimize mitochondrial ATP synthesis. *British journal of pharmacology*. 2014;171:2017-28.
50. Schlame M, Rua D and Greenberg ML. The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Progress in lipid research*. 2000;39:257-88.
51. Koshkin V and Greenberg ML. Cardiolipin prevents rate-dependent uncoupling and provides osmotic stability in yeast mitochondria. *The Biochemical journal*. 2002;364:317-22.
52. Jiang F, Ryan MT, Schlame M, Zhao M, Gu Z, Klingenberg M, Pfanner N and Greenberg ML. Absence of cardiolipin in the crd1 null mutant results in decreased mitochondrial membrane potential and reduced mitochondrial function. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275:22387-94.
53. Haines TH and Dencher NA. Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation. *FEBS letters*. 2002;528:35-9.
54. Gebert N, Joshi AS, Kutik S, Becker T, McKenzie M, Guan XL, Mooga VP, Stroud DA, Kulkarni G, Wenk MR, Rehling P, Meisinger C, Ryan MT, Wiedemann N, Greenberg ML and Pfanner N. Mitochondrial cardiolipin involved in outer-membrane protein biogenesis: implications for Barth syndrome. *Current biology : CB*. 2009;19:2133-9.
55. Bissler JJ, Tsoras M, Goring HH, Hug P, Chuck G, Tombragel E, McGraw C, Schlotman J, Ralston MA and Hug G. Infantile dilated X-linked cardiomyopathy, G4.5 mutations, altered lipids, and ultrastructural malformations of mitochondria in heart, liver, and skeletal muscle. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2002;82:335-44.
56. Chen Y, Csordas G, Jowdy C, Schneider TG, Csordas N, Wang W, Liu Y, Kohlhaas M, Meiser M, Bergem S, Nerbonne JM, Dorn GW, 2nd and Maack C. Mitofusin 2-containing mitochondrial-reticular microdomains direct rapid cardiomyocyte bioenergetic responses via interorganelle Ca(2+) crosstalk. *Circulation research*. 2012;111:863-75.
57. de Brito OM and Scorrano L. Mitofusin-2 regulates mitochondrial and endoplasmic reticulum morphology and tethering: the role of Ras. *Mitochondrion*. 2009;9:222-6.
58. Li J, Liu X, Wang H, Zhang W, Chan DC and Shi Y. Lysocardiolipin acyltransferase 1 (ALCAT1) controls mitochondrial DNA fidelity and biogenesis through modulation of MFN2 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109:6975-80.
59. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002;415:198-205.

60. Schmitt N, Grunnet M and Olesen SP. Cardiac potassium channel subtypes: new roles in repolarization and arrhythmia. *Physiol Rev.* 2014;94:609-53.
61. Bers DM. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annual review of physiology.* 2008;70:23-49.
62. Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *The American journal of physiology.* 1983;245:C1-14.
63. Rizzuto R and Pozzan T. Microdomains of intracellular Ca^{2+} : molecular determinants and functional consequences. *Physiological reviews.* 2006;86:369-408.
64. Bers DM. Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. *Physiology.* 2006;21:380-7.
65. Gunter TE and Sheu SS. Characteristics and possible functions of mitochondrial Ca^{2+} transport mechanisms. *Biochimica et biophysica acta.* 2009;1787:1291-308.
66. Barth E, Stammeler G, Speiser B and Schaper J. Ultrastructural quantitation of mitochondria and myofilaments in cardiac muscle from 10 different animal species including man. *Journal of molecular and cellular cardiology.* 1992;24:669-81.
67. Stanley WC, Recchia FA and Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiological reviews.* 2005;85:1093-129.
68. Murphy E and Steenbergen C. Preconditioning: the mitochondrial connection. *Annual review of physiology.* 2007;69:51-67.
69. Kohlhaas M and Maack C. Calcium release microdomains and mitochondria. *Cardiovascular research.* 2013;98:259-68.
70. J OU, Pan S and Sheu SS. Perspectives on: SGP symposium on mitochondrial physiology and medicine: molecular identities of mitochondrial Ca^{2+} influx mechanism: updated passwords for accessing mitochondrial Ca^{2+} -linked health and disease. *The Journal of general physiology.* 2012;139:435-43.
71. Foscett JK and Philipson B. The mitochondrial Ca^{2+} uniporter complex. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;78:3-8.
72. Brandes R and Bers DM. Simultaneous measurements of mitochondrial NADH and Ca^{2+} during increased work in intact rat heart trabeculae. *Biophysical journal.* 2002;83:587-604.
73. Territo PR, Mootha VK, French SA and Balaban RS. Ca^{2+} activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: role of the $\text{F}(0)/\text{F}(1)$ -ATPase. *American journal of physiology Cell physiology.* 2000;278:C423-35.
74. Kirichok Y, Krapivinsky G and Clapham DE. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature.* 2004;427:360-4.
75. Kohlhaas M, Liu T, Knopp A, Zeller T, Ong MF, Bohm M, O'Rourke B and Maack C. Elevated cytosolic Na^{+} increases mitochondrial formation of reactive oxygen species in failing cardiac myocytes. *Circulation.* 2010;121:1606-13.
76. Maack C, Cortassa S, Aon MA, Ganesan AN, Liu T and O'Rourke B. Elevated cytosolic Na^{+} decreases mitochondrial Ca^{2+} uptake during excitation-contraction coupling and impairs energetic adaptation in cardiac myocytes. *Circulation research.* 2006;99:172-82.

77. Palty R, Silverman WF, Hershfinkel M, Caporale T, Sensi SL, Parnis J, Nolte C, Fishman D, Shoshan-Barmatz V, Herrmann S, Khananshvili D and Sekler I. NCLX is an essential component of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107:436-41.
78. Balaban RS, Nemoto S and Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*. 2005;120:483-95.
79. Ying W. NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. *Antioxidants & redox signaling*. 2008;10:179-206.
80. Kohlhaas M and Maack C. Interplay of defective excitation-contraction coupling, energy starvation, and oxidative stress in heart failure. *Trends in cardiovascular medicine*. 2011;21:69-73.
81. Hasenfuss G and Pieske B. Calcium cycling in congestive heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2002;34:951-69.
82. Lyon AR, MacLeod KT, Zhang Y, Garcia E, Kanda GK, Lab MJ, Korchev YE, Harding SE and Gorelik J. Loss of T-tubules and other changes to surface topography in ventricular myocytes from failing human and rat heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106:6854-9.
83. Song LS, Guatimosim S, Gomez-Viquez L, Sobie EA, Ziman A, Hartmann H and Lederer WJ. Calcium biology of the transverse tubules in heart. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005;1047:99-111.
84. Despa S, Islam MA, Weber CR, Pogwizd SM and Bers DM. Intracellular Na⁺ concentration is elevated in heart failure but Na/K pump function is unchanged. *Circulation*. 2002;105:2543-8.
85. Baartscheer A, Schumacher CA, Belterman CN, Coronel R and Fiolet JW. [Na⁺]_i and the driving force of the Na⁺/Ca²⁺-exchanger in heart failure. *Cardiovascular research*. 2003;57:986-95.
86. Kohlhaas M and Maack C. Adverse bioenergetic consequences of Na⁺-Ca²⁺ exchanger-mediated Ca²⁺ influx in cardiac myocytes. *Circulation*. 2010;122:2273-80.
87. Lin L, Sharma VK and Sheu SS. Mechanisms of reduced mitochondrial Ca²⁺ accumulation in failing hamster heart. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*. 2007;454:395-402.
88. Liu T, Takimoto E, Dimaano VL, DeMazumder D, Kettlewell S, Smith G, Sidor A, Abraham TP and O'Rourke B. Inhibiting mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange prevents sudden death in a Guinea pig model of heart failure. *Circulation research*. 2014;115:44-54.
89. Dai DF and Rabinovitch P. Mitochondrial oxidative stress mediates induction of autophagy and hypertrophy in angiotensin-II treated mouse hearts. *Autophagy*. 2011;7:917-8.
90. Erickson JR, Joiner ML, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis CV, Bartlett RK, Lowe JS, O'Donnell SE, Aykin-Burns N, Zimmerman MC, Zimmerman K, Ham AJ, Weiss RM, Spitz DR, Shea MA, Colbran RJ, Mohler PJ and Anderson ME. A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell*. 2008;133:462-74.
91. Flesch M, Maack C, Cremers B, Baumer AT, Sudkamp M and Böhm M. Effect of beta-blockers on free radical-induced cardiac contractile dysfunction. *Circulation*. 1999;100:346-53.

92. Zeitz O, Maass AE, Van Nguyen P, Hensmann G, Kogler H, Moller K, Hasenfuss G and Janssen PM. Hydroxyl radical-induced acute diastolic dysfunction is due to calcium overload via reverse-mode Na(+)-Ca(2+) exchange. *Circulation research*. 2002;90:988-95.
93. Zorov DB, Filburn CR, Klotz LO, Zweier JL and Sollott SJ. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *The Journal of experimental medicine*. 2000;192:1001-14.
94. Akar FG, Aon MA, Tomaselli GF and O'Rourke B. The mitochondrial origin of postischemic arrhythmias. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115:3527-35.
95. Maack C and Bohm M. Targeting mitochondrial oxidative stress in heart failure throttling the afterburner. *Journal of the American College of Cardiology*. 2011;58:83-6.
96. Nakamura R, Egashira K, Machida Y, Hayashidani S, Takeya M, Utsumi H, Tsutsui H and Takeshita A. Probucol attenuates left ventricular dysfunction and remodeling in tachycardia-induced heart failure: roles of oxidative stress and inflammation. *Circulation*. 2002;106:362-7.
97. Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115:500-8.
98. Soustek MS, Falk DJ, Mah CS, Toth MJ, Schlame M, Lewin AS and Byrne BJ. Characterization of a transgenic short hairpin RNA-induced murine model of Tafazzin deficiency. *Human gene therapy*. 2011;22:865-71.
99. Technologies L. The Molecular Probes Handbook. <http://www.lifetechnologies.com/de/de/home/references/molecular-probes-the-handbook/probes-for-reactive-oxygen-species-including-nitric-oxide/generating-and-detecting-reactive-oxygen-species.html>.
100. Kitzman DW, Higginbotham MB, Cobb FR, Sheikh KH and Sullivan MJ. Exercise intolerance in patients with heart failure and preserved left ventricular systolic function: failure of the Frank-Starling mechanism. *Journal of the American College of Cardiology*. 1991;17:1065-72.
101. Aziz F, Tk LA, Enweluzo C, Dutta S and Zaeem M. Diastolic heart failure: a concise review. *Journal of clinical medicine research*. 2013;5:327-34.
102. Kass DA, Bronzwaer JGF and Paulus WJ. What Mechanisms Underlie Diastolic Dysfunction in Heart Failure? *Circulation research*. 2004;94:1533-1542.
103. Bertero E and Maack C. Calcium Signaling and Reactive Oxygen Species in Mitochondria. *Circulation research*. 2018;122:1460-1478.
104. Chelikani P, Fita I and Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61:192-208.

7 Danksagung

Zunächst einmal möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. C. Maack für die Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit und die hervorragende Betreuung danken. Er verstand es von Beginn an, Begeisterung für wissenschaftliches Arbeiten im Allgemeinen und für die kardiologische Grundlagenforschung im Speziellen zu wecken.

Des Weiteren möchte ich Dr. rer. nat. M. Kohlhaas für die Einarbeitung in die Methodik der Ionoptix-Anlage und der Auswertungsprogramme danken. Ihm und Dr. rer. nat. A. Nickel danke ich zudem für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung während der Durchführung der Experimente und dem Erstellen der Dissertationsschrift.

Danken möchte ich Herrn Prof. P. Rehling für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Versuchstiere zu Beginn unserer Forschungsarbeit.

Weiterhin gilt mein Dank den biologisch-technischen Assistentinnen Michelle Gulentz und Nina Schnellbach für die stete Unterstützung bei der Vorbereitung und Durchführung der Experimente.

Meinen Dank möchte ich außerdem meinen Freunden, insbesondere Dr. Kira Hanschitz und Katrin Eckhard, aussprechen, die mir beim Verfassen dieser Arbeit tatkräftig zur Seite standen.

Meinem Vater danke ich für den beständigen fachlichen und moralischen Beistand.

Abschließend gilt ein besonderer Dank meinen Eltern und meinem Partner für die bedingungslose Unterstützung während meines Studiums und dem Erstellen meiner Doktorarbeit. Ohne sie wäre mein bisheriger Weg so nicht möglich gewesen.

