

**Adaptation der mitochondrialen
Energiebereitstellung an subzelluläre Unterschiede
der Sauerstoffversorgung im Herzen**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer.nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I-Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Juliana Heidler

geb. am 06.10.1979 in Görlitz

Gutachter :

1. Prof. Dr. Jürgen Holtz
2. Prof. Dr. Werner Roos
3. Prof. Dr. Dr. Thomas Braun

Öffentliche Verteidigung am 28.11.2011

Frankfurt, 21.11.2011

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Die Mitochondrien	1
1.1.1	Morphologie der Mitochondrien	1
1.1.2	Funktion der Mitochondrien als Energielieferant	3
1.1.3	Mitochondriale Biogenese	5
1.1.4	Mitochondrien-assoziiertes Zelltod	6
1.2	Kardiale Mitochondrien und die Kontrolle der Respiration	7
1.2.1	Mitochondriale Subpopulationen der Kardiomyozyte	10
1.3	Ziel der Arbeit	11
2	Material und Methoden	14
2.1	Material	14
2.1.1	Chemikalien	14
2.1.2	Versuchstiere / Probenmaterial	14
2.1.3	Laborgeräte	15
2.1.4	Enzyme	16
2.1.5	Reaktionskits	17
2.1.6	Längenstandards/Marker	17
2.1.7	Antibiotika	17
2.1.8	Oligonukleotide	18
2.1.9	Bakterienstämme, Vektoren und Konstrukte	20
2.1.10	Eukaryotische Zelllinien	21
2.1.11	Kulturmedien	21
2.1.12	Antikörper	22
2.1.13	Puffer und Lösungen	23
2.1.14	verwendete Software	26
2.2	Methoden	27
2.2.1	Torpor-Induktion im Syrischen Hamster	27
2.2.2	Zellkultur	28
2.2.3	Molekularbiologische Methoden	30
2.2.4	Biochemische Methoden	36
2.2.5	SILAC-basierende quantitative Proteomik	49
2.2.6	Zell-Färbungen und Mikroskopie	53
2.2.7	Statistik	53
3	Ergebnisse	54

3.1	Auswirkung der hyperbaren Oxygenierung auf die Funktion der kardialen mitochondrialen Subpopulationen des Hausschweins	54
3.1.1	Modulation der mitochondrialen Respiration in kardialen mitochondrialen Subpopulationen des Hausschweins durch hyperbare Oxygenierung	54
3.1.2	Abhängigkeit des Respirations-Komplex-Zusammenbaus von der subzellulären Lokalisierung und der Sauerstoffverfügbarkeit	57
3.1.3	mtDNA-unabhängige Modulation der RNA-Expression von mitochondrial-kodierten Komplex-Untereinheiten durch hyperbare Oxygenierung	60
3.1.4	Hyperbare Oxygenierung induziert die Expression mitochondrialer Regulatoren	62
3.1.5	Reflektion der mitochondrialen Atmung durch den Matrix-pH	63
3.1.6	Mitochondriale Cytochrom <i>c</i> Retention und Opa-1-Expression	64
3.1.7	Sauerstoffmangel verschiebt den mitochondrialen Substrat-Metabolismus	65
3.2	Winterschlaf als Model der mitochondrialen Funktions-Modulation	67
3.2.1	Reduktion der körperlichen Aktivität durch Induktion des Winterschlafes	67
3.2.2	Beeinträchtigung des mitochondrialen Elektronenflusses mit abnehmender körperlichen Aktivität	68
3.3	Dilatative und ischämische Kardiomyopathie	69
3.3.1	Reduzierte β -ATPase-Proteinexpression in DCM und ICM	69
3.3.2	Funktionsverlust der IFM durch Proteindegradation	70
3.4	mNOA1 als Regulator der mitochondrialen Atmung	72
3.4.1	<i>In silico</i> Analyse von mNOA1	72
3.4.2	Expressionsprofil von mNOA1 in Maus-Geweben	72
3.4.3	Mitochondriale Lokalisation von mNOA1	73
3.4.4	mNOA1-abhängige Aktivierung der mitochondrialen Atmung	74
3.4.5	Abhängigkeit der mNOA1-induzierten Cytochrom <i>c</i> -Reduktion von der P-Loop-Domäne	76
3.4.6	mNOA1-Interaktionen	76
3.4.7	mNOA1 bildet Homo-Dimere	79
3.4.8	mNOA1 interagiert mit den mitochondrialen Superkomplexen	79
3.4.9	Stabilität von mNOA1	82
3.4.10	Induktion des Zelltodes durch die Herabregulation von mNOA1	83
3.4.11	Induktion einer mitochondrialen Dysfunktion durch Herabregulation von mNOA1	84
3.4.12	Depolarisation der Mitochondrien durch Herabregulation von mNOA1	86
3.4.13	Die Herabregulation von mNOA1 induziert die Bildung von Superoxid-Radikalen	88
3.4.14	Die Herabregulation von mNOA1 induziert eine ROS-abhängige Apoptose	91
3.4.15	Sauerstoff-Abhängigkeit der mNOA1-Expression	92

3.4.16	Einfluss der mNOA1-Expression auf die mitochondriale Atmung unter Hypoxie	93
3.4.17	Hif-1 α -Abhängigkeit der mNOA1 - Expression	94
4	Diskussion	96
4.1	Anpassung der Funktion mitochondrialer Subpopulationen an subzellulär unterschiedliche Sauerstoff-Versorgung	96
4.2	Die Funktion mitochondrialer Subpopulationen bei fortgeschrittener Kardiomyopathie	104
4.3	mNOA1 als Regulator der mitochondrialen Atmung	105
4.3.1	mNOA1 erhöht die mitochondriale Respiration	106
4.3.2	mNOA1 kontrolliert die mitochondriale Respiration über Superkomplexassemblierung	107
4.3.3	Die Herabregulation von mNOA1 induziert Apoptose	112
4.3.4	Die Expression von mNOA1 ist sauerstoffabhängig	114
5	Zusammenfassung	118
6	Literatur	120
7	Anhang	130
7.1	Abkürzungsverzeichnis	130
7.2	Abbildungsverzeichnis	133
7.3	Tabellenverzeichnis	138
7.4	Danksagung	139
7.5	Lebenslauf	140
7.6	Publikationen	141
7.7	Eidesstattliche Erklärung	142

1. Einleitung

Während der Wirbeltierembryonalentwicklung ist das Herz das erste Organ, welches seine definierte Funktion aufnimmt und diese auch das gesamte Leben beibehält. Eine besonders bedeutende Rolle in der kardialen Physiologie spielen die Mitochondrien, indem sie die für nahezu jede Form der mechanischen und biochemischen Arbeit des Herzens benötigte Energie liefern.

1.1 Die Mitochondrien

1.1.1 Morphologie der Mitochondrien

Mitochondrien sind Zellorganellen, die in fast allen eukaryotischen Organismen des Tier- und Pflanzenreiches vorkommen (Henze and Martin, 2003). Während diese in ihrer Größe (0,5 – 1 μm) und Form sehr variieren, bestehen alle Mitochondrien aus zwei hochspezialisierten Membranen, der Außenmembran und der Innenmembran. Die Außenmembran besteht wie andere zelluläre Membranen aus einer Phospholipid-Doppelschicht und umschließt die Innenmembran, deren Lipidzusammensetzung sich deutlich von der Außenmembran unterscheidet und der von Prokaryonten gleicht. Aufgrund dieses Doppelmembransystems werden zwei weitere separate Kompartimente geschaffen, die mitochondriale Matrix und der Intermembranraum (Frey and Mannella, 2000) (Abbildung 1).

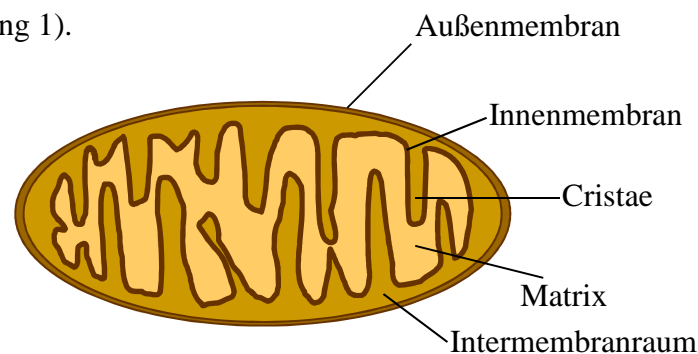


Abbildung 1 zeigt die schematische Darstellung eines Mitochondriums.

Die mitochondriale Außenmembran enthält zahlreiche Kopien des Proteins Porin, welches auch als VDAC (Voltage dependent anion channel) bezeichnet wird. VDAC bildet große wasserhaltige Kanäle mit einem Durchmesser von 2-3 nm, die frei permeabel für Moleküle und auch kleine Protein bis zu 5000 Da sind (Lloreta-Trull and Serrano, 1998). Größere

Proteine, die eine mitochondriale Importsequenz besitzen, können die Außenmembran passieren, indem sie aktiv mit einem Multiproteinkomplex, der Translokase der mitochondrialen Außenmembran (TOM) (Herrmann and Neupert, 2000) transportiert werden. Der Intermembranraum befindet sich zwischen der Außen- und Innenmembran. Da die Außenmembran frei permeabel für kleine Moleküle ist, entspricht die Konzentration dieser kleinen Moleküle im Intermembranraum der des Zytosols. Im Gegensatz zur Außenmembran, die Cholesterin in der Lipid-Doppelschicht enthält, besteht die Innenmembran aus Cardiolipin. Cardiolipin enthält 4 Fettsäuren und macht somit die Innenmembran impermeabel für Ionen und kleine Moleküle, außer die Permeabilität wird durch spezielle Transportproteine ermöglicht (Bernardi, 1999). Das Protein/ Phospholipid-Verhältnis ist sehr hoch. Es kommt ein Protein auf 15 Phospholipide. Die Proteine der Innenmembran können nach ihrer Funktion in 4 Klassen unterteilt werden: 1. Proteine, die Redoxreaktionen der oxidativen Phosphorylierung durchführen; 2. die ATP-Synthase, die ATP in der Matrix generiert; 3. der Multiproteinkomplex, der die Translokase der mitochondrialen Innenmembran (TIM) darstellt für den Proteinimport und 4. spezielle Transportproteine, um kleine Moleküle in und auch aus der Matrix zu passagieren (Alberts B, 2002). Zur Vergrößerung der Oberfläche ist die Innenmembran in zahlreiche Cristae gefaltet. Die Anzahl dieser ist von der metabolischen Aktivität einer Zelle abhängig - so besitzen Kardiomyozyten eine höhere Anzahl als beispielsweise Hepatozyten. Die Innenmembran umschließt die mitochondriale Matrix. Die Matrix enthält ungefähr 2/3 der Proteine und Enzyme eines Mitochondriums. Die in der Matrix enthaltenen Enzyme sind am Zitronensäurezyklus und an der Oxidation der Fettsäuren und Pyruvat beteiligt. Daneben enthält sie das mitochondriale Genom, die mtDNA, die in mehreren Kopien vorliegt, spezielle mitochondriale Ribosomen, t-RNAs und die gesamte für die Replikation und Transkription der mtDNA sowie die Translation erforderlichen Enzyme.

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass die Mitochondrien vereinzelt in der Zelle vorliegen. Mikroskopische Analysen von mit speziellen Farbstoffen gefärbten Mitochondrien ergaben, dass die Mitochondrien ein funktionales Retikulum bilden, dessen stationärer Zustand durch dynamische Fusion und Fission reguliert wird (Chan, 2006). Dieses bewegt sich kontinuierlich am Zytoskelett entlang. Der Transport der Mitochondrien erfolgt in Abhängigkeit des Zelltyps von Aktinfilamenten bzw. durch Mikrotubuli (Yaffe, 1999) und wird durch spezielle GTPasen vermittelt (Chan, 2006).

1.1.2 Funktion der Mitochondrien als Energielieferant

Mitochondrien sind an zahlreichen Prozessen beteiligt. Sie metabolisieren Aminosäuren, Fettsäuren, Steroide und Harnstoff (Voet D, 1994) und sind an der Synthese von Häm und Porphyrin (Sano et al., 1959) sowie an der von Nukleotiden (Loffler et al., 1997) beteiligt. Darüber hinaus sind sie ein integraler Teil zahlreicher Zell-Signal-Kaskaden und regulieren auf diese Weise nicht nur den zellulären Metabolismus sondern auch die Proliferation. Vermittelt wird dies durch das Wirken von GTPasen, Kinasen und auch Phosphatasen, die an der bidirektionalen Kommunikation zwischen den Mitochondrien und dem Rest der Zelle beteiligt sind (McBride et al., 2006).

Eine Hauptaufgabe der Mitochondrien ist die Produktion von ATP - daher werden sie auch als Kraftwerke der Zelle bezeichnet. Der wichtigste Prozess der Energiegewinnung in aeroben Organismen ist die oxidative Phosphorylierung. Ausgangsstoffe sind dabei Kohlenhydrate, Fette und auch Proteine, die durch metabolische Prozesse in der Zelle zuerst in ihre monomeren Bestandteile Glucose, Fett- und Aminosäuren und dann weiter zu Acetyl-CoA abgebaut werden. Acetyl-CoA wird im Zitronensäurezyklus unter Bildung der grundlegenden Hauptprodukte des Zyklus (den Reduktionsäquivalenten NADH und FADH_2) zu Kohlendioxid oxidiert. Diese Reoxidation der Äquivalente mittels Sauerstoff führt letztendlich zum Antrieb der ATP-Synthese (Voet D, 1994).

Die Elektronenübertragung von NADH bzw. FADH_2 auf Sauerstoff erfolgt über die mitochondriale Atmungskette, welche aus 4 Enzymkomplexen besteht, die in die Innenmembran integriert sind. Komplex I (NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase) besteht aus 46 Untereinheiten und ist somit der größte respiratorische Komplex (Ugalde et al., 2004). Er katalysiert die Elektronenübertragung von NADH auf Coenzym Q (Ubichinon). Die Oxidation von NADH liefert 2 Elektronen, die auf den primären Elektronenakzeptor, ein nicht-kovalent gebundenes Flavin-Mononukleotid (FMN) und von dort über eine Reihe von Eisen-Schwefel-Zentren auf gebundenes Ubichinon übertragen werden (Hirst et al., 2003). Ubichinon kann aber auch durch die Oxidation von FADH_2 reduziert werden. Diese Reaktion wird von Komplex II (Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase) katalysiert. Dieser ist ein essentieller Membrankomplex im Zitronensäurezyklus bei der Oxidation von Succinat in Fumarat. Die Oxidation von Succinat ist an die Reduktion von Ubichinon zu Ubichinol gekoppelt. Der Elektronentransfer vom Succinat erfolgt über die Reduktion von FAD zu FADH_2 . Die bei der Reoxidation von FADH_2 freiwerdenden Elektronen werden über Eisen-Schwefel-Zentren auf eine Häm-Gruppe übertragen und von dort auf Ubichinon

(Hagerhall, 1997) (Sun et al., 2005). Ubichinol wird durch den Komplex III (Ubichinol-Cytochrom *c*-Oxidoreduktase) reoxidiert. Die essentiellen Redoxkomponenten des Komplexes sind die Cytochrome b_L , b_H und c_1 und ein Rieske-Eisen-Schwefel-Zentrum (Xia et al., 1997). Die Elektronen werden nach dem sogenannten Q-Zyklus von Ubichinol auf Cytochrom *c* übertragen (Mitchell, 1976). Cytochrom *c* ist an die äußere Innenmembran gebunden und fungiert als Elektronenshuttle zwischen Komplex III und Komplex IV (Cytochrom *c*-Oxidase). Die an dem Elektronentransfer beteiligten Redoxkomponenten sind die Hämgruppen a und a_3 sowie 2 Kupferatome Cu_A und Cu_B . Häm a_3 und Cu_B sind über eine Schwefelbrücke zu einem zweikernigen Komplex verbunden und stellen die Sauerstoffbindungsstelle dar. Der Elektronenfluss erfolgt vom Cytochrom *c* auf das Kupferatom Cu_A über die Hämgruppe a und Häm a_3 - Cu_B auf den gebundenen Sauerstoff und reduzieren diesen zu Wasser (Taanman, 1997) (Abbildung 2).

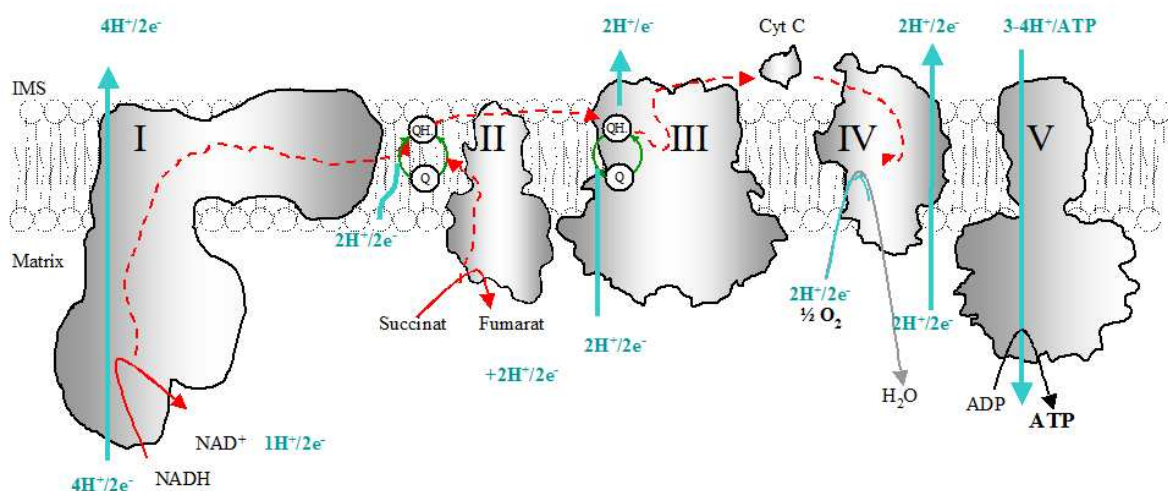


Abbildung 2 zeigt eine schematische Darstellung der mitochondrialen Atmungskette. Die Atmungskettenkomplexe I-IV transportieren Elektronen von NADH auf molekularen Sauerstoff, wobei der Transport der Elektronen an die Erzeugung eines elektrochemischen Protonengradienten über die Innenmembran gekoppelt ist. Die Energie dieses Gradientens wird durch den Komplex V, der F_1F_0 -ATPase, genutzt, um ATP zu produzieren. Abbildung adaptiert nach Ilya Belevich (www.biocenter.helsinki.fi).

Angetrieben wird der Elektronenfluss innerhalb der Atmungskette durch die unterschiedlichen Redoxpotentiale von den Reduktionäquivalenten und Sauerstoff. Die dabei freiwerdende Energie des Elektronentransports nutzen die Komplexe um Protonen von der Matrix in den Intermembranraum zu pumpen, wodurch ein elektrochemischer Protonengradient entsteht (Mitchell, 1976). Die freie Enthalpie des Protonengradienten über die Innenmembran wird durch die F_1F_0 -ATPase zur ATP-Synthese durch Phosphorylierung von ADP zu ATP genutzt. Das gebildete ATP wird im Austausch mit

ADP über den Adeninnukleotidtransporter (ANT) in das Zytosol transportiert und steht somit allen energieabhängigen Prozessen zur Verfügung (Klingenberg, 2008).

1.1.3 Mitochondriale Biogenese

Da der Energiebedarf einer Zelle durch Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse oder aber auch durch Anpassung an veränderte physiologische Bedingungen ständigen Schwankungen unterliegt, ist die Anzahl der Mitochondrien einer Zelle variabel und kann entsprechend der physiologischen Bedingungen reguliert werden. Der Prozess der mitochondrialen Biogenese und deren Regulation ist sehr komplex und umfasst mehr als 1000 Gene. Zu ihnen zählen auch die Gene, die die Proteine der Atmungskette kodieren. 13 Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe sind im mitochondrialen Genom kodiert (Attardi, 1985), die restlichen im nukleären Genom. Die Transkription der mitochondrialen Gene ist abhängig von dem nukleär-kodierten mitochondrialen Transkriptionsfaktor A (Tfam), den Transkriptionsfaktoren B1 und B2 (mtTFB1 und mtTFB2) sowie von der mitochondrialen RNA-Polymerase, die zusammen den mitochondrialen Transkriptionskomplex bilden (Bonawitz et al., 2006). Eine fein abgestimmte intergenomische Koordinierung ist die Grundvoraussetzung für funktionale Mitochondrien (Attardi and Schatz, 1988). Eine unproportionale Proteinexpression oder ein fehlerhafter Import und Einbau der Proteinuntereinheiten verursachen dysfunktionale Atmungsketten. Eine Dysfunktion der Atmungskette resultiert in einer Reduktion der Energieproduktion sowie in einem Anstieg der Produktion reaktiver Sauerstoffradikale, die eine Zelle nachhaltig schädigen können.

Mehr als 95 % der Gene, die für die mitochondriale Biogenese benötigt werden, sind nukleär kodiert und die Kontrolle deren Genexpression liegt auf transkriptioneller Ebene (Scarpulla, 2002). Zu den Regulatoren der Transkription mitochondrialer Gene wurden die ubiquitären Sequenz-spezifischen Transkriptionsaktivatoren Sp1, YY1, CREB, MEF-2/E-box sowie NRF-1 und NRF-2 beschrieben (Scarpulla, 2008). Diese Faktoren werden direkt oder indirekt durch die Ko-Aktivatoren der „*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1*“ (PGC-1)-Familie, PGC-1 α , PGC-1 β und PRC, reguliert (Kelly and Scarpulla, 2004), wobei unter ihnen PGC-1 α als Hauptregulator der mitochondrialen Biogenese gilt, da nur dieser Faktor auf äußere Signale wie Temperatur, Energieverlust sowie der Verfügbarkeit von Nährstoffen und Wachstumsfaktoren zu reagieren scheint (Ventura-Clapier et al., 2008). Es sind eine Vielzahl von Signalwegen beschrieben wurden,

die die Expression von PGC-1 α regulieren. Zu ihnen zählen Kalzium- und „second messenger“-abhängige Signalwege, energieabhängige Signalwege über die Aktivierung der AMPK (AMP-dependent serine/threonine protein kinase), Hormon-aktivierte Signalwege und Signalwege, die durch Cyclin-abhängige Kinasen aktiviert werden. Darüber hinaus kann PGC-1 α auch post-transkriptionell reguliert werden (Ventura-Clapier et al., 2008).

1.1.4 Mitochondrien-assoziiertes Zelltod

Mitochondrien sind nicht nur an metabolischen Prozessen beteiligt sondern auch maßgebliche Regulatoren des apoptotischen Zelltodes.

Die Rolle der Mitochondrien bei der Apoptose besteht darin, dass sie auf bestimmte intrazelluläre Signale mit der Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren reagieren, die den apoptotischen Prozess induzieren bzw. unterstützen. Die Freisetzung dieser pro-apoptotischen Faktoren geschieht durch eine Erhöhung der Permeabilität der mitochondrialen Membran, einem Vorgang, der als „*mitochondrial permeability transition*“ (MPT) bezeichnet wird (Danial and Korsmeyer, 2004; Green, 2005) und durch einen Anstieg der Permeabilität für Moleküle mit einer Größe von bis zu 1,5 kDA gekennzeichnet ist (Bernardi, 1996). Verursacht wird die MPT durch das Öffnen der „*permeability transition pore*“ (PTP). Diese befindet sich an den Kontaktstellen der Innen- und Außenmembran. Die exakte molekulare Zusammensetzung dieses Proteinkomplexes ist noch immer unklar, obwohl davon ausgegangen wird, dass diese sich aus dem Adenin-Nukleotid-Transporter ANT in der mitochondrialen Innenmembran und an dessen Matrixseite assoziierten Cyclophilin sowie VDAC in der Außenmembran zusammensetzt. Des Weiteren wurden die Hexokinase II, die Kreatinkinase sowie der Benzodiazepin-Rezeptor als PTP-Moleküle beschrieben, obwohl noch nicht geklärt ist, ob es sich um strukturelle Komponenten handelt oder diese eine regulatorische Rolle spielen (Javadov and Karmazyn, 2007). Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass Mitglieder der Bcl-2-Familie an die PTP (Marzo et al., 1998; Shimizu et al., 1999) gebunden sein können.

Die Öffnung der PTP kann durch viele unterschiedliche Stimuli erfolgen. Beschrieben wurden u.a. die Abnahme des Membranpotentials (Bernardi, 1992), Erhöhungen des Matrix-pH sowie des Kalziumgehalts (Bernardi et al., 1992) und oxidativer Stress (Halestrap et al., 1997). Das Öffnen der PTP bewirkt ein osmotisches Gleichgewicht zwischen dem Intermembranraum und der Matrix und dadurch einen Zusammenbruch des elektrochemischen Gradienten über die Innenmembran, wodurch die Atmungskette

entkoppelt wird. Die Hyperosmolarität der mitochondrialen Matrix führt zu einer Vergrößerung des Matrixraumes. Während die Innenmembran dieses aufgrund ihrer größeren Oberfläche tolerieren kann, zerreißt die mitochondriale Außenmembran und setzt dadurch pro-apoptotische Faktoren, wie Cytochrom *c* (Green and Reed, 1998), Smac/Diablo (Verhagen et al., 2000), AIF (Susin et al., 1999), HtrA2/Omi (Vande Walle et al., 2008) und Endonuklease G (van Loo et al., 2001) frei, die Caspasen-abhängige bzw. unabhängige Mechanismen der Apoptose auslösen können. Die Öffnung der PTP führt nicht nur zu einer Entkopplung der Atmungskette sondern auch zu einer Entkopplung der ATPase, die zum Erhalt des Membranpotentials Protonen aus der Matrix pumpt und ATP hydrolysiert. Führt das zur völligen Energiedepletion der Zelle, kommt es zu einem nekrotischen Tod der Zelle, da die Apoptose ein Energie-abhängiger Prozess ist (Eguchi et al., 1997). Daher wird angenommen, dass die PTP nur transient geöffnet ist bzw. dass die ATPase-Aktivität herabreguliert wird, um einen völligen Energieverlust zu vermeiden und um somit einen kontrollierten Zelltod zu gewährleisten (Pedersen, 1999).

Die pro-apoptotischen Proteine des mitochondrialen Intermembranraums können auch in einem PTP-unabhängigen Prozess freigesetzt werden. Dieser Prozess wird durch Mitglieder der Bcl-2-Familie vermittelt, die eine Permeabilitätsänderung der mitochondrialen Außenmembran induzieren können. Die Proteine der Bcl-2-Familie werden in Abhängigkeit ihrer Bcl-2-Homologie-Domäne (BH) in 3 Gruppen und nach ihren pro- und anti-apoptotischen Eigenschaften unterschieden (Youle and Strasser, 2008). Die anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine (Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xL, A1 und MCL-1) sind im Allgemeinen in die mitochondriale Außenmembran integriert und vermitteln ihre anti-apoptotischen Eigenschaften durch die direkte Bindung von pro-apoptotischen Bcl-2-Proteinen und daraus resultierend deren Inhibierung. Die pro-apoptotischen Bcl-2-Proteine werden in die Effektor-Moleküle Bax und Bak sowie die BH3-*only*-Proteine (Bad, Bid, Bik, BMF, bNIP3, HRK, Noxa und Puma) unterschieden (Chipuk and Green, 2008). Die Permeabilisierung der Außenmembran wird direkt oder indirekt durch Bax und Bak, vermutlich über Porenbildung, induziert (Youle and Strasser, 2008).

1.2 Kardiale Mitochondrien und die Kontrolle der Respiration

Die Bedeutung der Mitochondrien im Herz wird auch dadurch veranschaulicht, dass sie in Abhängigkeit von der Spezies bis zu 36 % des Volumens einer Kardiomyozyte einnehmen (Schaper et al., 1985), die somit die höchste Mitochondriendichte im Gegensatz zu anderen

Zellen aufweist (Elsasser et al., 2000). Im Vergleich mit anderen Organen verbraucht das Herz nicht nur die meiste Energie sondern auch den meisten Sauerstoff. Für die Energiegewinnung werden neben Aminosäuren, Laktat und Ketonkörpern hauptsächlich freie Fettsäuren und Glukose genutzt, die durch die β -Oxidation bzw. Glykolyse zu Acetyl-CoA abgebaut werden und über den Zitronensäurezyklus sowie die mitochondriale Atmungskette auf diese Weise 90 % des ATP-Gehaltes einer Kardiomyozyte bereitstellen (Kobayashi and Neely, 1979). In einem arbeitenden Herz wird diese Energie hauptsächlich für die Kontraktion der Myofibrillen und den daran beteiligten Prozessen genutzt (Harris and Das, 1991). Für den ATP-Transport ist der sogenannte „Kreatinkinase/Phosphokreatin-Shuttle“ von Bedeutung. Die mitochondriale Kreatinkinase katalysiert den Transfer der energiereichen Phosphatgruppe des ATP auf Kreatin unter der Bildung von Phosphokreatin und ADP. Phosphokreatin diffundiert schnell von den Mitochondrien zu den Myofibrillen, wo die myofibrilläre Kreatinkinase den Transfer der N-Phosphogruppe des Phosphokreatin auf ADP katalysiert, wobei ATP entsteht und Kreatin regeneriert wird (Bessman and Geiger, 1981). Das Kreatinkinase / Phosphokreatin-System hat eine sehr wichtige Funktion als Energiepuffer, um die ATP-Konzentrationen auf normalen Niveau zu halten (Schlattner et al., 2006).

Die Anzahl und Stärke der Kontraktionen wird sowohl durch das autonome Nervensystem und als auch hormonell reguliert. Die Freisetzung der sympathischen Hormone Adrenalin und Noradrenalin bei erhöhter körperlicher Belastung bewirkt über die Aktivierung von β 1-Adrenorezeptoren eine cAMP-abhängige Kalziumfreisetzung, die zu einer Erhöhung der Kontraktion führt. Die intrinsische Regulation der Herzkontraktion wird durch den Frank-Starling-Mechanismus beschrieben (Schmidt R, 1997). Die Kontraktion der Kardiomyozyten ist für das Überleben eines Organismus essentiell. Da das Herz eine geringe anaerobe Kapazität besitzt, muss die Rate der ATP-Produktion eng an den Bedarf gekoppelt sein. Es wurden verschiedene Modelle der Respirationskontrolle beschrieben. Das klassische Modell nimmt an, dass die kardiale Stoffwechselrate mit der Aktivität der oxidativen Phosphorylierung korreliert. Wird ATP verbraucht, erhöhen sich die intrazellulären Konzentrationen von ADP (und freiem Phosphat P_i). Experimente in isolierten Mitochondrien konnten eine direkte Korrelation zwischen den Konzentrationen von ADP und P_i , dem Sauerstoffverbrauch und der ATP-Produktion zeigen (Holian et al., 1977). Basierend auf diesen Befunden wurde angenommen, dass die ATP-Produktion der Akzeptorkontrolle unterliegt, da die Zugabe von ADP, P_i und entsprechenden Substraten in isolierten Mitochondrien zu einem schnellen Anstieg des Sauerstoffverbrauchs führte,

der abhängig von der ADP-ATP-Konversion war (Erecinska and Wilson, 1982). Ein anderes Modell bezog sich auf die Änderung des Verhältnisses zwischen myokardialen ATP-Konzentrationen und dem Sauerstoffverbrauch während der Entwicklung. Diese Untersuchungen an Schafherzen zeigten, dass diese Änderungen auf eine Induktion der Expression von ANT zurückzuführen ist. Kinetische Analysen ergaben eine Michealis-Menten-Abhängigkeit des Verhältnisses von ADP und Sauerstoffverbrauch durch ANT in neugeborenen Schafen, was aber in erwachsenen Tieren verloren geht (Portman et al., 1997). Nachfolgende Untersuchungen in perfundierten Herzen konnten jedoch keine veränderten ADP- und P_i -Konzentrationen sowie auch keine veränderten Konzentrationen der Metabolite Phosphokreatin und NADH trotz erhöhtem Sauerstoffverbrauch nachweisen (Balaban et al., 1986; Unitt et al., 1989). In einer *in silico* – Studie konnten Korzeniewski et al. zeigen, dass diese Konstanz der Metabolitkonzentrationen während eines erhöhten Sauerstoffverbrauchs nur durch eine direkte stöchiometrische Aktivierung aller Atmungskettenkomplexe zu erklären ist. Die direkte Aktivierung wird dabei einem nicht näher definierten Faktor „X“ zugeschrieben (Korzeniewski et al., 2005), der in einer nachfolgenden Publikation als Ca^{2+} diskutiert wird (Korzeniewski, 2007). Veränderungen der intrazellulären freien Ca^{2+} -Konzentration führen zu direkten Veränderungen der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration und können dort die drei wichtigsten Dehydrogenasen Pyruvatdehydrogenase, NAD^+ -Isocitratdehydrogenase und Oxoglutarat-Dehydrogenase aktivieren. Die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung dieser Dehydrogenasen des Zitronensäurezyklus resultiert in der Bereitstellung von NADH als Elektronendonator für die oxidative Phosphorylierung (Denton and McCormack, 1985; McCormack and Denton, 1989). Computer-basierte Modelle, die Ca^{2+} mit der Regulation der oxidativen Phosphorylierung kombinieren, kommen zu dem Schluss, dass mitochondriales Matrix- Ca^{2+} bei diesem Prozess eine wichtige Rolle spielen kann (Cortassa et al., 2003; Cortassa et al., 2006). Tatsächlich lässt die Verteilung der Mitochondrien in einer adulten Kardiomyozyte und die damit verbundene Nähe zum sarkoplasmatischem Retikulum (SR) einen lokalen Kontakt mit Ca^{2+} zu. Einige Mitochondrien kommen dem SR-Ryanodin-Rezeptor (RyR) bis auf 37nm nah und befinden sich somit während der Kontraktion in Mikrodomänen mit hohen Ca^{2+} -Konzentrationen, die im mikromolekularem Bereich liegen. Somit müssen diese Mitochondrien also nicht nur zur Bereitstellung von ATP sondern auch zur Regulation der lokalen, zellulären Ca^{2+} -Homöostase bereit sein (Hom and Sheu, 2009).

1.2.1 Mitochondriale Subpopulationen der Kardiomyozyte

In den Kardiomyozyten gibt es zwei Mitochondrienpopulationen - subsarkolemmale Mitochondrien (SSM), die sich direkt unterhalb der Plasmamembran befinden und interfibrilläre Mitochondrien, die in parallelen Reihen zwischen den Myofibrillen angeordnet sind. Diese wurden erstmalig 1961 von Stenger und Spiro elektronenmikroskopisch (Stenger RJ, 1961) beschrieben und 1977 gelang es Palmer et al. beide Populationen getrennt voneinander zu isolieren (Palmer et al., 1977) (Abbildung 3).

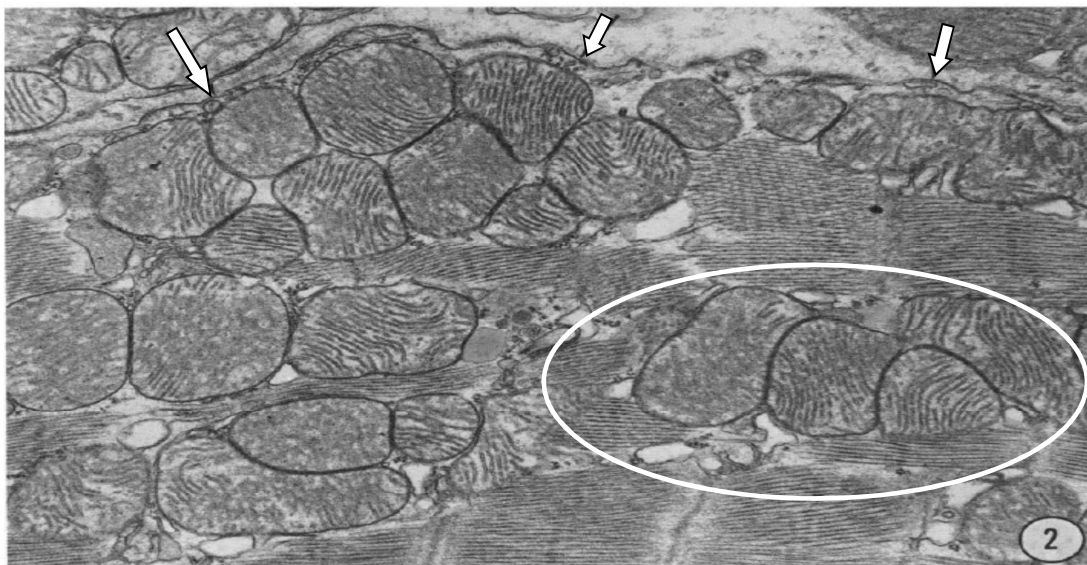


Abbildung 3 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme einer Kardiomyozyte. Zu erkennen sind Mitochondrien die sich direkt unterhalb der Plasmamembran befinden (gekennzeichnet mit weißen Pfeilen). Diese stellen die subsarkolemmalen Mitochondrien dar. Andere befinden sich zwischen den Myofibrillen, die interfibrillären Mitochondrien (innerhalb des weißen Kreises). (Abbildung aus (Palmer et al., 1977)).

Die mitochondrialen Subpopulationen wurden in vielen nachfolgenden Studien unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen untersucht (Doenst et al., 1996; Hoppel et al., 1982; Judge et al., 2005; McMillin-Wood et al., 1980; Moghaddas et al., 2003; Suh et al., 2003; Weinstein et al., 1986). Dabei zeigten sich nicht nur biochemische, sondern auch morphologische Unterschiede. Während die SSM stabförmig, globulär aber auch hufeisenförmig sein können, liegen die IFM in longitudinalen Reihen zwischen den Myofibrillen und sind von länglicher Form, die ungefähr die Länge eines Sarkomers erreichen können. Diese sind entweder eindeutig fragmentiert oder aber in Kontakt mit benachbarten Mitochondrien (Hom and Sheu, 2009). Diese mitochondrialen

Subpopulationen sind nicht herzspezifisch, sondern liegen auch in den Skelettmuskelzellen vor (Abbildung 3).

1.3 Ziel der Arbeit

Das Herz zählt zu den vital bedeutendsten Organen für höhere Lebewesen. Die kardiale Funktion kann nur durch eine kontinuierliche Kontraktilität der Kardiomyozyten gewährleistet werden. Die dafür benötigte große Energiemenge wird von den Mitochondrien über die Atmungskette in Form von ATP produziert. Aufgrund der mangelnden anaeroben Kapazität des Herzens ist es für die volle Funktionalität der Kardiomyozyten zwingend erforderlich, dass die oxidative Phosphorylierung dem energetischen Bedarf dieser Zellen angepasst ist. Dabei korreliert der Sauerstoffverbrauch mit der ATP-Produktion. Ausgehend vom Problem eines ständig Energie-verbrauchenden Organs ohne nennenswerte anaerobe Kapazität können verfügbare Modelle der Koppelung von myokardialem Sauerstoffverbrauch und mechanisch-chemischem Energie-Aufwand das Problem der Sauerstoffversorgung der Mitochondrien in den Nukleus-nahen Bereichen der recht großen Kardiomyozyten nicht überzeugend erklären. Eine Hypothese dazu liefert das gedanklich attraktive Konzept von der Gruppe um Skulachev. Diese betrachteten die Mitochondrien in Myozyten nicht getrennt nach ihrer Lokalisation sondern als ein mitochondriales Retikulum (Bakeeva et al., 1978), welches aus mehreren mitochondrialen Netzwerken besteht, die über sogenannte „*conductive junctions*“ miteinander verbunden sind. Aus ihren Überlegungen schlussfolgerten sie für Kardiomyozyten und Myozyten, dass der innere Bereich des subsarkolemmalen Mitochondrien-Clusters mit mitochondrialen Filamenten verbunden ist, welche wiederum in Kontakt mit den interfibrillären Mitochondrien-Cluster stehen. Ihrer Ansicht nach zeigt sich der Vorteil eines solchen Systems unter limitierter Sauerstoffverfügbarkeit. Ihrer Hypothese zufolge verbrauchen die subsarkolemmalen Mitochondrien unter Bedingungen der limitierten Sauerstoffverfügbarkeit den Sauerstoff über die Atmungskette und leiten den dabei entstehenden Protonengradienten über die mitochondrialen Filamente zu den interfibrillären Mitochondrien-Cluster, wo dieser für die ATP-Produktion genutzt wird (Skulachev, 2001) (Abbildung 4).

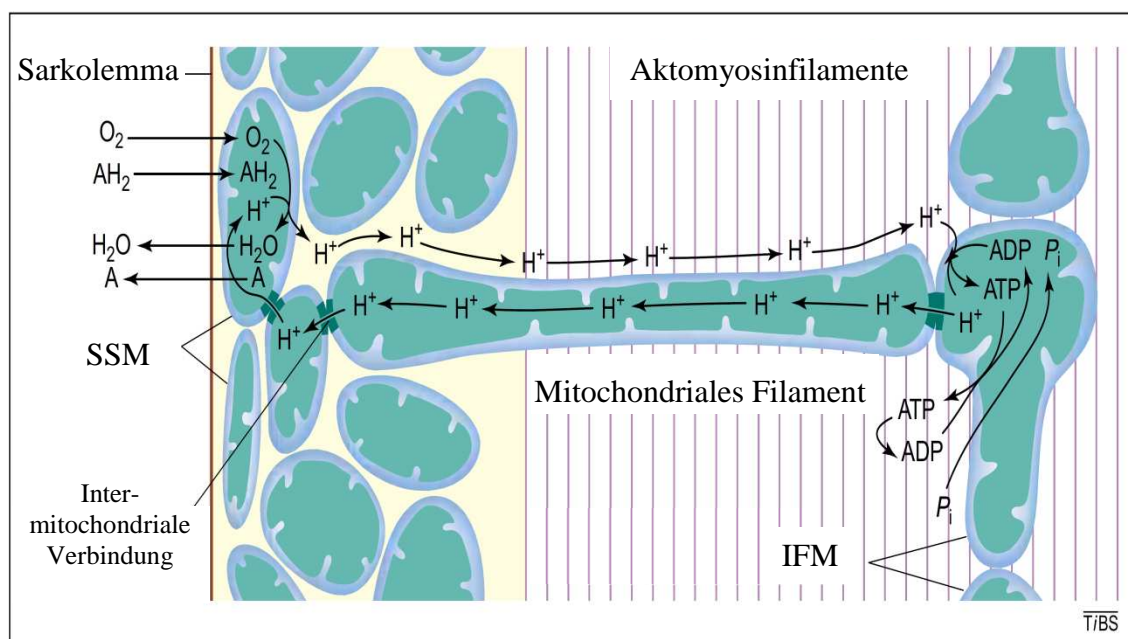


Abbildung 4 zeigt einen möglichen Mechanismus der Energietransmission in einer Myozyte. Sauerstoff und Substrate werden von den subsarkolemmalen Mitochondrien über die Atmungskette unter der Generierung eines Protonengradienten verbraucht. Die Protonen diffundieren im Zytosol in den Kernbereich der Zelle entlang eines mitochondrialen Filamentes, welches die subsarkolemmalen (SSM) mit den interfibrillären (IFM) Mitochondrien verbindet. Nach Erreichen der interfibrillären Mitochondrien werden die Protonen für die Produktion von ATP über die F_1F_0 -ATPase genutzt. In der Matrix produziertes ATP gelangt über den ATP/ADP-Antiporter in das Zytosol, wo es beispielsweise von Aktomyosinfilamenten genutzt wird. Das dabei wieder entstehende ADP+ P_i wird in die Matrix importiert. Die sich nach der ATP-Synthese in der Matrix befindenden Protonen diffundieren über die Matrix der mitochondrialen Filamente wieder zu den subsarkolemmalen Mitochondrien zurück (Skulachev, 2001) Abbildung aus (Skulachev, 2001)

Da diese Hypothese bisher nicht experimentell belegt wurde, sollten in dieser Arbeit kardiale mitochondriale Subpopulationen im Schweinemodell im Normzustand und unter dem Einfluss von hyperbarem Sauerstoff als Maß für eine erhöhte Oxygenierung metabolisch analysiert werden. Bei der Analyse der Daten der mitochondrialen Subpopulationen des Herzens entstand der Verdacht, dass in den dafür verwendeten Schweinen Besonderheiten der kardialen Mitochondrien bestehen können aufgrund einer durch die enge Stallhaltung bedingten körperlichen Inaktivität der Schweine. Da eine körperliche Inaktivität bisher niemals als Faktor für funktionelle Kompartimentierung kardialer Energiebereitstellung und von Energieverbrauch in Betracht gezogen worden ist, sollte diese Problematik der funktionellen Kompartimentierung kardialer Energiebereitstellung an den mitochondrialen Subpopulationen in einem Säugermodell mit körperlicher Inaktivität durch Winterschlaf analysiert werden.

In einem zweiten Teil der Arbeit sollten die im ersten Teil der Arbeit erhaltenen Daten auf molekularer Ebene tiefer untersucht werden. Dabei sollte der Fokus auf Stickstoffmonoxid-abhängigen Regulationen innerhalb der Mitochondrien liegen, da bekannt ist, dass NO ein gut charakterisierter Modulator der mitochondrialen Energiebereitstellung ist. Nachdem die homologe Form eines ursprünglich in Pflanzen als mitochondriale NO-Synthase beschriebenen Enzyms (Guo et al., 2003) auch in Säugerzellen nachgewiesen werden konnte, sollte das Enzym mNOA1 als potentieller Mediator und Modulator der funktionellen Kompartimentierung der kardialen Energiebereitstellung untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die Grundchemikalien wurden in analysenreiner Qualität (p. a.) bezogen von: Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva Feinbiochemica GmbH & Co. (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Deisenhofen) und Invitrogen (Karlsruhe).

Die für die mikroskopischen Untersuchungen erforderlichen Zellkompartiment-spezifischen Färbungen wurden über Invitrogen bezogen.

Die für das stabile Markieren von Aminosäure-Isotopen in der Zellkultur (SILAC) verwendeten schweren Isotope von L-Arginin (L-Arg; U-13C6, 98 %) und L-Lysin (L-Lys; U-13C6, 98 %) wurden bei Silantes (Martinsried) erworben.

Zur Herstellung von Lösungen, Puffern, Medien und Reaktionsansätzen wurde deionisiertes Wasser (ddH₂O) verwendet (Seralpur Delta UF, Seral, Ransbach-Baumbach). Bei RNA-Analysen wurde für Lösungen und Reaktionansätzen ddH₂O verwendet, welches durch Behandlung mit Diethylpyrocarbonat (DEPC, Sigma, Deisenhofen) RNase-frei ist. Dazu wurde 1 l ddH₂O mit 100 µl DEPC versetzt, über Nacht inkubiert und das verbleibende DEPC anschließend durch Autoklavieren inaktiviert.

2.1.2 Versuchstiere / Probenmaterial

2.1.2.1 Linksventrikuläre Gewebeproben der HBO-Schweine (*Sus scrofa*)

Die linksventrikulären Gewebeproben des Schweins wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Dirk Henze erhalten. Die Schweine wurden 240 Minuten einer hyperbaren Oxygenierung unterzogen. Parallel dazu dienten normobare (normoxische) Tiere. Die Tiere hatten ein Alter von 3 Monaten und ein Gewicht zwischen 29 und 35 kg. Die Tiere wurden tier-

ärztlich als gesund eingestuft und wurden auch während der Durchführung der Experimente tierärztlich überwacht.

2.1.2.2 Syrische Hamster (*Mesocricetus auratus*)

Weibliche syrische Hamster wurden bei Charles River (Charles River WIGA GmbH, Sulzfest) erworben. Diese hatten ein durchschnittliches Körpergewicht von 137 ± 12 g.

2.1.2.3 Humane linksventrikuläre Gewebeproben

Linksventrikuläre Herzgewebeproben wurden im Zuge von Herztransplantationen von Patienten mit dilatativer bzw. ischämischer Myopathie aus der Herz-Thorax-Chirurgie am Universitätsklinikum der Martin-Luther-Universität in Kröllwitz erhalten. Die 6 männlichen Patienten (je 3 DCM und ICM) hatten ein Durchschnittsalter von 56 ± 6 Jahren.

2.1.3 Laborgeräte

Agarosegelelektrophorese-System	PerfectBlue Gelsystem Peqlab (Erlangen)	
Analysenwaage		Sartorius (Göttingen)
Blotapparatur	XCell II Blot Module	Invitrogen
Durchlichtmikroskop	Axiovert 100	Zeiss (Jena)
Fluorometer	Fluostar Omega	BMG Labtech (Offenburg)
Gelelektrophorese-System	XCell Sure lock	Invitrogen
Geldokumentationssystem	Versa Doc 4000	Biorad (München)
Inkubatoren	HeraCell	Thermo Scientific (Dreieich)
Konfokalmikroskop	TSC SP2	Leica (Wetzlar)
Laborwaage	L2200P	Sartorius
Magnetrührer	Monotherm	Variomag (Daytona Beach, USA)
Peristaltikpumpe	P-1	GE Healthcare (München)
pH-Meter	pH211	Thermo Scientific
Rollator	Rollermixer SRT2	Sigma
Sonizierer	Sonopuls HD2070	Bandelin electronic (Berlin)
Spannungsquellen	Powerpack P25	Biometra (Göttingen)

	EV232	Consort (Turnhout, Belgien)
	E734	Consort
	Powerease 500	Invitrogen
Spektrophotometer	Ultrospec 3300pro	GE Healthcare
Thermocycler	Mastercycler Gradient	Eppendorf (Hamburg)
Thermomixer	HTTMR	HLC BioTech (Bovenden)
UV-Transilluminator	FLX-20M	Biometra
Vakuumsverdampfer	Concentrator Plus	Eppendorf
Vortexer	Vortex Genius 3	IKA (Staufen)
Wasseraufbereitungsanlage	Seralpur Delta UF	Seral (Ransbach-Baumbach)
Zellkulturbank	HeraSafe	Thermo Scientific
Zentrifugen	Biofuge Primo R	Thermo Scientific

2.1.4 Enzyme

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden bei den Firmen Fermentas (St.Leon-Rot) und New England Biolabs (Frankfurt am Main) erworben. Des Weiteren wurden folgende Enzyme von der entsprechenden Firma verwendet:

Taq DNA-Polymerase	Gibco-BRL (Eggenstein)
M-MLV Reverse Transkriptase RNase H ⁻	Fermentas
RiboLock	Fermentas
T4 DNA Ligase	Fermentas
T4 DNA Polymerase	Fermentas
Proteinase K	Fermentas
RNAse A	Fermentas
Dnase I	Fermentas
Trypsin	Sigma-Aldrich
Nargase	Sigma-Aldrich
Isocitratdehydrogenase	Sigma-Aldrich
Pyruvatkinase	Sigma-Aldrich
Lactat-Dehydrogenase	Sigma-Aldrich

2.1.5 Reaktionskits

DNA Sequencing Kit (ABI Prism)	Applied Biosystems (Darmstadt)
Transform-Aid Kit	Fermentas
Jetquick plasmid spin Kit	Genomed (Löhne)
Jetquick clean-up Kit	Genomed
Flag tagged protein immunoprecipitation Kit	Sigma-Aldrich
Biorad DC	Biorad DC
Lipofectamine 2000 transfection Kit	Invitrogen
ATPlite	Perkin-Elmer (Rodgau-Jügesheim)
Colloidal Blue Staining Kit	Invitrogen
TRIzol Reagent	Invitrogen
Absolute SYBR Green QPCR Mix	Abgene (Thermo Scientific, Dreieich)
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Pierce (Perbio Science, Bonn)
Rediprime TM II Kit	GE Healthcare GmbH
PlusOne silver staining kit protein	GE Healthcare GmbH

2.1.6 Längenstandards/Marker

DNA-Längenstandard :	
O'GeneRuler DNA Ladder Mix	Fermentas
Protein-Größenmarker:	
PageRuler unstained protein ladder	Fermentas
BenchMark protein ladder	Invitrogen
MagicMark XP protein ladder	Invitrogen

2.1.7 Antibiotika

Antibiotikum	Arbeitskonzentration	bezogen von
Ampicillin (Amp)	100 µg/ml	Roth
Hygromycin (Hyg)	200 µg/ml	Invitrogen

2.1.8 Oligonukleotide

Random Primer

Fermentas

2.1.8.1 PCR-Primer

Die PCR-Primer wurden bei der Firma Invitrogen bestellt und sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Gen	„Accession number“	Primer sense	Primer antisense	Produktgröße
<i>Sus scrofa</i>				
12S rRNA	AF486866	ttaccaacccttgccaattc	acatgcttgaggagggtgac	283 bp
18S rRNA	NR_002170	ggcctcactaaaccatccaa	agttggtggagcgatttgc	396 bp
ATPase 6	AF486866	ttttattgccccacgataa	attaatagggcgggtgtcc	390 bp
Cox 1	AF486866	agcgggtactggatgaactg	ttctgggtgtccgaaaaatc	364 bp
Cytb	AF486866	caacaacgcattcattgacc	aatatggatgctccgtttgc	228 bp
ND1	AF486866	catcctgaccctagccata	tgctcggattcataggaagg	296 bp
ND6	AF486866	aatccccaagcccattaaac	tggaggagtgggtgtgta	266 bp
PGC1 α	NM_213963	taaagatgccgcctctgact	tgaccgaagtgcttgttcag	168 bp
Tfam	NM_001130211	ctgtggagggaacttctga	gctgatcgaggctcttttgg	224 bp
<i>Mus musculus</i>				
18S rRNA	X00686	agttggtggagcgatttgc	ggcctcactaaaccatccaa	396 bp
β -Aktin	NM_007393	gtgggccgccttaggcacca	gttggccttagggttcaggggg	243 bp
Cytb	EU312161	atatacacgcaaaccggagcc	tagggccgcgataataaatg	335 bp
GCL _K	NM_010295	aacacagaccaaccagag	cgtagcctcggtaaaatgga	393 bp
GCL _M	NM_008129	gcttcgggactgtatccaaa	gctgctccaactgtgtcttg	398 bp
mNOA1	NM_019836	cctatttgaaccgactcc	gtcataaaaccagtgggcgtc	315 bp
PGC1 α	NM_008904	gatgtgtcgccttctgtctc	gatctactgcctggggacc	254 bp
Tfam	NM_009360	ccaaaaagacctcgttcagc	atgtctccggatcgtttcac	260 bp

Tabelle 1: Zusammenfassung der verwendeten PCR-Primer

2.1.8.2 Klonierungsprimer

Die Klonierungsprimer wurden bei der Firma Invitrogen bestellt:

mNOA1 BamHI sense:

5'-TCGGATCCATGCTGCCCGCGCGCCTG-3'

mNOA1 XhoI antisense:

5'-TACTCGAGTCAGATCATCTGTGCT-3'

EGFP XhoI sense:

5'-TCCTCGAGATGGTGAGCAAGGGCGAGGA-3'

EGFP XbaI antisense:

5'-TATCTAGACTTGTACAGCTCGTCCATGC-3'

FLAG M2 sense:

5'-TCGAGGATTATAAGGATGATGATGATAAGGATTA
TAAGGATGATGATGATAAGTGAT-3'

FLAG M2 antisense:

5'-CTAGATCACTTATCATCATCATCCTTATAATCCTT
ATCATCATCATCCTTATAATC C-3'

sh-mNOA1 sense:

5'-TCGTGGTTCACAGTTGTGGCTTCCAACCTTAAA
GCTTGCCAAGTTGGAAGCCACAACCTGTAACC-3'

sh-mNOA1 antisense :

5'-AAAAGGTTTCACAGTTGTGGCTTCCAACCTTGGCA
AGCTTTAAAGTTGGAAGCCACAACCTGTAACC-3'

K353R sense:

5'-ACTAATGCTGGCCGATCCACTCTCTTT-3'

K353R antisense:

5'-AAAGAGAGTGGATCGGCCAGCATTAGT-3'

2.1.8.3 Sondenprimer für Southern Blot

Für die Generierung der Sonde für den mtDNA Southern Blot wurden folgende Primer genutzt, die ein 266 bp Fragment amplifizieren, welches korrespondierend zu ND6 ist:

ND6 sense (*sus scrofa*): AATCCCCAAGCCCATTAAC

ND6 antisense (*sus scrofa*): TGGTGGAGTTGGTTGTGGTA

2.1.9 Bakterienstämme, Vektoren und Konstrukte

Für die Klonierungsarbeiten wurde folgender Bakterienstamm genutzt:

Escherichia coli K12 JM109: e14–(McrA–) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17
(rK– mK+) supE44 relA1 Δ(lac-proAB) [F' traD36
proAB lacIqZ Δ M15

Für die Klonierungsarbeiten wurde der eukaryotische Expressions-Vektor pcDNA5-TO von Invitrogen verwendet. Zur Amplifikation der EGFP-CDS wurde der Vektor C1 eGFP der Firma Clontech (Takara Bio Europe/ Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) genutzt.

Folgende Konstrukte wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt und verwendet:

Nummer	Konstrukt	Erläuterung
1	mNOA1	kodierende mRNA Sequenz (CDS) von mNOA1
2	mNOA1 -EGFP	1 mit einem EGFP-Tag
3	mNOA1 -Flag	1 mit einem 2x Flag-Tag

4	EGFP	CDS von EGFP
5	mNOA1 Δ P-Loop	GTPase-defiziente Mutante von mNOA1; Punktmutation K353R
6	sh-mNOA1	gegen mNOA1 gerichtete sh-RNA

Der Flag-TO5-Vektor wurde freundlicherweise von Nadine Langendorf zur Verfügung gestellt.

2.1.10 Eukaryotische Zelllinien

Für die *in vitro* Versuche wurde die Maus-Myoblasten Zelllinie C2C12 (ECACC-Nr.91031101, ATCC, Wesel) verwendet.

2.1.11 Kulturmedien

2.1.11.1 Bakterielle Kulturmedien

LB-Agar und LB-Medium wurden bei der Firma Roth erworben.

2.1.11.2 Zellkulturmedien

Die Medien, in denen die C2C12-Zellen kultiviert wurden, hatten die folgende Zusammensetzung und wurden über Invitrogen geordert:

Medien	Zusammensetzung
C2C12-Medium I	Dulbecco's modified Eagle's Medium + Bicarbonat, Glutamax und 4,5 g/L Glukose + 10 % fötales Rinderserum (FCS) + Penicillamin/Streptomycin (10000 U)
C2C12-Medium II	siehe C2C12-Medium I - Penicillamin/Streptomycin

Kryo-Medium	siehe C2C12-Medium I + 5 % Dimethylsulfoxid (DMSO)
Selektionsmedium	C2C12-Medium II + 200 µg/ml Hygromycin
SILAC-Medium	Dulbecco's modified Eagle's Medium + Bicarbonat, Glutamax und 4,5 g/L Glucose - L-Arg, - L-Lys + 10 % dialysiertes FCS + 200 µg/ml Hygromycin
R0,K0-Medium	SILAC-Medium +1/3000 L-Arg 0 (84 mg/ml) + 1/2000 L-Lys 0 (146 mg/ml)
R10K8-Medium	SILAC-Medium +1/3000 L-Arg 10 (84 mg/ml) + 1/2000 L-Lys 8 (146 mg/ml)
Hanks Balanced Salt Solution	
10 X Trypsin/EDTA solution	

2.1.12 Antikörper

Die im Rahmen der Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Antikörper	Firma	Verdünnung	Bestellnummer
F ₁ F ₀ -ATPase α-Untereinheit	Invitrogen	1/5000	A-21350
F ₁ F ₀ -ATPase β-Untereinheit	Mitosciences	1/10000	MS503
VDAC	Mitosciences	1/10000	MSA03
Tfam	Santa Cruz	1/500	Sc30963
Opa-1	Abcam	1/1000	Ab54046
Cytochrom c	Mitosciences	1/10000	MSA06
mNOA1*	Eurogentic	1/1000	
GFP	Roche Applied Science	1/10000	11814460001
Flag-M2	Sigma Aldrich	1/2000	F1804
Trx-2	AbFrontier	1/1000	LF-PA0012

Pan-actin	New England Biolabs	1/10000	NEB4968
PHB2	Novus Biologicals	1/500	NB100-1809
p38	New England Biolabs	1/1000	NEB9212
P-p38 (Thr180/Tyr182)	New England Biolabs	1/1000	NEB9211
JNK/SAPK	New England Biolabs	1/1000	NEB9258
P-JNK/SAPK (Thr183/Tyr186)	New England Biolabs	1/1000	NEB9251
Caspase-3	New England Biolabs	1/1000	NEB 9662
PARP	New England Biolabs	1/1000	NEB9542
RtMs Total OxPhos Complex	Invitrogen	1/10000	458099
Anti-mouse HRP	Pierce	1/1000	31430
Anti rabbit HRP	Pierce	1/1000	31460
Anti goat HRP	Sigma Aldrich	1/5000	A5420

Tabelle 2: Zusammenfassung der verwendeten Antikörper

*Der mNOA-1 Antikörper wurde von Eurogentec (Eurogentec Deutschland GmbH, Köln) hergestellt und richtet sich gegen die Peptidsequenz CYRMFKRQRRLQEDAT.

2.1.13 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben sind alle Puffer und Lösungen:

- in ddH₂O angesetzt
- die pH-Werte mit HCl bzw. NaOH eingestellt

Die Prozentangaben sind definitionsgemäß (w/v). Die Puffer und Lösungen wurden entweder autoklaviert, steril filtriert oder frisch angesetzt.

Puffer	Zusammensetzung
Blue Native-3 x Gelpuffer	75 mM Imidazol 1,5 M Aminocaprinsäure pH 7,0
Blue Native-Anodenpuffer	25 mM Imidazol pH 7,0

Blue Native-Kathodenpuffer	50 mM Trizin 7,5 mM Imidazol 0,002 % Coomassie G-250 pH 7,0
Citratsynthase-Assaypuffer	50 mM Tris/HCl pH7,4 3,6 % Manitol
5 % Coomassie-Lösung	5 % Coomassie G-250 500 mM Aminocaprinsäure
DNA-Ladepuffer	10 mM Tris/HCl pH 7,6 1 mM EDTA 0,25 % Bromphenolblau 50 % Glycerol
Extraktionspuffer	100 mM Tris/HCl pH 8,0 12,7 mM EDTA 10 % SDS
IB-Puffer	10 mM Tris/Mops pH7,4 200 mM Saccharose 1 mM EGTA pH7,4
Laemmli-Puffer	300 mM Tris/HCl pH 6,8 10 % SDS 50 % Glycerol
Lenaz-Puffer	50 mM KCl 10 mM Tris/HCl pH 7,4 1 mM EDTA
20x MES-SDS-Laufpuffer	50mM MES 50 mM Tris 1 mM EDTA 0,1 % SDS pH 7,3
Mito-Isolationspuffer	50 mM Tris 250 mM Saccharose 0,2 mM EDTA pH 7,8

20 x MOPS SDS-Laufpuffer	50 mM MOPS 50 mM Tris 1 mM EDTA 0,1 % SDS pH 7,7
Ponceau-Färbelösung	0,5 g Ponceau 1 ml Essigsäure ad 100 ml ddH ₂ O pH 7,7
Puffer A	220 mM Mannitol 70 mM Saccharose 5 mM MOPS pH 7,4
Puffer A+	220 mM Mannitol 70 mM Saccharose 5 mM MOPS 2 mM EGTA 0,2 % BSA pH 7,4
Puffer B	100 mM KCl 50 mM MOPS 2 mM EGTA 0,2 % BSA pH 7,4
Puffer C	100 mM KCl 50 mM MOPS 0,5 mM EGTA pH 7,4
Solubilisierungspuffer	50 mM Imidazol 1 M Aminocaprinsäure pH 7,0

50 x TAE-Puffer	2 M Tris/HCl pH 8,0 1 M Essigsäure 0,5 M EDTA pH 8,0
TBS-T	20 mM Tris/HCl pH 7,9 137 mM NaCl 0,2 % Tween-20
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8,0 1 mM EDTA
TENS-Puffer	50 mM Tris/HCl pH8,0 40 mM EDTA pH8,0 100 mM NaCl 1 % SDS
1 x Transferpuffer	50 mM Tris 40 mM Glycin 20 % Methanol 0,0001 % SDS
Trizin-SDS-3 x Gelpuffer	3 M Tris 1 M HCl 0,3 % SDS pH 8,45
Trizin-SDS-Anodenpufer	100 mM Tris/HCl pH 8,9
Trizin-SDS-Kathodenpufer	1 M Tris 1 M Trizin 1 % SDS

2.1.14 verwendete Software

Folgende Software wurde benutzt:

Biochrom data capture für die Aufnahme von kinetischen Messungen (Biochrom Ltd., Cambridge, UK)

FACS DIVA für die Aufnahme und Analyse von FACS-Daten (BD Bioscience)

Quantity One für die densitometrische Auswertung von Western Blots

Generunner für DNA-Analysen (Michael Spruyt und Frank Buquicchio)
Microsoft Office 2007 für die Datenverarbeitung (Microsoft Deutschland,
Unterschleißheim)
NCBI Primer Blast für Primerdesign (NCBI, Bethesda, USA)
Web-Cutter zur Analyse von Restriktionsschnittstellen (Max Heimann)
BAS 2500 Image Analysis System (FUJIFILM Life Science, Düsseldorf)
Matinspector für die Promoteranalyse (Genomatix Software GmbH, München)

2.2 Methoden

2.2.1 *Torpor-Induktion im Syrischen Hamster*

Syrische Hamster sind Winterschläfer. Der Winterschlaf (Hibernation) wurde durch sinkende Licht-Dunkel-Perioden und sinkende Umgebungstemperaturen induziert.

Die Hamster wurden in Einzelkäfigen gehalten und erhielten Wasser und Essen nach Bedarf. Ein Bewegungsmelder nahm die Bewegungen von per Zufall ausgewählten Tieren auf. Die Kamera nahm die Bewegungen in Form eines 5 Sekunden langen Filmes auf gefolgt von einem 10-sekündigen Ruheintervall.

Die Induktion des Winterschlafes wurde adaptiert nach Toole et al. (Toole et al., 1999). Die Standardbedingungen in der Tierhaltung sind Licht-Dunkel-Zeiten von je 12 Stunden bei 22 °C Raumtemperatur. Sowohl die Licht-Dunkel-Zeiten als auch die Temperatur wurde täglich um 30 Minuten und 1 °C reduziert bis eine Licht-Dunkel-Zeit von 2:22 Stunden und eine Temperatur von 5 °C erreicht war. Mit Beginn der Temperatur-Reduktion wurden die Hamster mit Nestbau-Material ausgestattet. Diese Zeit trägt die Bezeichnung „Induktionszeit“. Die Hibernation (Winterschlaf, biol. Torpor) wurde definiert als ein Zeitpunkt bei dem die Tiere keinerlei Regung mehr auf äußerliche Bewegung (Verschieben des Käfigs) zeigten und das bereitgestellte Nestbau-Material nicht mehr anrührten. Zusätzlich wurde Streumaterial auf den Rücken der Tiere verteilt. Eine tägliche Kontrolle des Vorhandenseins des Streumaterials stellte eine Nicht-Bewegung der Tiere sicher. Nach einem Minimum von 2 Tagen Hibernation wurden die Tiere getötet, das Herz entnommen und sofort auf Eis gelagert.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Kultivierung von C2C12-Myoblasten

Die murinen C2C12-Myoblasten wurden in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Zellen wurden 2 Minuten in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und danach sofort in der gewünschten Menge vorgewärmten C2C12-Medium I aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf Zellkulturschalen verteilt (je 4 ml) und in einem CO₂-Inkubator bei 37 °C inkubiert. Das Kulturmedium wurde alle 48 Stunden gewechselt. Kurz vor dem Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dazu wurden sie mit kaltem HBSS gewaschen und durch Zugabe von 1 x Trypsin/EDTA abgelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in C2C12-Medium I resuspendiert und die Zellen in neue Kulturschalen überführt. Alternativ wurden die Zellen auch für spätere Versuche eingefroren. Dazu wurde das nach der Trypsinierung und anschließender Zentrifugation erhaltene Zellpellet in Kryo-Medium resuspendiert und in Kryo-Röhrchen überführt und bei -80 °C eingefroren. Die Langzeitlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Für alle Zellkulturexperimente wurde die gleiche Zellzahl ausgesät und die Zellen am darauffolgenden Tag dem Experiment entsprechend aufgearbeitet.

2.2.2.2 Inkubation von C2C12-Zellen unter hypoxischen Bedingungen

Die Hypoxieversuche wurden in einer Hypoxiekammer der Firma Coy (Coy Laboratory Products Inc., Grass Lake, USA) durchgeführt. Diese Kammer hielt den Sauerstoffgehalt bei 0,5 %. Der Kohlendioxidgehalt betrug 5 %. Die Hypoxiekammer ist mit einem Thermostaten ausgestattet, der den Innenraum der Kammer auf 37 °C temperierte.

Die Zellen wurden nach der gewünschten Inkubationszeit auch in der Kammer lysiert und weiter aufgearbeitet.

2.2.2.3 Generieren von stabil-überexprimierenden C2C12-Zellen

Für die Generierung von stabil-überexprimierenden C2C12-Zellen wurden 6×10^5 Zellen in einer 12-Loch-Platte ausgesät und 24 Stunden später mit den entsprechenden Konstrukten mit Lipofectamine 2000 nach Angaben des Herstellers in C2C12-Medium II

transfiziert. Weitere 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen auf eine 10 cm – Schale passagiert. Der pcDNA5 TO-Vektor enthält eine Hygromycin-Kassette und verleiht positiv transfizierten Zellen somit eine Hygromycin-Resistenz, so dass diese Zellen mit Selektionsmedium selektiert werden können. Das Selektionsmedium wird täglich gewechselt. Nach einem Zeitraum von etwa 2 Wochen exprimieren die Zellen die entsprechenden Konstrukte stabil.

2.2.2.4 *Probenaufbereitung von Zellkulturen*

RNA-Isolation:

Für RNA-Expressions-Untersuchungen wurden die Zellen in 6-Loch-Platten ausgesät. Die Zellen wurden 2 x mit je 2 ml eiskaltem HBSS gewaschen und der Puffer vollständig abgesaugt. Die Zellen wurden mit 0,5 ml TRIzol Reagent bedeckt. Es wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur lysiert bevor sie mit einem Zellschaber abgeschabt und in 2 ml Safe-Lock-Gefäße überführt wurden. Bis zur RNA-Isolation wurden diese bei -80 °C gelagert.

Western Blotting:

Für Protein-Expressions-Untersuchungen wurden die Zellen in 10 cm Schalen ausgesät. Die Zellen wurden 2 x mit je 6 ml eiskaltem HBSS gewaschen und der Puffer vollständig abgesaugt. Es wurde 80 µl Extraktionspuffer pro Schale zu den Zellen gegeben und diese mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Es wurde 15 Sekunden bei mittlerer Intensität soniziert. Anschließend wurde 5 Minuten bei höchster Geschwindigkeit und Raumtemperatur zentrifugiert und die Überstände in neue Eppendorf-Gefäße überführt. Bis zum Gebrauch wurden die Proteine bei -80 °C gelagert.

Messung von Enzymaktivitäten:

Für Aktivitätsmessungen wurden die Zellen auf 15 cm Schalen ausgesät. Die Zellen werden 2 x mit je 10 ml eiskaltem HBSS gewaschen, trypsinisiert und anschließend pelletiert. Das Zellpellet wurde in 500 µl eiskaltem Mito-Isolations-Puffer resuspendiert und mit einem Glas-Teflon-Homogenisator mit 25 Hüben bei 500 rpm im Kühlraum abgeschlossen. Bis zur Messung der Enzymaktivitäten wurden die Proben auf Eis gehalten.

2.2.3 *Molekularbiologische Methoden*

2.2.3.1 *Agarose-Elektrophorese*

Für die Identifizierung und Kontrolle von Restriktionsfragmenten, PCR-Produkten bzw. von RNA wurden diese in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurde das Elektrophorese-System von MWG-Biotech verwendet. Es wurde 1 % Agarose durch Erhitzen in einer Mikrowelle in 1 x TAE-Puffer gelöst. Nach Abkühlen der Lösung wurde Ethidiumbromid (50 mg/ml) in einer Konzentration von 1 µl/100 ml Agaroselösung zugesetzt. Das Gel wurde in den vorbereiteten Gelträger luftblasenfrei gegossen und nach Abkühlen in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt. Den Proben wurde vor dem Auftragen $\frac{1}{10}$ Volumen DNA-Ladungspuffer zugesetzt. Die Auftrennung erfolgte mit 8-10 V/cm Laufstrecke. Die Länge der linearen Fragmente wurde mit Hilfe parallel getrennter Längenstandards bestimmt. Die DNA bzw. RNA wurde mit Hilfe eines UV-Transilluminators nachgewiesen und fotografiert.

2.2.3.2 *RNA-Isolation*

RNA wurde nicht nur aus eukaryotischem Zellmaterial isoliert, sondern auch aus tierischem Herzgewebe und isolierten Mitochondrien. Für die RNA-Isolation aus Herzgewebe wurde das Herz sofort nach der Entnahme zerkleinert und mehrmals mit eiskaltem HBSS gewaschen um Blutrückstände weitgehend zu entfernen. Das Gewebe wurde mit einer entsprechenden Menge TRIzol Reagent (100 mg Gewebe/ml) inkubiert und mit einem Ultraturrax auf Stufe 6 homogenisiert. Für die RNA-Isolation aus isolierten Mitochondrien wurde 1 mg Mitochondriensuspension 10 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das mitochondriale Pellet in 1 ml TRIzol Reagent resuspendiert. Bis zur RNA-Isolation wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

Für die RNA-Isolation wurden die Proben 15 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut und die RNA nach Herstellerangaben isoliert. Die RNA wurde in einem geeigneten Volumen DEPC-Wasser aufgenommen und bei -80 °C gelagert.

Die Konzentration wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm im Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) bestimmt. Dabei entspricht eine OD-Einheit einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml.

Da die auf diese Weise isolierte RNA oftmals noch Verunreinigungen an mitochondrialer DNA aufweist, wurde die RNA einem DNase-Verdau unterzogen:

Reaktionsansatz:

RNA (1-3 µg)	x µl
DNase I	1 µl
10 x DNase I-Puffer mit MgCl ₂	1 µl
RiboLock	0,1 µl
DEPC-H ₂ O	ad 10 µl

Dieser Reaktionsansatz wurde 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl 25 mM EDTA und 15 minütiger Inkubation bei 65 °C gestoppt.

Die Qualität der RNA wurde durch elektrophoretische Trennung im 1 %-igen Agarosegel überprüft.

2.2.3.3 Erststrangsynthese / Reverse Transkription

Für eine Amplifikation von Zielgenen wurde RNA durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben.

Es wurden 500 ng total-RNA eingesetzt. Das Volumen wurde mit DEPC-H₂O auf 11 µl eingestellt und es wurden 2 µl Random-Primer hinzupipettiert. Dieser Ansatz wurde 5 Minuten bei 65 °C in einem Eppendorf-Cycler (Eppendorf AG, Hamburg) inkubiert, anschließend auf 4 °C heruntergekühlt und es wurde folgender Reaktionsmix hinzugegeben:

Reaktionsmix:

5 X Reaktionspuffer	5 µl
dNTP (10mM)	1 µl
RiboLock	0,5 µl
M-MLV-Reverse Transcriptase RNase H ⁻	0,25 µl
DEPC-H ₂ O	5,25 µl

Dieser Reaktionsansatz wurde 10 Minuten bei 25 °C inkubiert gefolgt von einer 60 minütigen Inkubation bei 42 °C. Die Reaktion wurde durch eine 10 minütige Inkubation bei 70 °C gestoppt.

Durch Zugabe von ddH₂O wurde die so erhaltene cDNA auf eine Konzentration von 10 ng/μl eingestellt. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

2.2.3.4 *Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)*

Die Methode der RT-PCR wurde zur Amplifikation revers-transkribierter cDNA genutzt.

Es wird ein Mastermix aus folgenden Komponenten auf Eis hergestellt:

Reaktionsansatz:

10 x PCR Buffer mit MgCl ₂	2,5μl
dNTP-Mix 100 μM	3 μl
Primer sense	2,5 pmol
Primer antisense	2,5 pmol
Taq DNA Polymerase	1 U
Template	10 ng
ddH ₂ O	ad 25 μl

Der Mastermix wurde ohne Template vorbereitet und ein entsprechendes Volumen in die vorbereiteten Eppendorfgefäße überführt. Anschließend erfolgte die Zugabe des Templates. Die jeweiligen PCR-Programme wurden in einem Eppendorf-Cycler gestartet. Die PCR beginnt mit einem initialen Denaturierungsschritt bei 95 °C für 2 min. Danach beginnt das zyklische Programm mit Denaturierung bei 95°C für 30 Sekunden, Annealing für 30 Sekunden bei einer Primer-spezifischen Annealingtemperatur und DNA-Synthese bei 72 °C für 30 Sekunden. Die Zyklenzahl des Programmes ist primerspezifisch. Abschließend wird der Ansatz 10 Minuten bei 72 °C inkubiert und auf 4 °C abgekühlt.

2.2.3.5 *Klonierung der Konstrukte*

Klonierung der mNOA1-cDNA

Für die Klonierung der mNOA1-Konstrukte wurde aus C2C12-cDNA durch spezifische mNOA1-Klonierungsprimer die kodierende mRNA Sequenz von mNOA1 mittels PCR (Punkt 2.2.3.4) amplifiziert.

Klonierung der EGFP-cDNA

Die EGFP-cDNA wurde mit Hilfe der EGFP-Klonierungsprimer von dem Vektor C1 eGFP durch PCR amplifiziert.

Die Größen der PCR-Produktes wurden auf einem Agarose-Gel kontrolliert und die DNA unter Verwendung des „*Jetquick clean up kit*“ extrahiert.

Die Klonierungsprimer enthalten die für die spätere Ligation erforderlichen spezifischen Restriktionsschnittstellen. Die extrahierten PCR-Produkte und auch der pcDNA5-TO Vektor wurden mit den Klonierungsprimer-spezifischen Restriktionsendonukleasen nach Herstellerangaben in den entsprechenden Puffern und bei den entsprechenden Temperaturen verdaut. Anschließend wurde die DNA aus dem Restriktionsverdau durch Zugabe von $\frac{1}{10}$ Volumen Natrium-Acetat und 2,5 Volumen Ethanol bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ präzipitiert. Die präzipitierte DNA wurde in ddH₂O gelöst und die DNA-Konzentration bestimmt. Danach erfolgte die Ligation der mNOA1-CDS mit der EGFP-CDS bzw. des Flag-M2. Die Teilkonstrukte wurden anschließend in den pcDNA5-TO-Vektor ligiert. Ligationsreaktionen wurden mit 200 pmol DNA und 1 U T4-DNA-Ligase nach Herstellerangaben in einem Volumen von 20 μl angesetzt. Bei Ligationen der Teilkonstrukte mit Vektor-DNA wurde die DNA der Teilkonstrukte in einem 5-fachen Überschuss eingesetzt.

Der Ligationsansatz wurde in *E.coli* JM109 mit Hilfe des Transform Aid Kits von Fermentas transformiert. Dieser Transformationsansatz wurde anschließend zur Selektion auf vorgewärmte LB-Agar-Platten ausgestrichen, die das entsprechende Antibiotikum enthielten. Die Platten wurden über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Am nächsten Tag wurden Klone gepickt, die Plasmid-DNA isoliert und diese anschließend durch eine entsprechende Restriktionsanalyse auf Positivität überprüft. Die DNA einzelner positiver Klone wurde sequenziert (siehe Punkt 2.2.3.6).

2.2.3.6 DNA Sequenzierung

Um die Richtigkeit der Konstrukte zu gewährleisten und um eventuelle Leserasterverschiebungen auszuschließen, wurden diese sequenziert. Dazu wurde 1 μg der DNA im Speed-Vac eingedampft. Die Proben wurden zu MWG (MWG Biotech AG, Ebersfelde) geschickt, wo diese mit vektor-spezifischen Sequenzierungsprimern sequenziert wurden.

2.2.3.7 DNA-Isolation

DNA-Isolation aus Zellen

Dazu wurden die in 6-Loch-Platten kultivierten C2C12-Zellen zweimal mit eiskaltem HBSS gewaschen und in 500 µl TENS-Puffer mit 200 µg Proteinase K in einer feuchten Kammer über Nacht bei 55 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die DNA mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert und anschließend mit Natriumacetat und Ethanol präzipitiert. Die erhaltenen DNA-Pellets wurden in TE-Puffer gelöst.

DNA-Isolation aus isolierten Mitochondrien

Für die Isolation von DNA aus isolierten Mitochondrien wurde 1 mg der Mitochondrien-suspension für 10 Minuten bei 10000 x g zentrifugiert und das mitochondriale Pellet in 200 µl TENS-Puffer gelöst und mit 200 µg RNase A und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine 30-minütige Inkubation mit 200 µg Proteinase K bei 56 °C. Die DNA wurde mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert und anschließend mit Isopropanol präzipitiert. Die erhaltenen DNA-Pellets wurden in 50 µl TE-Puffer gelöst.

2.2.3.8 Quantitative PCR (QPCR)

Für die Durchführung der quantitativen PCR wurde der Absolute SYBR Green QPCR Mix nach Angaben des Herstellers genutzt. Es ergab sich folgender Reaktionsansatz:

Reaktionsansatz:

Absolute SYBR Green QPCR Mix	12,5 µl
Primer sense	2,5 pmol
Primer antisense	2,5 pmol
cDNA	10 ng
ddH ₂ O	ad 25 µl

Zur Durchführung der QPCR wurde ein iQ5-System (Biorad) genutzt. Die Reaktion startete mit der Denaturierungsphase für 15 Minuten bei 95 °C. Es folgen 40 Zyklen mit 30 Sekunden bei 95 °C, 30 Sekunden bei einer Primer-spezifischen Annealingtemperatur und

30 Sekunden bei 72 °C. Zur Überprüfung der Produktreinheit wurden Schmelzkurven aufgenommen. Diese überspannten einen Bereich von 72 – 95 °C bei einem Temperaturanstieg von 0,2 °C pro Sekunde. Dabei wurde die Fluoreszenzintensität in 5 Sekunden-Intervallen gemessen. Für die Quantifizierung der PCR-Produkte wurden Gen-spezifische Standards eingesetzt, welche in verschiedenen bekannten Konzentrationen der Kopienzahl eingesetzt wurden. Aus diesen konnten durch Erstellen einer Standard-Kurve die Kopienzahl der zu untersuchenden Fragmente bestimmt werden.

Bei den Standards handelt es sich um Gen-spezifische PCR-Produkte des gleichen Primerpaares, die mit Hilfe des JetQuick clean-up Kits aufgereinigt wurden. Es wurde die Konzentration durch Messung der Absorption bei 260 nm im Nanodrop 1000 bestimmt, wobei eine OD-Einheit einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml entspricht.

$$\text{Fragmente / } \mu\text{l} = \frac{\text{Konzentration des Fragmentes}}{\left(\frac{\text{Spezifische Molare Masse des}}{\text{Avogadro-}} \right)}$$

Gleichung 1: Formel zur Berechnung der Kopienzahl für die PCR-Standardproduktion

Die Standards wurden über Gleichung 1 auf bekannte Kopienzahl in einer absteigender Reihe verdünnt.

Die verwendeten Gen-spezifischen Primer sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

2.2.3.9 Bestimmung der mRNA-Stabilität

Um die Stabilität von mRNA zu untersuchen wurden C2C12-Zellen mit dem Transkriptionshemmer Actinomycin D (ActD) für unterschiedliche Zeitpunkte inkubiert. Anschließend erfolgte die RNA-Isolation mit Trizol Reagent und die Analyse mittels PCR mit Sequenz-spezifischen Primern.

2.2.3.10 Southern Blot

Der Southern Blot wurde, wie in unserem Manuskript (Noack et al., 2006) beschrieben durchgeführt.

Die mtDNA wurde mit BsrGI bei 37 °C über Nacht linearisiert. Der Ansatz wurde auf einem Agarose-Gel elektrophoretisch bei 20 V über Nacht aufgetrennt und auf eine Hybond XL Nylon-Membran (GE Healthcare Europe GmbH, München) geblottet und anschließend die Membran mit einer Sonde, die gegen ein 266 bp Fragment korrespondierend zu ND6 gerichtet ist, hybridisiert. Die radioaktive Markierung der Sonde mit [α -³²P] dCTP erfolgte unter Verwendung des Rediprime™ II Kit. Für die Reinigung der radioaktiv-markierten DNA wurden Sephadex G-50 Quick Spin Columns (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) genutzt. Die hybridisierten Membranen wurden im Phosphor-Imager entwickelt und mit dem „BAS 2500 Image Analysis System“ analysiert.

2.2.4 Biochemische Methoden

2.2.4.1 Proteinpräparation aus Herzgewebe

Für die Isolation von Proteinen aus links-ventrikulärem Herzgewebe wurde das Herz nach der Entnahme mehrmals mit eiskaltem HBSS gewaschen, der linke Ventrikel isoliert und das Gewebe in Kryo-Röhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Gewebe wurde auf Eis aufgetaut und mit einem Skalpell zerkleinert. Nachfolgend wurde das zerkleinerte Gewebe in Extraktionspuffer (100mg/ml) mit einem Ultraturrax auf Stufe 6 homogenisiert und anschließend bei mittlerer Intensität 20 Sekunden soniziert. Die Proben wurden bei maximaler Geschwindigkeit für 5 Minuten bei RT zentrifugiert und die Überstände in neue Eppendorf-Gefäße überführt. Bis zum Gebrauch wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

2.2.4.2 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der isolierten Proteine wurde mit Hilfe des DC Protein Assays von Biorad bestimmt und nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Absorption wurde bei 750 nm im FLUOstar gemessen. Anhand der BSA-Standard-Eichkurve wurde über die Absorption der Proben der Proteingehalt bestimmt.

2.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurden die NuPAGE Novex 4-12 % Bis-Tris-Gele von Invitrogen mit 1 x MES SDS-Laufpuffer verwendet, basierend auf der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970). Vor dem Auftragen der Proteinproben wurde die Proteinkonzentration auf 1,5 µg/µl mit Extraktionspuffer und Laemmli-Puffer in einem 3:2-Verhältnis eingestellt. Bevor die Proteinproben 3 Minuten bei 95 °C unter Schütteln inkubiert wurden, wurde Bromphenolblau für eine bessere Kenntlichkeit und DTT (40 mM) für die Reduktion vorhandener Disulfidbrücken zugegeben. Es wurden 15 µg Probe aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte 15 Minuten bei 75 V und 15 mA gefolgt von 75 Minuten bei 160 V und 20 mA. Parallel erfolgte die Auftrennung eines Proteinmarkers zur Größenbestimmung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine.

2.2.4.4 Western Blotting, Antikörperbindung und ECL-Detektion

Der Transfer von Proteinen aus einem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulose Membran erfolgte mittels der Semi-Dry-Blot Apparatur XCell II (Invitrogen) und wurde nach Herstellerangaben mit 1 x Transferpuffer durchgeführt. Dabei betrug die Transferzeit 2 Stunden bei 30 V und 125 mA.

Nach Beendigung des Blottens wurde die Apparatur abgebaut und die Nitrocellulosemembran 10 Minuten in Ponceau-Färbelösung bei RT inkubiert um den Transfer zu überprüfen. Nach Spülen der Membran mit ddH₂O wurde diese anschließend 1 Stunde in 1 x TBS-T mit 5 % Trockenmilch blockiert um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Die Membran wurde 4 x 5 Minuten mit TBS-T gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper, spezifisch verdünnt in 3 % Trockenmilch/TBS-T über Nacht im Kühlraum auf einem Schüttler. Nach 4 x Waschen für je 10 Minuten mit TBS-T wurde mit einem spezifischen sekundären Antikörper in 2,5 % Trockenmilch/TBS-T für eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend folgte nach weiterem dreimaligen Waschen die Antikörperdetektion mit Hilfe von „horseradish“ Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper und „SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity“ im VersaDoc MP4000 imaging System (Biorad).

Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die quantitative Auswertung erfolgte mit „Quantity One“- Software.

2.2.4.5 *Redox-Western*

Für die quantitative Bestimmung von oxidiertem und reduziertem Thioredoxin-2 wurde ein Redox-Western durchgeführt. Dazu wurden die Proteine wie unter 2.2.2.4 beschrieben in Extraktionspuffer geerntet, soniziert und zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Eppendorf-Gefäße überführt und mit 15 mM 4-Acetoamido-4'-Maleimidylstilben-2,2'-Disulfonsäure (AMS) 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden wie unter 2.2.4.3 beschrieben für die SDS-Page vorbereitet. Die Elektrophorese erfolgte unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Daher wurde auf die Zugabe von DTT und das Denaturieren bei 95 °C bei der Probenvorbereitung verzichtet.

2.2.4.6 *Bestimmung der Proteinstabilität*

Für die Bestimmung der Protein-Halbwertszeit wurden C2C12-Zellen mit dem Translationshemmer Cycloheximid (CHX) für unterschiedliche Zeitpunkte inkubiert. Es folgte die Protein-Isolation und die Analyse in der SDS-PAGE mit nachfolgender Western-Analyse mit den entsprechenden Antikörpern.

2.2.4.7 *Isolation von Mitochondrien aus der Maus-Leber*

Die Isolation von Lebermitochondrien aus der Maus erfolgte wie in Frezza et al. (Frezza et al., 2007) beschrieben. Dazu mussten die Mäuse über Nacht fasten. Nach dem Töten mittels zervikaler Dislokation wurde die Leber entnommen und die Gallenblase entfernt. Um die Leber von Blut zu befreien, wurde diese mit einem Skalpell zerkleinert und mehrmals mit eiskaltem IB-Puffer (1 g Gewebe / 10 ml Puffer) gespült. Diese Suspension wurde in einen Glas-Teflon-Potter überführt und mit 25 Hüben bei 500 rpm homogenisiert. Das Homogenat wurde in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und 10 Minuten bei 500xg bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Falcon-Röhrchen dekantiert und es folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 7000xg und 4 °C. Die pelletierten Mitochondrien wurden mit 5 ml eiskaltem IB-Puffer gewaschen. Das finale mitochondriale Pellet wurde in einem kleinen Volumen eiskalten IB-Puffer vorsichtig resuspendiert. Nach der Proteinbestimmung erfolgte die Lagerung der Mitochondrien bei -80 °C.

2.2.4.8 *Isolation von mitochondrialen Subpopulationen aus links-ventrikulärem Gewebe*

Zwei Populationen von links-ventrikulären kardiale Mitochondrien wurden nach einem Protokoll von Palmer et al. (Palmer et al., 1977) isoliert. Sofort nach der Herzentnahme wurde dieses in eiskaltem Puffer A gelagert und gewaschen. Der linke Ventrikel wurde isoliert und nochmals mehrmals mit eiskaltem Puffer A gewaschen, kurz getrocknet und gewogen. Das Gewebe wurde mit einer Schere zerkleinert und mit Puffer A+ auf eine Konzentration von 1 g Gewebe/ 10 ml Puffer eingestellt. Diese Suspension wurde mit dem Ultraturax 5 Sekunden homogenisiert und anschließend mit 8 Hüben bei 500 rpm in einem Glas-Teflon-Potter weiter ausgeschossen. Das Homogenat wurde 10 Minuten bei 500xg bei 4 °C zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde in ein separates Falcon-Röhrchen überführt und das zurückbleibende Pellet wurde nochmals mit dem originalen Volumen an Puffer A+ aufgeschlossen und zentrifugiert. Dieser Überstand wurde mit dem vorher erhaltenem vereinigt und 10 Minuten bei 3000xg bei 4 °C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet stellt die subsarkolemmalen Mitochondrien (SSM) dar und wurde nochmals mit Puffer A+ gewaschen bevor die Mitochondrien in soviel Puffer C resuspendiert wurden um eine Konzentration von ungefähr 25 mg/ml zu erhalten.

Das zurückgebliebene Pellet wurde mit Puffer B (Original-Volumen) resuspendiert und Nargase wurde in einer Konzentration von 5 mg/g Gewebe zugesetzt. Es wurde sofort mit 8 Hüben bei 500 rpm in einem Glas-Teflon-Potter homogenisiert, mit dem doppelten Volumen Puffer B verdünnt und 5 Minuten bei 5000xg bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Puffer B resuspendiert, mit einem Glas-Teflon-Potter homogenisiert und 10 Minuten bei 500xg bei 4 °C zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde in ein separates Falcon-Röhrchen überführt und das Pellet wurde nochmals mit Puffer B aufgeschlossen und zentrifugiert. Dieser Überstand wurde mit dem vorher erhaltenem vereinigt und 10 Minuten bei 3000xg bei 4 °C zentrifugiert. Das hier erhaltene Pellet stellt die interfibrillären Mitochondrien (IFM) dar. Es wurde nochmals mit Puffer B gewaschen und die Mitochondrien anschließend in soviel Puffer C resuspendiert um eine Konzentration von ungefähr 25 mg/ml zu erhalten.

Alle Schritte der Isolation wurden im Kühlraum bei 4 °C durchgeführt.

2.2.4.9 Native Auftrennung von Proteinkomplexen: Blue Native PAGE

Zur Analyse von mitochondrialen Multiproteinkomplexen wurde die *Blue Native* –Technik genutzt (Schagger and von Jagow, 1991; Wittig et al., 2006a). Dafür wurden mitochondriale Membranen mit dem Detergenz Dodecylmaltosid (DDM) solubilisiert und die so gewonnenen Multiprotein-Membrankomplexe wurden auf einem *Blue Native*-Gel aufgetrennt.

Herstellung von 5 –13 %-igen *Blue Native*-Gradientengelen

Zur Durchführung der *Blue Native*-PAGE wurde das Hoefer-Gelsystem SE-400 (Hoefer, GE Healthcare Europe GmbH, München) verwendet. Für die Herstellung von 5 –13 % -igen *Blue Native*-Gradientengelen wurde zuerst das Trenngel im Kühlraum mit Hilfe eines Gradientenmixers nach folgender Tabelle 3 hergestellt:

	Trenngel 5 %	Trenngel 13 %	Sammelgel 4 %
40 % Acrylamid (29:1)	2,25 ml	4,88 ml	1 ml
3 x Gelpuffer	6 ml	5 ml	3,33 ml
Glycerol	---	2,4 ml	---
ddH ₂ O	9,75 ml	2,72 ml	
Volumen	18 ml	15 ml	10 ml
10 % APS	100 µl	70 µl	100 µl
TEMED	10 µl	7 µl	10 µl

Tabelle 3: Zusammensetzung der Gellösungen für die *Blue Native PAGE*

Nach der Polymerisation des Gradienten-Gels, wurde das Sammelgel gegossen (Tabelle 3).

Solubilisierung von mitochondrialen Membranen

Die Solubilisierung von 400 µg pelletierten Mitochondrien erfolgte durch Zugabe von 40 µl Solubilisierungspuffer und 10 µl 10 % DDM für 20 Minuten auf Eis. Es wurde 35 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein

neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 5 µl 5% Coomassie-Lösung und 5 µl 50 % Glycerol versetzt.

Blue Native Elektrophorese

20 µl der solubilisierten Probe wird auf einem 5-13 % igem *Blue Native*-Gradientengel mit entsprechenden *Blue Native*-Kathoden- und Anodenpuffer aufgetrennt. Der Gellauf erfolgte über Nacht bei konstanten 100 V.

Nach dem Gellauf wurden katalytische in-Gel-Färbungen durchgeführt (siehe 1.2.4.14), eine zweite Dimension (Trizin-SDS-PAGE; siehe 1.2.4.11) angefertigt, die Gele native geblottet (2.2.4.10) oder die Gele mit 0,25 % Coomassie gefärbt.

2.2.4.10 Natives Blotten von Blue Native-Gelen

Der Transfer von nativen Proteinkomplexen aus einem *Blue Native*-Gel auf eine PVDF-Membran erfolgte nach vorheriger Aktivierung der Membran mit Methanol mittels Semi-Dry Blotten mit 1 x *Blue Native*-Kathodenpuffer. Dabei betrug die Transferzeit 16 Stunden bei 20 V und 100 mA. Nach dem Blotten wurde die PVDF-Membran mit 25 % Methanol/10% Essigsäure inkubiert um den Hintergrund zu entfärben. Anschließend wurde der Blot mit Wasser gespült und anschließend getrocknet. Der Blot wurde weiter bearbeitet wie unter Punkt 2.2.4.4 beschrieben.

2.2.4.11 Trizin-SDS-PAGE

Die Trizin-SDS-PAGE (Schagger, 2006) ist das bevorzugte elektrophoretische System zur Trennung kleiner Proteine, deren Größen zwischen 1 und 100 kDa liegen. In dieser Arbeit wurde die Trizin-SDS-PAGE genutzt, um die aufgetrennten mitochondrialen Multiprotein-Komplexe der *Blue Native-PAGE* weiter in deren Protein-Untereinheiten aufzulösen. Dazu wurden die gewünschten Banden vorsichtig mit einem sauberen Skalpell aus dem *Blue Native*-Gel ausgeschnitten und 1 Stunde in einer Denaturierungslösung bei RT inkubiert. Die Gelstücke wurden mehrmals mit ddH₂O gespült und anschließend auf das polymerisierte Trenngel arrangiert (Tabelle 4). Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde die Elektrophorese in einem Hoefer-Gelsystem unter Verwendung von Trizin-SDS-PAGE Kathoden- und Anodenpuffer gestartet. Der Gellauf erfolgte bei konstanten 90 V über Nacht.

	Trenngel 13,3 %	Sammelgel 4 %
40 % Acrylamid (29:1)	10 ml	1 ml
3 x Gelpuffer	10 ml	3,33 ml
ddH ₂ O	10 ml	5,67 ml
Volumen	30 ml	10 ml
10 % APS	100 µl	200 µl
TEMED	10 µl	20 µl

Tabelle 4: Zusammensetzung der Gellösungen für die Trizin-SDS-PAGE

Nach dem Gellauf wurden die Gele gefärbt (Punkt 2.2.4.8) oder Western-Analysen (Punkt 2.2.4.4) durchgeführt.

2.2.4.12 Proteinfärbungen

Kolloidale Coomassie-Färbung

Die Kolloidale Coomassie-Färbung wurde mit dem collidal blue staining Kit von Invitrogen nach Herstellerangaben durchgeführt.

Silberfärbung

Die Silberfärbung wurde mit dem „PlusOne silver staining kit protein“ von Amersham durchgeführt.

Nach den Färbungen wurden die Gele mit einem Epson-Scanner eingescannt.

2.2.4.13 Messung des mitochondrialen Matrix-pH mit BCECF

Der intramitochondriale pH wurde nach einem Protokoll von Kwast und Hand (Kwast and Hand, 1996) durchgeführt.

Dazu wurden Mitochondrien in einer Konzentration von 25 mg/ml in Mito-Isolationspuffer, welcher 10 µM BCECF/AM enthält, 20 Minuten bei 25 °C inkubiert. BCECF/AM wird schnell von den Mitochondrien aufgenommen und von einer Esterase in der

mitochondrialen Matrix hydrolysiert. Danach wurden die Mitochondrien 10-fach mit eiskaltem Mito-Isolationspuffer verdünnt und 10 Minuten bei 9000xg bei 4 °C zentrifugiert um nicht-hydrolysierten Farbstoff auszuwaschen. Das mitochondriale Pellet wurde in Mito-Isolationspuffer resuspendiert, um die Ausgangskonzentration zu erhalten. Bis zur Messung wurden die Proben auf Eis gelagert.

Detergent-lysierte Mitochondrien wurden genutzt um eine Kalibrierungskurve zu generieren, die den pH-Wert auf das Verhältnis von Fluoreszenz-Intensität am Anregungsmaximum (500 nm) und die nicht pH-abhängige Anregung bei 450 nm bezieht. Dazu wurden 100 µl der mitochondrialen Suspension zu 2,9 ml eines Puffers bestehend aus 100 mM KCl, 20 mM MOPS und 0,07 % Triton X-100 hinzupipettiert. Der pH-Wert des Puffers variierte in 0,2 pH-Einheiten von pH 6,0 bis pH 8,5. Dieser Reaktionsansatz wurde in eine 4 ml Quartzküvette überführt und in einem Hitachi F 2000 Spektrofluorometer, auf 25 °C temperiert, bei einer Anregung von 500 nm und 450 nm und einer Emission von 535 nm gemessen. Das Verhältnis der Anregungen von 550 nm und 450 nm wurde gegen den pH-Wert des Puffers aufgetragen. Aus dieser Kurve wurde der Matrix-pH der intakten Mitochondrien bestimmt.

2.2.4.14 Messung von Enzymaktivitäten

Für die spektroskopischen Enzymaktivitätsbestimmungen wurde das Spektrophotometer Ultrospec 3300 pro von Amersham Bioscience (GE Healthcare) genutzt. Dieses ist mit einem Wasserbad-temperierten Küvettenrotor ausgestattet, um eine gleichbleibende Messtemperatur bei allen Proben zu gewährleisten. Alle Enzymaktivitäten wurden mindestens zweifach bestimmt. Die Berechnung der Aktivitäten erfolgte durch das Lambert-Beersche-Gesetz unter Berücksichtigung der eingesetzten Volumina und Verdünnungen der Reagenzien (Gleichung 2).

$$\Delta E = \varepsilon \cdot c \cdot d \cdot v \cdot V^{-1}$$

Gleichung 2: Lambert-Beersches Gesetz

- ΔE : gemessene Extinktionsdifferenz
- ε : molarer Extinktionskoeffizient in $l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$
- c : Konzentration der chemischen Verbindung in mol/l
- d : Schichtdicke der Küvette
- v : Volumen der eingesetzten Enzymlösung
- V : Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes

Vor jeder neuen Versuchsreihe wurden Verdünnungsreihen der zu messenden Proben angefertigt um eine Linearität der Messungen zu gewährleisten. Die molaren Extinktionskoeffizienten, die für die Berechnung der in dieser Arbeit durchgeführten Enzymaktivitätsmessungen benötigt wurden, sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Substanz	Molarer Extinktionskoeffizient
NADH; NADPH	6220
DTNB	13600
Cytochrom <i>c</i>	21100

Tabelle 5: Zusammenfassung der molaren Extinktionskoeffizienten

Messung der NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase (Komplex I)-Aktivität nach Lenaz

Die Messung der NADH-Oxidase-Aktivität der NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase erfolgte nach der Methode von Lenaz (Lenaz et al., 1995).

Pro Messung wurde der folgende Reaktionsansatz pipettiert:

	ungehemmt	gehemmt
Lenazpuffer	275 µl	271 µl
Mix A (200 µM Antimycin, 100 mM KCN im Verhältnis 1 : 1,25 (v/v))	5 µl	5 µl
Probe	10 µl	10 µl
Rotenon (10 mM)	---	4 µl

Nach 10-minütiger Inkubation bei 30 °C wurde 10 µl Mix B (10 mM NADH, 6 mM Coenzym Q1 im Verhältnis 2:1 (v/v)) zugegeben. Der Ansatz wurde in eine Messküvette überführt und die Extinktionsänderung über die Zeit bei 340 nm gemessen.

ΔE stellt sich hier als die Differenz zwischen ungehemmter und mit Rotenon-gehemmter Messung dar.

Messung der Cytochrom *c*-Reduktase (Komplex III)-Aktivität

Die Messung der Cytochrom *c*-Reduktase-Aktivität erfolgte wie in Gellerich et al. (Gellerich et al., 2002) beschrieben.

Pro Messung wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert:

Kalium-Phosphat-Puffer 1M pH 8	7,5 µl
EDTA 10 mM	1,5 µl
BSA 1 %	30 µl
Natriumazid 100 mM	4,5 µl
Cytochrom <i>c</i> oxidiert 0,6 mM	15 µl
ddH ₂ O	222 µl
Probe	5 µl

Nach 5-minütiger Inkubation bei 30 °C wurde 10 µl 10 mM Decylubichinol zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde in eine Messküvette überführt und die Extinktionsdifferenz über die Zeit bei 550 nm gemessen.

Messung der Cytochrom *c*-Oxidase-Aktivität (Komplex IV)

Die Messung der Cytochrom *c*-Oxidase -Aktivität erfolgte wie in Gellerich et al. (Gellerich et al., 2002) beschrieben.

Pro Messung wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert:

Mix (Kalium-Phosphat-Puffer 0,1M pH 7, reduziertes Cytochrom <i>c</i> 0,6 mM im Verhältnis 8,19 : 5 (v/v))	48 µl
ddH ₂ O	242 µl

Nach 5-minütiger Inkubation bei 30 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µl der Probe gestartet und die Extinktionsdifferenz über die Zeit bei 550 nm gemessen.

Messung der Komplex I+III-Aktivität nach Hatefi und Stempel

Die Messung der Cytochrom *c*-Reduktion erfolgte nach der Methode von (Hatefi and Stempel, 1967).

Pro Messung wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert:

Kalium-Phosphat-Puffer 1M pH 8	7,5 µl
EDTA 10 mM	1,5 µl
Natriumazid 100 mM	3,7 µl
Cytochrom <i>c</i> oxidiert 1 %	15 µl
ddH ₂ O	228 µl
Probe	10 µl

Nach 10-minütiger Inkubation bei 30 °C wurde 6 µl 10 mM NADH zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde in eine Messküvette überführt und die Extinktionsdifferenz über die Zeit bei 550 nm gemessen.

Messung der F₁F₀-ATPase (Komplex V)Aktivität

Die Messung der F₁F₀-ATPase-Aktivität wurde nach Kim et al. (Kim and Berdanier, 1999) durchgeführt.

Pro Messung wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert:

	ungehemmt	gehemmt
Tris /HCl pH 8	234,3 µl	234,3 µl
MgCl ₂ 3,3 mM	10 µl	10 µl
ATP 1 mM	10 µl	10 µl
Phosphoenolpyruvat 1 mM	10 µl	10 µl
NADH 0,3 mM	10 µl	10 µl
Lactat-Dehydrogenase 10 µg	1 µl	1 µl
Pyruvatkinase	14,7 µl	14,7 µl
Rotenon 10 mM	1 µl	1 µl
Oligomycin	---	10 µl

Nach 10-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µl Probe gestartet. Der Reaktionsansatz wurde in eine Messküvette überführt und die Rate der NADH-Oxidation bei 340 nm über die Zeit gemessen.

ΔE stellt sich hier als die Differenz zwischen ungehemmter und mit Oligomycin-gehemmter Messung dar.

Messung der Citratsynthase-Aktivität

Die Messung der Citratsynthase-Aktivität erfolgte nach der Methode von Shepherd & Garland (Shepherd and Garland, 1969).

Pro Messung wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert:

Citratsynthase-Assay-Puffer	263 µl
Acetyl-CoA 2 mM	15 µl
DTNB 10 mM	3 µl
Triton X-100 5 %	6 µl
Probe	10 µl

Die Reaktion wurde 10 Minuten bei 30 °C inkubiert und dann durch Zugabe von 4 µl 50 mM Oxalacetat gestartet und die Extinktionsänderung bei 312 nm über die Zeit gemessen.

Messung der Aconitase-Aktivität

Die Messung der Aconitase-Aktivität erfolgte wie in Gardner et al. (Gardner et al., 1994) beschrieben.

Pro Messung wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert:

Tris/HCl 50 mM pH7,4	263 µl
Natriumcitrat 150 mM	10 µl
MnCl ₂ 18 mM	10 µl
NADP ⁺ 6 mM	10 µl
Isocitratdehydrogenase 10 µg	1 µl

Nach 10-minütiger Inkubation bei 30 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µl Probe gestartet. Der Reaktionsansatz wurde in eine Messküvette überführt und die Extinktionsänderung bei 340 nm über die Zeit gemessen.

Messung der Acyl-CoA-Dehydrogenase-Aktivität

Die Messung der Acyl-CoA-Dehydrogenase-Aktivität erfolgte wie in Sekhar et al. (Sekhar et al., 1987) beschrieben. Als bestimmter Vertreter der Acyl-CoA-Dehydrogenase wurde die Palmitoyl-CoA-Dehydrogenase ausgewählt.

Pro Messung wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert:

Kaliumphosphatpuffer 15 mM pH 7,6	263 µl
BSA 3 mg/ml	30 µl
DPI 900 µM	10 µl
FAD 1,8 mM	10 µl
PMS 1,5 mM	1 µl
Mitochondrien 50 µg	10 µl

Der Ansatz wurde 10 Minuten bei 30 °C inkubiert und die Reaktion wurde durch die Zugabe von 10 µl 1,2mM Palmitoyl-CoA gestartet. Der Reaktionsansatz wurde in eine Messküvette überführt und der Abfall der Absorption bei 600 nm für 3 Minuten gemessen.

2.2.4.15 Katalytische in-Gel-Färbung

Enzymaktivitäten können nicht nur spektrophotometrisch, sondern auch direkt in einem Gel gemessen werden. In dieser Arbeit wurden die Aktivitäten der NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase und der F₁F₀-ATPase nach einem von van Coster et al. (Van Coster et al., 2001) beschriebenen Protokoll katalytisch im Gel gemessen. Dazu wurden *Blue Native*-Gele nach Beendigung der Elektrophorese kurz in ddH₂O gewaschen, um dann mit den entsprechenden Lösungen inkubiert zu werden.

Die NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase wurde katalytisch im Gel durch Inkubation in einer Lösung bestehend aus 2 mM Tris, 0,1 mg/ml NADH, 2,5 mg/ml NBT, pH 7,4 gemessen.

Nach Beendigung der Färbung wurde das Gel mehrmals in ddH₂O gewaschen und danach sofort eingescannt.

Die F1F0-ATPase wurde katalytisch im Gel durch Inkubation in einer Lösung bestehend aus 34 mM Tris, 270 mM Glycin, 14 mM MgSO₄, 8 mM ATP, 0,2 % Pb(NO₃)₂, pH 7,8 gemessen. Nach Beendigung der Färbung wurde das Gel mehrmals in ddH₂O gewaschen und danach sofort eingescannt.

2.2.4.16 Bestimmung des zellulären ATP-Gehalts

Die Bestimmung des zellulären ATP-Gehalts erfolgte mit dem „ATPlite-Kit“ und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.5 SILAC-basierende quantitative Proteomik

SILAC ist eine Massen-Spektrometrie-basierende Technik, die entwickelt wurde, um Unterschiede in der Protein Expression zwischen zwei Proben zu detektieren. Zwei unterschiedliche Zellpopulationen werden mit zwei unterschiedlichen Wachstumsmedien kultiviert. Die Wachstumsmedien unterscheiden sich hinsichtlich der Aminosäuren (AS)-Isotope. Während die eine Zellpopulation mit Wachstumsmedium kultiviert wird, welches normales L-Lys und L-Arg enthält, wird die zweite Zellpopulation in Medium kultiviert, welches die schweren Isotope von L-Lys und L-Arg enthält.

Während des Zellwachstums werden die schweren Isotope in alle Proteine eingebaut. Somit sind die Peptide, in denen die schweren Isotope eingebaut wurden, schwerer im Vergleich zu den Peptiden, die im Medium mit den normalen AS wuchsen. Werden beide Zellpopulationen kombiniert, so können Paare von chemisch-identischen Peptiden aufgrund der Massenunterschiede differenziert werden. Das Verhältnis der Peak-Intensitäten für solche Peptidpaare spiegelt das Häufigkeitsverhältnis für die beiden Proteine in den beiden Zellpopulationen wieder (Ong et al., 2002; Ong and Mann, 2006). Eine besondere Anwendung findet dieses Verfahren in der Identifizierung von wirklichen Protein-Protein-Interaktionen. Dazu werden Co-Immunpräzipitationen (Co-IP) des zu untersuchenden markierten Proteins angefertigt, die in Medium mit den schweren Isotopen der AS gewachsen waren. Als Kontrolle dienen Co-IPs von Mock transfizierten Zellen, die in normalem Medium gewachsen waren. Durch Kombination der Eluate beider Co-IPs und

anschließender Massen-Analyse können echte Protein-Interaktionen von Kontaminationen unterschieden werden.

2.2.5.1 *SILAC-Markierung von C2C12-Zellen*

Stabil-transfizierte C2C12-Zellen mit mNOA1-Flag (mNOA1-Flag-C2C12-Zellen) und Flag (Flag-C2C12-Zellen) wurden auf jeweils zwei 6 cm-Schalen passagiert. Jeweils eine der Schalen wurde mit R0,K0-Medium, die andere mit R10K8-Medium kultiviert. Der Medienwechsel erfolgte täglich und die Zellen wurden alle zwei Tage gewechselt. Nach 5 Passagen sind die Zellen markiert und können weiter verarbeitet werden. Folgende Zelllinien haben sich ergeben:

- mNOA1-FLAG-C2C12-Zellen-R0K0
- mNOA1-FLAG-C2C12-Zellen-R10K8
- FLAG-C2C12-Zellen-R0K0
- FLAG-C2C12-Zellen-R10K8

2.2.5.2 *Co-Immunpräzipitation*

Die Co-Immunpräzipitationen wurden von je 3 x 15 cm- Schalen angefertigt. Dazu wurde der folgende Kit nach Herstellerangaben genutzt:

- „*Flag tagged protein immunoprecipitation Kit*“ von Sigma Aldrich

Es wurden gleiche Proteinmengen in die Co-IPs eingesetzt, anschließend die Eluate vereinigt, aufkonzentriert und auf ein NuPAGE Novex 4-12 % Bis-Tris-Gel aufgetragen und unter Verwendung von 1 x – MOPS-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt (Punkt 2.2.4.3). Nach dem Gellauf wurden die Gele mit kolloidalem Coomassie gefärbt (Punkt 2.2.4.8).

Folgende Eluate wurden vereinigt:

- mNOA1-FLAG-C2C12-Zellen-R0K0 mit FLAG-C2C12-Zellen-R10K8
- mNOA1FLAG-C2C12-Zellen-R10K8 mit FLAG-C2C12-Zellen-R0K0

2.2.5.3 In-Gel Trypsin-Verdau und Peptidextraktion

Durch die Verwendung der schweren Isotope von L-Lys und L-Arg werden die Proteine spezifisch an Trypsin-Spaltungsstellen markiert. Um tryptische Peptide für eine nachfolgende Massen-Analyse herzustellen, müssen die aufgetrennten Proteine im Gel mit Trypsin verdaut werden.

Dazu wurde die gewünschte Reihe im gefärbten Gel mit einem sterilem Skalpell ausgeschnitten und diese Reihe in 10-12 Teile geschnitten, zerkleinert und in Eppendorf-Gefäße überführt. Der Trypsin-Verdau wurde wie in Tabelle 6 beschrieben, durchgeführt:

Behandlung	Substanz	Volumen [μl]	Zeit [min]	Temperatur [°C]
Waschen	50 % 50 mM NH ₄ HCO ₃ / 50 % Ethanol	150	20	25
Waschen	50 % 50 mM NH ₄ HCO ₃ / 50 % Ethanol	150	20	25
Dehydrieren	Absoluter Ethanol	150	10	25
Trocknen	Speed-Vac	xxx	10	25
Reduktion	10 mM DTT / 50 mM NH ₄ HCO ₃	50	45	56
Alkylierung	55 mM Iodacetamid / 50 mM NH ₄ HCO ₃	50	30	25
Waschen	50 mM NH ₄ HCO ₃	150	20	25
Dehydrieren	Absoluter Ethanol	150	10	25
Waschen	50 mM NH ₄ HCO ₃	150	20	25
Dehydrieren	Absoluter Ethanol	150	10	25
Dehydrieren	Absoluter Ethanol	150	10	25
Trocknen	Speed-Vac	xxx	10	30
Trypsin- Verdau	12,5 ng/ μl Trypsin in 50 mM NH ₄ HCO ₃	25	15	25
Verdünnen	50 mM NH ₄ HCO ₃	10	über Nacht	37

Tabelle 6: Zusammenfassung des in-Gel Trypsinverdaus

Nach dem Trypsinverdau wurden die Trypsin-gespaltenen Peptide aus dem Gel extrahiert. Dazu wurden die Überstände des Verdaus nach erfolgter Zentrifugation bei 1000xg für 5

min in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Die Schritte der Peptidextraktion sind in Tabelle 7 zusammengefasst:

Schritt	Substanz	Volumen
1	3 % TFA, 30 % Acetonitril	100 µl
2	70 % Acetonitril	100 µl
3	70 % Acetonitril	100 µl
4	100 % Acetonitril	100 µl
5	100 % Acetonitril	50 µl

Tabelle 7 : Zusammenfassung der Peptidextraktion

Die Inkubationszeit der einzelnen Schritte betrug 20 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde kurz zentrifugiert und die Überstände in den Eppendorf-Gefäße, die bereits die Überstände des Verdau enthalten, gesammelt. Nach Beendigung der Extraktion wurde das Volumen in der Speed-Vac bei 30 °C auf ein Volumen von 60-70 µl eingedampft. Es wurde ein gleiches Volumen 2 % Acetonitril, 0,5 % TFA zugegeben und 1 Minute gevortext. Dieser Ansatz wurde auf die vorbereiteten „stage Tips“ geladen und 3 Minuten bei 3000 x g zentrifugiert. Die „stage Tips“ wurden mit 30 µl 2 % Acetonitril, 0,1 % TFA gewaschen und für 2 Minuten bei 3000xg zentrifugiert. Bis zur Messung der Peptide wurde die „stage Tips“ bei 4 °C gelagert.

Für die Vorbereitung der „stage Tips“ wurden 2 Lagen C18-haltigen Trägermaterials vorsichtig in gelbe Eppendorfspitzen gestopft und diese in folgender Weise gewaschen und aktiviert:

- 20 µl Methanol
- 20 µl 80 % Acetonitril, 0,1 % TFA
- 20 µl 2 % Acetonitril, 0,1 % TFA
- 20 µl 2 % Acetonitril, 0,1 % TFA

2.2.5.4 HPLC und Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Analyse der Proben wurde von Dr. Marcus Krüger durchgeführt.

2.2.6 Zell-Färbungen und Mikroskopie

Um die Lokalisation von mNOA1 zu bestimmen, wurden C2C12-Zellen mit mNOA1-EGFP transfiziert und am nächsten Tag auf Deckgläschen ausgesät. Für eine mitochondriale Färbung wurden die Zellen 20 Minuten mit 100 nM Mitotracker Deep Red in C2C12-Medium I bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden mehrmals mit frischem C2C12-Medium I gewaschen bevor sie in 3,7 % Formaldehyd (in C2C12-Medium I) 15 Minuten bei 37 °C fixiert wurden. Nach der Fixierung wurden die Zellen mehrmals mit HBSS gewaschen und anschließend mit Aqua-Poly/Mount (Polysciences Europe GmbH, Eppelheim) eingedeckelt. Nach dem Trocknen wurden die Proben mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (Leica TSC SP2, Heidelberg) analysiert. EGFP wurde mit der 488 nm Laserlinie angeregt und die Emission zwischen 500 und 550 nm aufgenommen während Mitotracker Deep Red mit der 633 nm-Laserlinie angeregt und die Emission über 650 nm gesammelt wurde. Die Bilder wurden simultan durch ein 63x Wasser-Immersionsobjektiv aufgenommen. Einzel-Kanal-Anregung und Dual-Kanal-Aufnahmen schlossen einen Interferenz zwischen den Kanälen aus.

2.2.7 Statistik

Alle Experimente wurden als unabhängige Doppelbestimmung durchgeführt und die Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardfehler von $n \geq 3$ Experimenten angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des *t*-Test.

Ein Wert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Auswirkung der hyperbaren Oxygenierung auf die Funktion der kardialen mitochondrialen Subpopulationen des Hausschweins

3.1.1 Modulation der mitochondrialen Respiration in kardialen mitochondrialen Subpopulationen des Hausschweins durch hyperbare Oxygenierung

Bevor der Einfluss der hyperbaren Oxygenierung als Marker eines erhöhten Energiebedarfs in den mitochondrialen Subpopulationen untersucht wurde, wurden die Aktivitäten der mitochondrialen Respirationsenzyme in den normobaren, normoxischen Kontrolltieren gemessen. Die Aktivitäten der Komplexe I (NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase) gemessen nach der Methode von Hatefi und Stempel (Hatefi and Stempel, 1967), III (Ubiquinol-Cytochrom *c*-Reduktase), IV (Cytochrom *c*-Oxidase) und V (F₁F₀-ATPase) wurden auf das mitochondriale Markerenzym Citratsynthase (Williams, 1986) abgeglichen. Die Citratsynthase-Aktivität zeigte keine signifikanten Veränderungen zwischen den Subpopulationen (Abbildung 5).

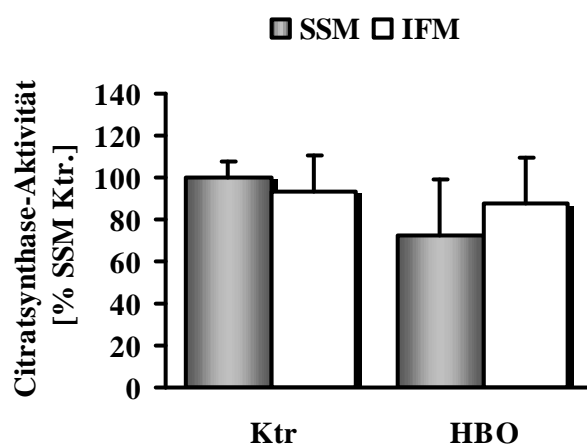


Abbildung 5: spezifische Citratsynthase-Aktivität der SSM (ausgefüllte Balken) und IFM des Schweins (leere Balken) in der Kontrolle und nach hyperbarer Oxygenierung (HBO); Angaben in % der SSM-Kontrolle als Mittelwert±Standardabweichung von n=5 unabhängigen Experimenten

Im Vergleich zu den SSM Kontrollen waren alle mitochondrialen Komplexaktivitäten in den IFM Kontrollen reduziert. Die Komplex I-Aktivität der IFM Kontrolle ist auf 32 ± 16 % der SSM Kontrolle reduziert. In einem ähnlichen Maß sind auch die Aktivitäten der Komplexe III (37 ± 30 %), IV (49 ± 26 %) und V (18 ± 6 %) herabreguliert.

Die hyperbare Oxygenierung führte zu einem signifikanten Anstieg der Enzymaktivitäten in den IFM (IFM Kontrolle vs. IFM HBO) auf das Niveau der SSM Kontrollen. Die Komplex I-Aktivität wurde auf 122 ± 48 % erhöht, die Komplex III-Aktivität auf 81 ± 18 %, die Komplex IV-Aktivität auf 95 ± 24 % sowie die Komplex V-Aktivität auf 103 ± 35 %. Es

zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen SSM HBO und IFM HBO. Die Enzymaktivitäten sind in Abbildung 6 zusammengefasst.

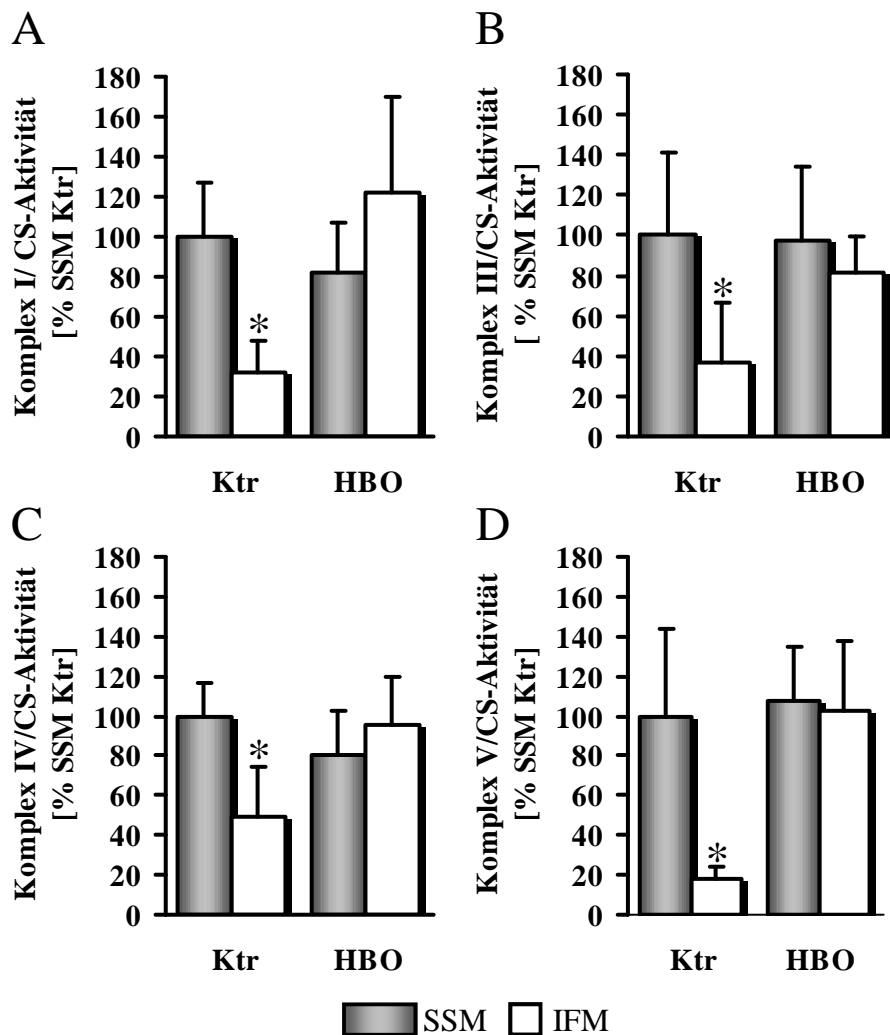


Abbildung 6: Veränderung der enzymatischen Aktivitäten bezogen auf die Citratsynthase-Aktivität (CS) von Komplex I (A), Komplex III (B), Komplex IV (C) und Komplex V (D) durch hyperbare Oxygenierung in SSM (ausgefüllte Balken) und IFM (leere Balken) des Schweins; Komplex I Aktivitätsmessung nach Hatefi und Stempel (Hatefi and Stempel, 1967); Angaben in % der SSM-Kontrolle als Mittelwert \pm Standardabweichung von n=5 unabhängigen Experimenten; *p<0,05

Obwohl die spektrophotometrischen Enzymaktivitätsassays spezifische Inhibitoren für die jeweils anderen Komplexe enthielten, wurde die Spezifität der Aktivität des Komplexes I und V nochmals in *Blue Native*-Gelen durch eine katalytische in-Gel-Färbung bestätigt. Die katalytische Färbung des Komplex I beruht auf der Präzipitation von blau-violetten Formazan-Kristallen. Diese entstehen durch die Übertragung der aus der Oxidation von NADH frei gewordenen Elektronen auf NBT und dessen daraus resultierende Reduktion.

In der katalytischen Färbung des Komplexes I zeigten sich mehrere blau-violette Banden, die in unterschiedlicher Höhe liefen. Der Holo-Enzymkomplex I zeigte sich als Bande mit einer Größe von etwa 1 MDa. Darunter auftretende Färbungen stellen Assemblierungsvorstufen des Komplex I dar, die bereits NADH-oxidierende Eigenschaften aufweisen. Die über dem Holo-Enzymkomplex I auftretenden Färbungen stellen die Superkomplexe dar, in denen der Komplex I mit den Komplexen III, IV und V in unterschiedlichen Stöchiometrien assembliert ist. Es war eine deutliche Reduktion der Intensität des Formazan-Präzipitates in den IFM- Kontrollen im Vergleich zu den SSM-Kontrollen für den Holo-Enzymkomplex I zu erkennen. Die hyperbare Oxygenierung führte in den IFM zu einem stärkeren Präzipitat als in den IFM-Kontrollen und somit zu einem Anstieg der Komplex I-Aktivität, erreichte jedoch nicht das Niveau der SSM Kontrolle. Auffällig war die fehlende Färbung der Superkomplexe in den IFM-Kontrollen. Auch hier führte die HBO-Behandlung zu einer Rekonstitution dieser (Abbildung 7 A).

Die katalytische in-Gel-Färbung des Komplex V beruht auf der Komplex V-abhängigen Spaltung von ATP. Die dabei freiwerdende Phosphatgruppe wird unter der Bildung von Bleiphosphat auf Bleinitrat übertragen. Bleiphosphat ist unlöslich und präzipitiert somit. Die Menge des präzipitierten Bleiphosphats ist proportional zu der enzymatischen ATP-Hydrolyse. In dem für Komplex V katalytisch-gefärbten Gel zeigte sich eine Bande bei einer Größe von ca. 600 kDa, die dem Holo-Enzymkomplex F_1F_0 -ATPase entspricht. Darunter wurde eine zweite Bande gefärbt, die der F_1 -Untereinheit mit einer Größe von ca. 370 kDa entspricht und auch ATP-Hydrolyse-Eigenschaften besitzt. Auffallend war hier, dass keine Bleiphosphat-Präzipitation in den IFM Kontrollen zu erkennen war, d.h. dass diese Proben keinerlei F_1F_0 -ATPase-Aktivität aufwiesen. Eine vollständige Rekonstitution der F_1F_0 -ATPase-Aktivität in den IFM wurde durch die Behandlung mit hyperbarem Sauerstoff erreicht. Die Menge des Präzipitates in diesen Proben entsprach denen der SSM (Abbildung 7 B).

Voneinander unabhängige Methoden zeigen also, dass in den Schweineherzen unter Kontrollbedingungen eine erhebliche Funktionsbeeinträchtigung der Atmungskette der interfibrillären Mitochondrien vorliegt, während durch HBO die Atmungskettenfunktion dieser normalisiert wird.

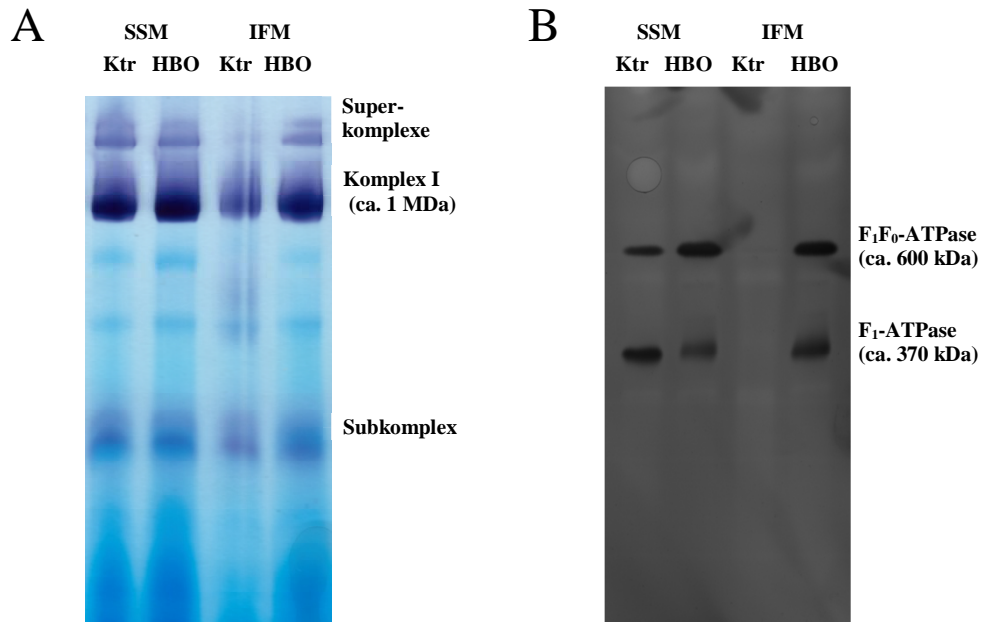


Abbildung 7: katalytische in-Gel-Färbung der Atmungskettenkomplexe des Schweins nach *Blue Native PAGE* repräsentativ für 3 unabhängige Experimente. A: Färbung der NADH-Oxidase-Aktivität (Komplex I) in SSM und IFM mit und ohne HBO-Behandlung; B: Färbung der ATPase-Aktivität (F₁F₀-ATPase) als Holo-Enzymkomplex bei 600 kDa und als F₁-Untereinheit bei ca. 370 kDa in SSM und IFM mit und ohne HBO-Behandlung

3.1.2 *Abhängigkeit des Respirations-Komplex-Zusammenbaus von der subzellulären Lokalisierung und der Sauerstoffverfügbarkeit*

Um zu überprüfen, ob die reduzierten Komplex-Aktivitäten in den IFM-Kontrollen auf einer Inhibition bereits existierender Komplexe oder aber auf einem veränderten Zusammenbau der einzelnen Komplexe beruhen, wurde die *Blue Native PAGE* durchgeführt und die respiratorischen Komplexe ihrer Größe entsprechend nativ elektrophoretisch aufgetrennt und das Gel anschließend mit Coomassie gefärbt. Abbildung 8A zeigt ein solches *Blue Native-Gel*. Die gleichbleibende Intensität der Coomassie-Färbung des Komplex III in allen Proben schließt Artefakte hinsichtlich unterschiedlich aufgetragener Proteinmengen aus. Im Allgemeinen scheinen weniger Respirationskomplexe in den IFM-Kontrollen vorhanden zu sein. Besonders auffällig ist das visuell völlige Fehlen der F₁F₀-ATPase - sowohl des Holo-Enzyms bei ca. 600 kDa als auch der F₁-Untereinheit bei ca. 370 kDa - in diesen Proben. Eine vollständige Rekonstitution des Komplexes wurde durch die hyperbare Oxygenierung erreicht. Diese führte auch zu einem Anstieg der anderen Komplexe auf SSM-Niveau.

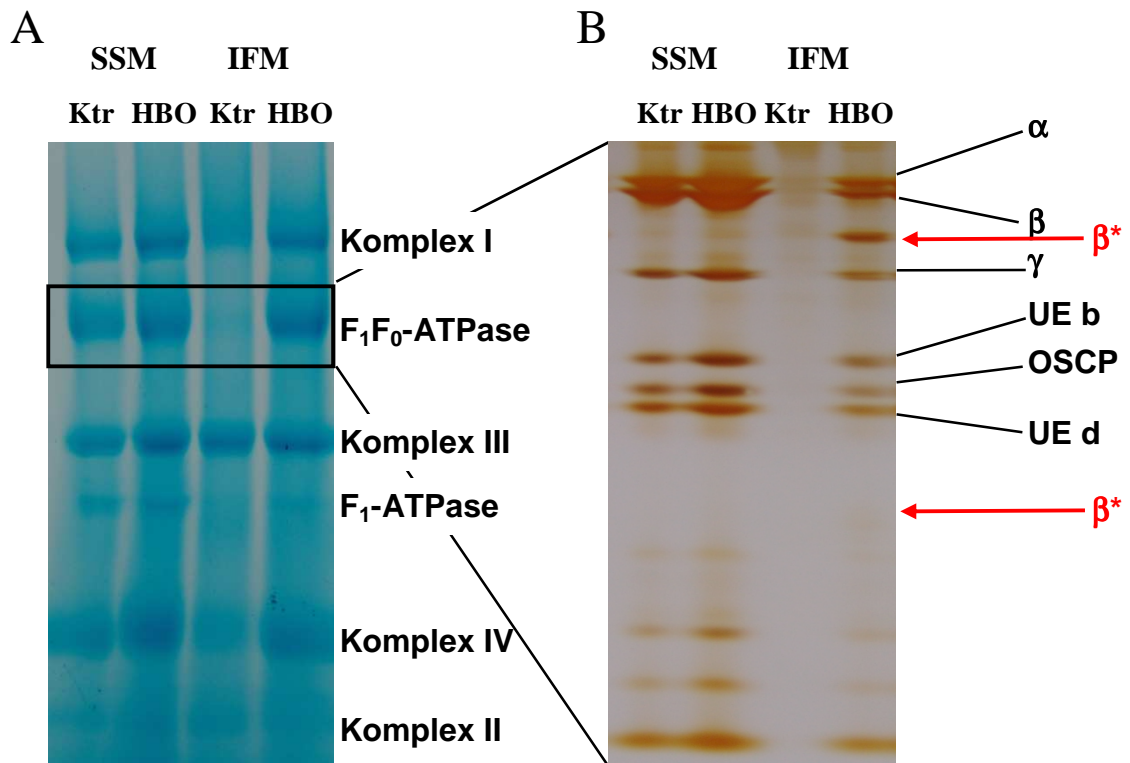


Abbildung 8: Darstellung der Atmungskettenkomplexe in den mitochondrialen Subpopulationen des Schweins mit und ohne HBO-Behandlung nach elektrophoretischer Auftrennung in einem *Blue Native-Gel* (A); Auftrennung der mit einem Skalpell ausgeschnittenen Komplexe V in einem Tricin-SDS-Gel als 2. Dimension; Darstellung von zusätzlichen Untereinheiten nach HBO-Behandlung in den IFM (roter Pfeil)(B); repräsentativ für 3 unabhängige Experimente

Aufgrund des visuell völligen Fehlens der F_1F_0 -ATPase in den IFM-Kontrollen wurde die Expression der F_1F_0 -ATPase-Untereinheiten überprüft. Dazu wurden in einem ersten Ansatz aus einem *Blue Native-Gel* die dem Komplex V entsprechenden Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in einer zweiten Dimension elektrophoretisch aufgetrennt. Die anschließende Silberfärbung (Abbildung 8 B) zeigte, dass in den IFM-Kontrollen nur einige Untereinheiten exprimiert sind. In den IFM-HBO traten Banden auf, die in den SSM nicht vorhanden waren. Eine deutliche zusätzliche Bande liegt zwischen den Untereinheiten β und γ bei einer Größe von etwa 50 kDa. Eine zweite zusätzliche aber nur sehr schwache Bande war unterhalb der Untereinheit d bei ca. 10-15 kDa zu erkennen. Um diese zusätzlichen Banden identifizieren zu können, wurde die Analyse wiederholt, das Gel mit kolloidalem Coomassie gefärbt und die Banden für eine massenspektrometrische Analyse ausgeschnitten. Die MS/MS-Analyse ergab für beide Banden Abbauprodukte der β -Untereinheit.

In einem zweiten Ansatz wurden die Expression der F_1F_0 -ATPase-Untereinheiten mittels Western Blot untersucht. In diesen zeigte sich, dass alle untersuchten Untereinheiten auch in den IFM-Kontrollen exprimiert wurden (Abbildung 9). Generell war die Expression in den IFM-Kontrollen deutlich geringer als in den SSM und auch in den IFM-HBO. Die zusätzlichen Abbauprodukte der β -Untereinheit in den IFM konnten auch in den Western Blots nachgewiesen werden. Außerdem zeigten sich in diesen auch Abbauprodukte der α -Untereinheit.

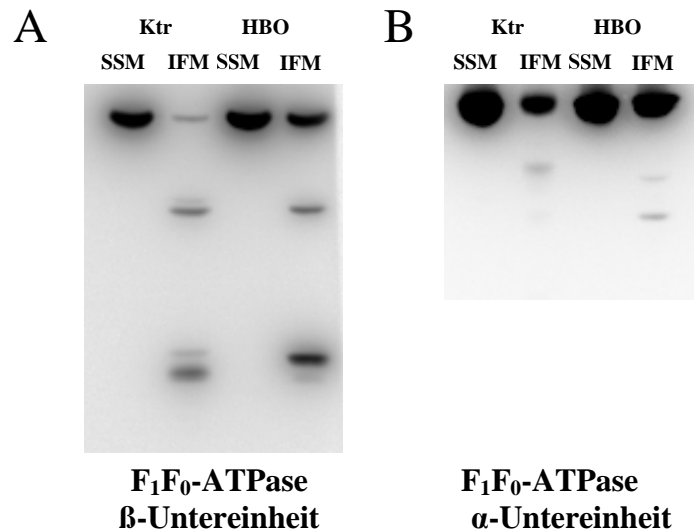


Abbildung 9: Western-Analyse von Komplex V-Untereinheiten in SSM und IFM des Schweins mit und ohne HBO-Behandlung; A: Antikörpernachweis der Abbauprodukte der β -Untereinheit in den IFM; B: Antikörpernachweis der Abbauprodukten der α -Untereinheit in den IFM; repräsentativ für 3 unabhängige Experimente

Um eine ungleiche Proteinbeladung der Gele auszuschließen, wurde eines der SDS-Gele mit Coomassie gefärbt (Abbildung 10).

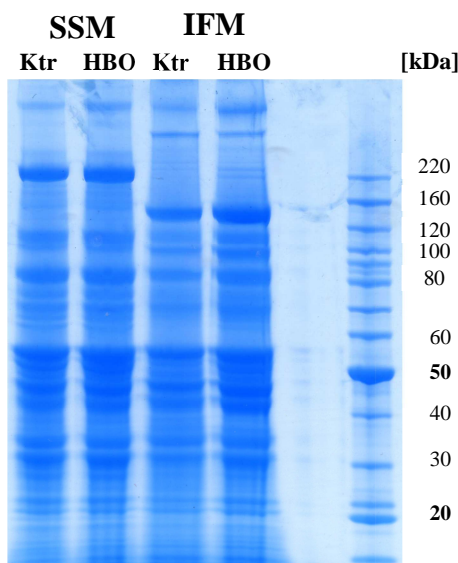


Abbildung 10: elektrophoretische Auftrennung der mitochondrialen Subpopulation des Schweins mit und ohne HBO- Behandlung – Coomassie-Färbung; repräsentativ für 3 unabhängige Experimente

Die durch HBO aufhebbare Funktionseinschränkung der Atmungskette der IFM ist also mit einem Defizit an wichtigen Untereinheiten der Atmungskette verbunden

3.1.3 mtDNA-unabhängige Modulation der RNA-Expression von mitochondrial-kodierten Komplex-Untereinheiten durch hyperbare Oxygenierung

Da in den IFM-Kontrollen nicht nur eine generelle Reduktion der Enzymaktivitäten sondern auch in der Menge der assemblierten Respirationskomplexe zu sehen war, wurde die mitochondriale Genexpression und die Expression potentieller Regulatoren auf RNA-Ebene untersucht. Auch hier wurden zwei Herangehensweisen gewählt. Zum einen wurde mitochondriale RNA direkt aus den Mitochondrienpopulationen isoliert und zum zweiten die Gesamt-RNA aus linksventrikulärem Gewebe. Um Verunreinigungen mit mitochondrialer DNA auszuschließen wurde die RNA in beiden Fällen einem DNase I-Verdau unterzogen. Es wurden die Expressionslevel der 12S rRNA (als Repräsentative des Primärtranskriptes 1), von ND1, COX1 und ATPase6 (als Repräsentative des Primärtranskriptes 2) sowie von ND6 (als Repräsentative des Primärtranskriptes 3) gemessen.

Bei der direkt mitochondrial-isolierten RNA bildete sich in den IFM-Kontrollen ein erheblich kleineres Pellet, so dass beide IFM-Gruppen in einem deutlich geringeren Volumen DEPC-H₂O als die SSM gelöst werden mussten. Daher ist ein direkter Vergleich nur innerhalb der IFM bzw. der SSM möglich. Während die Expressionslevel der gemessenen Gene sich innerhalb der SSM nicht unterschieden (Abbildung 11A), zeigten sich deutliche Unterschiede innerhalb der IFM. Wie der Abbildung 11B zu entnehmen ist, führte die hyperbare Oxygenierung in allen Genen, mit Ausnahme von ND1, zu einer signifikant gesteigerten Expression. Dabei steigerte sich die mitochondriale RNA-Expression der 12S rRNA auf $226\pm 22\%$, die von ND1 auf $127\pm 5\%$, die der ATPase6 auf $203\pm 9\%$, die der Cox1 auf $146\pm 8\%$ und die von ND6 auf $160\pm 25\%$.

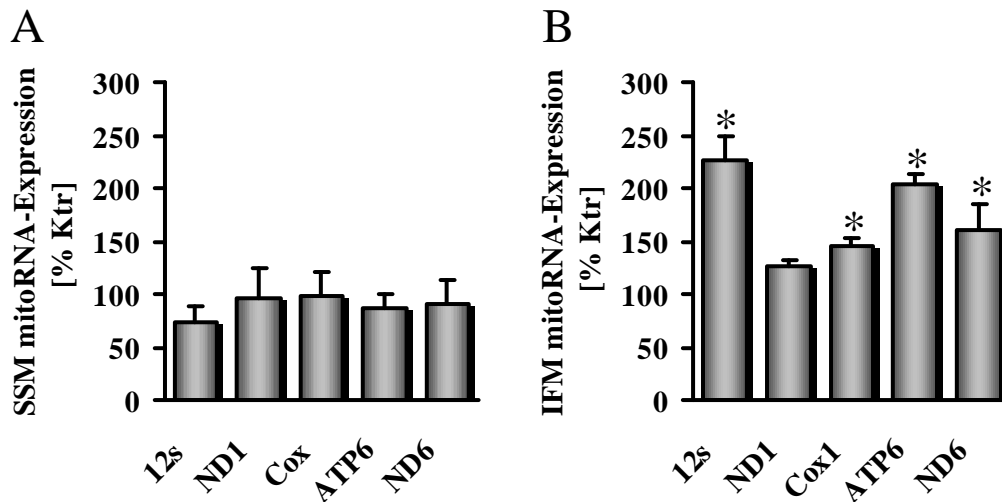


Abbildung 11: Genexpressionslevel mitochondrial-kodierter Komplexuntereinheiten in SSM (A) und IFM (B) des Schweins nach hyperbarer Oxygenierung bezogen auf die jeweiligen Kontrollen in mitochondrialer RNA; Angaben in % als Mittelwert \pm Standardabweichung von n=3 unabhängigen Experimenten; *p<0,05

Bestätigt wurden diese Daten durch die Expressionsanalyse der Gesamt-RNA. Auch hier führte die gesteigerte Verfügbarkeit des Sauerstoffs zu einem generellen Anstieg der mitochondrial-kodierten Komplex-Untereinheiten (Abbildung 12).

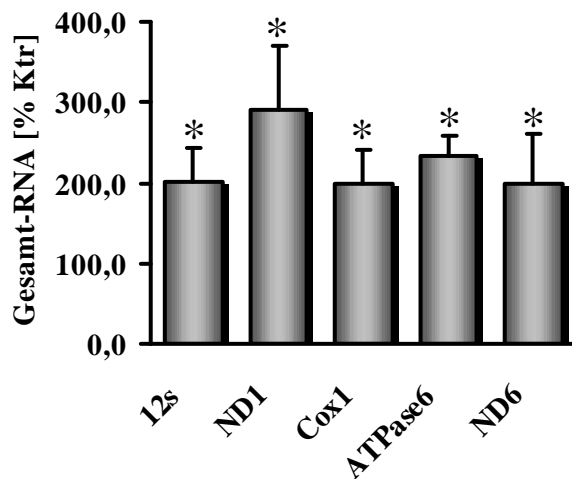


Abbildung 12: Genexpressionslevel mitochondrial-kodierter Komplexuntereinheiten nach hyperbarer Oxygenierung in der Gesamt-RNA des Schweins; Angaben in % der Kontrolle als Mittelwert \pm Standardabweichung von n=3 unabhängigen Experimenten; *p<0,05

Um zu analysieren, ob die herabregulierte RNA-Expression der mitochondrial-kodierten Komplex-Untereinheiten auf dem Vorhandensein geringerer mtDNA-Molekülen beruht, wurde der mtDNA-Gehalt mittels quantitativer PCR gemessen. Wie der Abbildung 13 A entnommen werden kann, gibt es keine Hinweise auf mtDNA-abhängige Effekte, da es keine signifikanten Unterschiede zwischen den SSM und IFM weder in den Kontrollen noch nach HBO-Behandlung gibt. Tendenziell sind im Vergleich zu den SSM-Kontrollen

sogar mehr mtDNA-Moleküle in den IFM-Kontrollen enthalten. Einen eventuellen Abbau der mtDNA schlossen Southern-Analysen aus (Abbildung 13 B). In diesen wurde das Ergebnis der quantitativen PCR zusätzlich bestätigt.

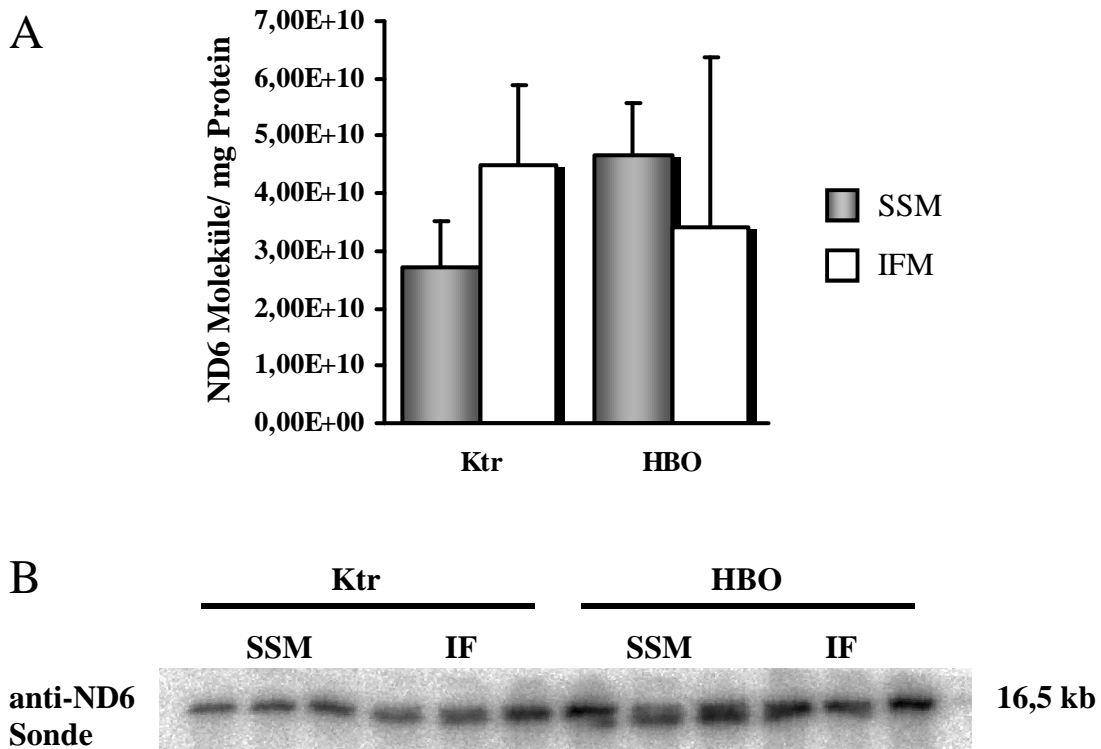


Abbildung 13: Veränderung der mtDNA-Level in SSM (ausgefüllter Balken) und IFM (leerer Balken) des Schweins nach hyperbarer Oxygenierung; A: Bestimmung der mtDNA mittels quantitativer PCR; Angabe in ND6-Molekül-zahl/mg Protein als Mittelwert \pm Standardabweichung; B: repräsentativer Southern Blot

Der Funktionseinschränkung der IFM unter Normoxie liegt also eine verminderte Expression mitochondrial-kodierter Proteine der Atmungskette zugrunde.

3.1.4 Hyperbare Oxygenierung induziert die Expression mitochondrialer Regulatoren

Die mitochondriale Transkription ist maßgeblich von der Tfam-Expression abhängig. Ein weiteres Schlüsselmolekül in der Regulation der mitochondrialen Biogenese und somit auch der Funktion ist PGC1 α . Um Hinweise zu erhalten, ob die erhöhte Expression der mitochondrial-kodierten Untereinheiten unter HBO von diesen Regulatoren abhängig ist, wurde in der Gesamt-RNA die Expression beider untersucht.

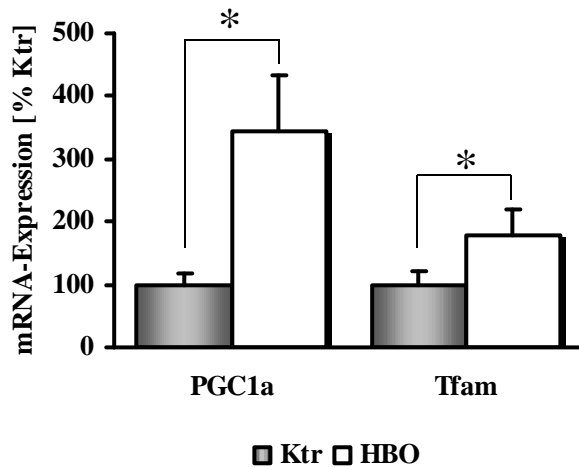


Abbildung 14: Veränderung der mRNA-Expression von PGC1 α und Tfam durch hyperbare Oxygenierung im Schwein; Angaben in % der Kontrolle als Mittelwert \pm Standardabweichung von n= 3 unabhängigen Experimenten; *p<0,05

Das Resultat ist in Abbildung 14 dargestellt und zeigt, dass die hyperbare Oxygenierung zu einer signifikant erhöhten Expression von PGC1 α (344,2 \pm 89,4 %) und Tfam (178,5 \pm 40,0 %) führte.

Die Hyperoxygenierung beeinflusst also auch Kern-kodierte Regulatoren der mitochondrialen Biogenese.

3.1.5 Reflektion der mitochondrialen Atmung durch den Matrix-pH

Um die Bedeutung der Sauerstoff-kontrollierten Atmungskettenaktivität auf das mitochondriale Membranpotential zu untersuchen, wurde der Matrix-pH mit dem Fluoreszenzfarbstoff BCECF gemessen. Es zeigte sich eine Abhängigkeit des Matrix-pH von der Respirationsaktivität. Abbildung 15 zeigt, dass die SSM-Kontrollen den höchsten Matrix-pH mit einem Wert von 8,6 \pm 0,5 aufzeigten. Dieser Wert betrug unter hyperbarer Oxygenierung 7,6 \pm 0,6 (nicht signifikant verändert). Den geringsten Matrix-pH zeigten die IFM-Kontrollen mit 6,7 \pm 0,2, der durch eine erhöhte Sauerstoffverfügbarkeit signifikant auf 7,8 \pm 0,7 anstieg. Es waren keine Unterschiede in den Matrix-pH der SSM und IFM nach der hyperbaren Oxygenierung zu sehen.

Das Ansäuern der IFM-Matrix unter Kontrollbedingungen entspricht der gemessenen geringen Atmungsketten-Aktivität der IFM und ist mit der in Abbildung 4 erläuterten Hypothese von Skulachev nicht vereinbar.

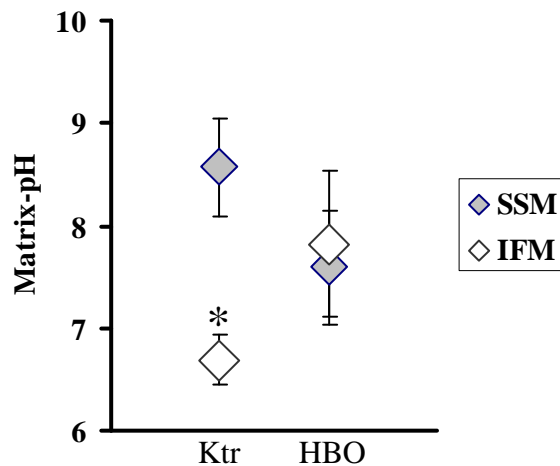


Abbildung 15: Einfluss der erhöhten Sauerstoffverfügbarkeit (HBO) auf den mitochondrialen Matrix-pH in SSM (ausgefüllter Balken) und IFM (leerer Balken) des Schweins; Angabe in pH-Einheiten als Mittelwert \pm Standardabweichung von $n=5$ unabhängigen Experimenten; * $p < 0,05$

3.1.6 Mitochondriale Cytochrom *c* Retention und Opa-1-Expression

Eine reduzierte Aktivität der Atmungskette resultiert in einem niedrigen Membranpotential. Ein niedriges Membranpotential steht in engem Zusammenhang mit der Induktion mitochondrial-vermittelter Apoptose und der Freisetzung von proapoptischen Proteinen, wie Cytochrom *c* (Green and Reed, 1998). Die Freisetzung von Cytochrom *c* ist eng an die Expression von Opa-1 gekoppelt (Arnoult et al., 2005). Mittels Western-Analysen wurde der Gehalt an Cytochrom *c* sowie die Opa-1-Expression untersucht. Die Protein-Expression wurde auf das mitochondriale Markerprotein VDAC abgeglichen. Der Cytochrom *c*-Gehalt war in den IFM-Kontrollen (242 ± 5 %) signifikant gegenüber den SSM-Kontrollen (100 ± 43 %) erhöht. Die hyperbare Oxygenierung führte in beiden Populationen zu einem weiteren, aber nicht signifikanten Anstieg der Cytochrom *c*-Expression (Abbildung 16).

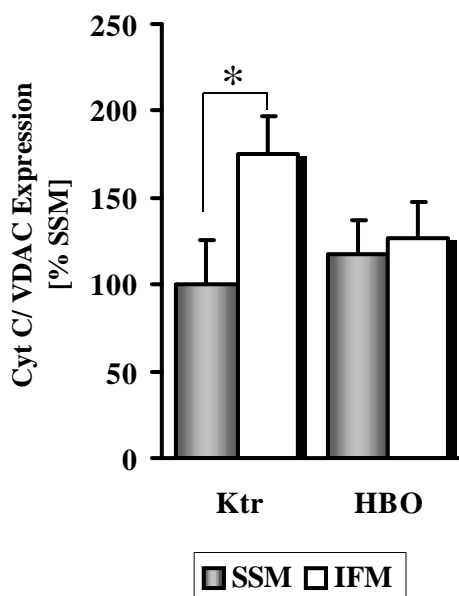


Abbildung 16: Unterschiede des Cytochrom *c*-Gehaltes in SSM (ausgefüllter Balken) und IFM (leerer Balken) des Schweins in Abhängigkeit von der Sauerstoffverfügbarkeit (HBO); Abgleich der Cytochrom *c*-Expression auf die VDAC-Expression; Angaben in % der SSM-Kontrolle als Mittelwert \pm Standardabweichung von $n=3$ unabhängigen Experimenten; * $p < 0,05$

Opa-1 wurde in allen Proben exprimiert, wobei die Expression in den IFM leicht reduziert war. Auffällig ist hier das unterschiedliche Expressionsmuster der Opa-1-Transkripte zwischen den Subpopulationen (Abbildung 17). Diese Befunde sprechen daher nicht für einen pro-apoptotischen Phänotyp der IFM der Kontrolltiere.

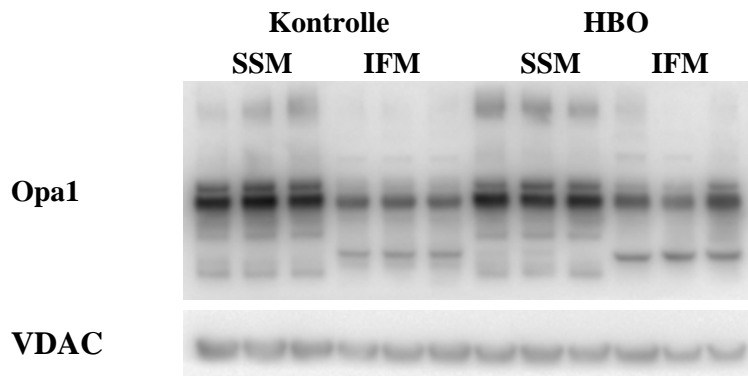


Abbildung 17: Unterschiede in der Opa-1-Transkript-Expression zwischen SSM und IFM des Schweins mit und ohne HBO-Behandlung (oben) dargestellt im Western Blot; Beweis einer einheitlichen Proteinauftragung durch die VDAC-Expression (unten)

3.1.7 Sauerstoffmangel verschiebt den mitochondrialen Substrat-Metabolismus

Um zu untersuchen, ob eine veränderte Sauerstoffverfügbarkeit Einfluss auf den mitochondrialen Metabolismus hat, wurden die Aktivitäten der Aconitase als Schlüsselenzym des Krebs-Zyklus und der Acyl-CoA-Dehydrogenase als repräsentatives Enzym der mitochondrialen Beta-Oxidation der Fettsäuren in SSM und IFM analysiert.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der spezifischen Aconitase-Aktivität in den SSM-Kontrollen (15 ± 9 U/mg) und in den SSM nach der HBO-Behandlung (11 ± 5 U/mg). Dagegen war in den IFM-Kontrollen keine Aconitase-Aktivität zu messen und auch die hyperbare Oxygenierung führte nur zu einem sehr geringen Anstieg ($0,16 \pm 0,14$ U/mg). Die spezifischen Aconitase-Aktivitäten sind in Abbildung 18 dargestellt. Zu beachten ist hier aufgrund der extremen Aktivitätsdifferenzen zwischen SSM und IFM die unterschiedliche Skalierung der Achsen.

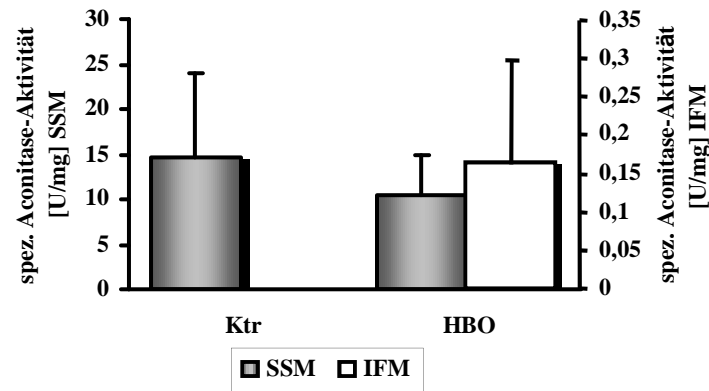


Abbildung 18: Veränderung der spezifischen Aconitase-Aktivität in SSM (ausgefüllter Balken) und IFM (leerer Balken) des Schweins durch die hyperbare Oxygenierung; Angaben als Mittelwert±Standardabweichung von n=5 unabhängigen Experimenten

Die Analyse der spezifischen Acyl-CoA-Dehydrogenase-Aktivität ergab keine signifikanten Differenzen zwischen den SSM-Kontrollen ($5e-4 \pm 3e-4$ U/mg) und SSM-HBO ($10e-4 \pm 6e-4$ U/mg) sowie zwischen den IFM-Kontrollen ($25e-4 \pm 16e-4$ U/mg) und den IFM-HBO ($17e-4 \pm 9e-4$ U/mg). Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied bei dem Vergleich von SSM- und IFM-Kontrollen (Abbildung 19).

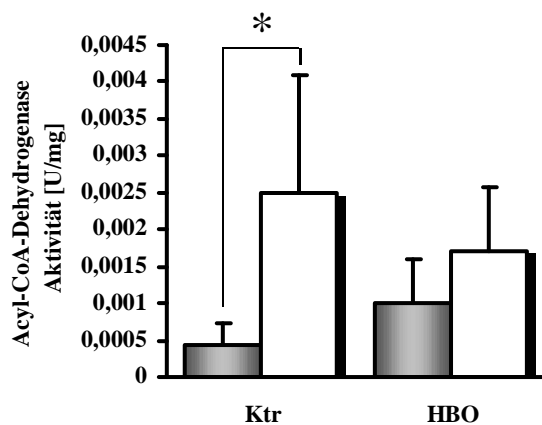


Abbildung 19: Veränderung der spezifischen Acyl-CoA-Dehydrogenase-Aktivität in SSM (ausgefüllter Balken) und IFM (leerer Balken) des Schweins durch eine erhöhte Sauerstoffverfügbarkeit (HBO); Angaben als Mittelwert±Standardabweichung von n=5 unabhängigen Experimenten

Diese Daten zu Schlüsselenzymen des mitochondrialen Substrat-Metabolismus passen zu der Annahme, dass in den Kontrollschweinen die Kern-nahen IFM unzureichend oxygeniert sind.

Insgesamt sprechen die Befunde des Abschnitts 3.1. dafür, dass in den normoxischen Kontrolltieren die IFM, nicht aber den SSM, einer regulierten Funktionseinschränkung als Anpassung an eine Hypoxie unterliegen, und dass eine hyperbare Oxygenierung diese Funktionseinschränkung der IFM weitgehend aufhebt. Mitochondriale Funktionsein-

schränkungen im Inneren von Kardiomyozyten von veterinär-medizinisch gesunden Jungschweinen waren ein völlig unerwarteter Befund. Das führte zu der Spekulation, dass die durch die unnatürliche Stallhaltung erzwungene körperliche Inaktivität dafür verantwortlich sein könnte. Tatsächlich haben spätere Untersuchungen der Arbeitsgruppe Szibor, die nicht mehr Gegenstand der hier vorgelegten Dissertation sind, diese Spekulation bestätigt: Schweine unter Haltung nach Richtlinien des Biolandbauers mit großen Möglichkeiten zum Auslauf und mit normaler körperlicher Aktivität zeigen nicht die hier gezeigten Funktionseinschränkungen der kardialen IFM.

3.2 Winterschlaf als Model der mitochondrialen Funktions-Modulation

Für den weiteren Beweis der Hypothese, dass eine körperliche Inaktivität zu einer Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion führt, wurden Untersuchungen am Syrischem Hamster (*Mesocricetus auratus*), einem Winterschläfer, durchgeführt. In diesen Tieren wurde der Winterschlaf induziert und die Tiere entsprechend ihres angenommenen physischen Status in drei Gruppen unterteilt. Gruppe I stellt die Kontroll-Tiere, Gruppe II die in ihrer Bewegung reduzierten Tiere und Gruppe III die Tiere, die den Torpor erreicht haben. Der Torpor wird hierbei als ein Zustand körperlicher Starre angesehen, bei dem Stoffwechselprozesse auf ein Minimum herabgesetzt sind. Die Experimente erfolgten auch hier an den mitochondrialen Subpopulationen.

3.2.1 Reduktion der körperlichen Aktivität durch Induktion des Winterschlafes

Um den Einfluss einer körperlichen Inaktivität auf die mitochondriale Funktion des Herzens zu untersuchen, wurden die Hamster durch Reduktion der Licht-Dunkel-Zeiten sowie Reduktion der Umgebungstemperatur in einen Winterschlaf-ähnlichen Zustand versetzt. Abbildung 20 zeigt, wie die Bewegung der Tiere mit längeren Licht-Dunkel-Zeiten und sinkender Temperatur abnahm. Schon mit einer Reduktion der Licht-Dunkel-Zeit von 2 Stunden und einer Temperaturerniedrigung um 2 °C wurde eine deutlich geringere Bewegungsaktivität der Hamster (B) gegenüber den Kontrolltieren (A) gemessen, welche durch eine weitere Reduktion der Licht-Dunkel-Zeit (2 Stunden hell: 22 Stunden dunkel) sowie der Temperatur (5 °C) noch weiter abnahm.

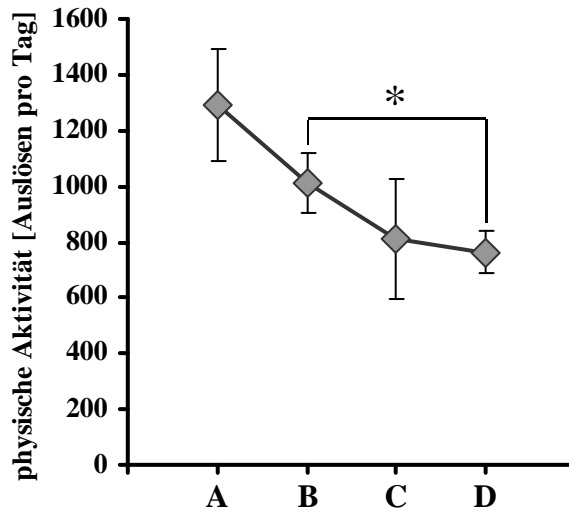


Abbildung 20: Reduktion der körperlichen Aktivität im Syrischem Hamster durch Induktion der Hibernation; A: 12 h hell-12 h dunkel bei 22 °C (entspricht der Kontroll-Gruppe I); B: 10 h hell-14 h dunkel bei 20 °C; C: 08 h hell-16 h dunkel bei 16 °C (entspricht Gruppe II); D: 02 h hell: 22 h dunkel bei 5 °C (entspricht der Torporgruppe III); Angaben als Mittelwert±Standardabweichung mit n=6; *p<0,05

3.2.2 Beeinträchtigung des mitochondrialen Elektronenflusses mit abnehmender körperlichen Aktivität

Aufgrund des geringen Probenmaterials wurden nicht die Enzymaktivitäten aller Komplexe gemessen, sondern nur die Rate der Cytochrom *c*-Reduktion (Komplex I+III) als Marker des Elektronenflusses sowie die Citratsynthese für die Normalisierung gemessen. In der Kontrollgruppe zeigten die IFM ($0,3 \pm 0,1$) eine höhere Cytochrom *c*-Reduktionsrate gegenüber den SSM ($0,2 \pm 0,05$). Sowohl in den SSM als auch in den IFM nahm diese Aktivität in den Gruppen II und III ab, wobei die IFM ($0,04 \pm 0,001$) einen überproportionalen Aktivitätsverlust gegenüber den SSM ($0,1 \pm 0,004$) aufwiesen (Abbildung 21).

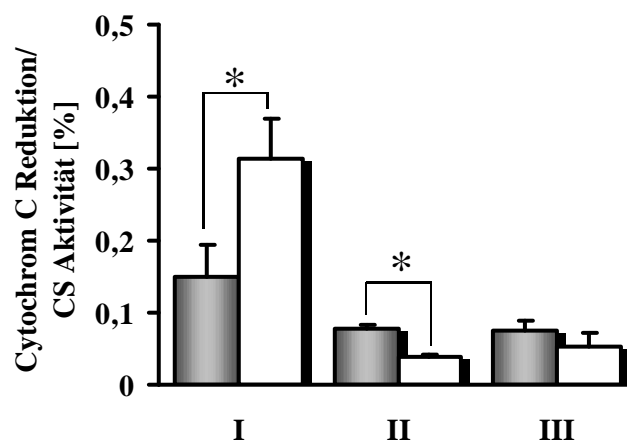


Abbildung 21: Veränderung der Cytochrom *c* Reduktionsrate im Syrischem Hamster in SSM (ausgefüllte Balken) und IFM (leerer Balken) mit Abnahme der Bewegungs-Aktivität; Abgleich der Enzymaktivitäten auf die Citratsynthese-Aktivität; Angaben in % als Mittelwert±Standardabweichung von n=3 unabhängigen Experimenten; *p<0,05; #p<0,05 bezogen auf die gesamte Gruppe

Die Befunde des Abschnitts 3.2 zeigen, dass eine Kapazitätseinschränkung der mitochondrialen Atmungsfunktion im Säugerherzen prinzipiell möglich ist.

3.3 Dilatative und ischämische Kardiomyopathie

Sowohl die linksventrikuläre dilatative als auch die ischämische Kardiomyopathie gehen mit einer Abnahme bis hin zum Verlust der Herzfunktion einher. Im Endstadium dieser Erkrankung sind die Patienten bettlägerig. Nach der eben angesprochenen Überlegung zur Rolle von körperlicher Inaktivität müsste die IFM-Population dieser Patienten in ihrer mitochondrialen Funktion beeinträchtigt sein.

Aus je 3 DCM- und ICM linksventrikulären humanen Patientenproben wurden mitochondriale Subpopulationen isoliert und analysiert. Aufgrund des extrem begrenzten Probenmaterials und der Nicht-Verfügbarkeit von Kontroll-Probenmaterial wurde auf die Messung der Enzymaktivitäten verzichtet.

3.3.1 Reduzierte β -ATPase-Proteinexpression in DCM und ICM

Da im Schweinemodell in den IFM-Kontrollen der Komplex V nicht-assembliert, die Proteinexpression der Untereinheiten reduziert war und Abbauprodukte u.a. von der β -ATPase-Untereinheit exprimiert wurden, wurde in den Patientenproben die Expression dieser Untereinheit untersucht. Um in diesen Proben eine gleichmäßige Proteinbeladung nachzuweisen, wurde die VDAC-Expression gemessen.

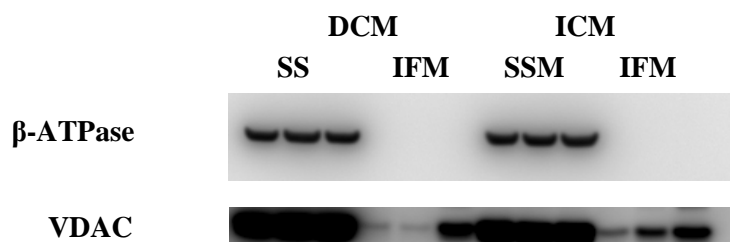


Abbildung 22: Proteinexpression der β -ATPase-Untereinheit in den mitochondrialen Subpopulationen von Patienten mit DCM und ICM (oben) dargestellt im Western Blot; VDAC-Protein-Expression als Marker der Proteinladung (unten)

Wie in den Western Blots der Abbildung 22 zu sehen ist, ist die β -ATPase-Untereinheit in den IFM nicht exprimiert bzw. unterlag den Detektionsgrenzen der Western Blot-Methode, da auch durch das Auftragen größerer Proteinmengen und eine Überbelichtung des Blots

keinerlei Signale für die IFM erhalten werden konnten. Es waren auch keine β -ATPase-Untereinheit-Abbauprodukte zu verzeichnen. Die VDAC-Expression weist eine unterschiedliche Proteinbeladung zwischen SSM und IFM auf, die auch durch mehrmaliges Messen der Proteinkonzentration nicht behoben werden konnte.

3.3.2 Funktionsverlust der IFM durch Proteindegradation

Um auch in diesen Proben eine Integrität der IFM nachzuweisen, wurde die Expression von Opa-1 untersucht. In allen Proben war eine Expression der Opa-1-Transkripte zu verzeichnen, auch wenn diese Expression in den IFM sehr viel geringer ausfällt als in den SSM, was vermutlich auf die unterschiedliche Proteinbeladung zurückzuführen ist. Auch in diesen Proben unterschied sich das Opa-1-Transkript-Expressionsmuster zwischen den mitochondrialen Subpopulationen (Abbildung 23).

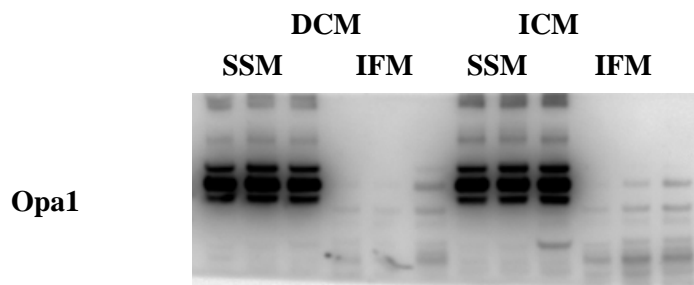


Abbildung 23: Unterschiede in der Opa-1-Transkript-Expression zwischen SSM und IFM in Patienten mit DCM bzw ICM dargestellt im Western Blot

Da der Verlust von Opa-1-Transkripten mit einer Protease-abhängigen mitochondrialen Fragmentierung einhergeht, wurde das Proteinexpressionsmuster in einem Coomassiegefärbten Gel untersucht, welches in Abbildung 24 dargestellt ist. Deutlich zu erkennen ist, dass beide Krankheiten sich hinsichtlich des Proteinmusters innerhalb der SSM und IFM nicht unterscheiden. Darüber hinaus sind in den IFM der Patienten kaum Proteine zu erkennen, die größer als 70 kDa sind. Dagegen findet man eine Anreicherung von Proteinen insbesondere im Bereich zwischen 10 und 15 kDa, was eine Protein-Degradation vermuten lässt und eine Erklärung gibt, weshalb trotz des Auftrags gleicher Proteinmengen keine einheitliche Markerprotein-Expression erreicht werden konnte.

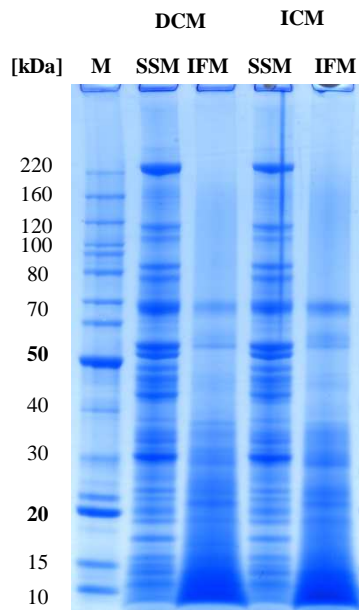


Abbildung 24: elektrophoretische Auftrennung der mitochondrialen Subpopulationen von Patienten mit DCM bzw. ICM – Coomassie-Färbung

Die Mitochondrien der bei der Transplantation entnommenen terminal insuffizienten Patientenherzen weisen so viele Veränderungen und Schäden auf, dass Hinweise auf eine Rolle der körperlichen Inaktivität hier nur wenig beweiskräftig sein können.

3.4 mNOA1 als Regulator der mitochondrialen Atmung

3.4.1 *In silico* Analyse von mNOA1

mNOA1, ein homologes Protein von atNOA1, war zu Beginn der Untersuchungen ein noch wenig aufgeklärtes Protein mit der behaupteten Funktion einer NO-Synthase. Um eine Vorstellung über mögliche molekulare Funktionen dieses Proteins zu bekommen, wurde es *in silico*-Analysen unterzogen. Die Analyse mit der Predict Protein Software (Rost et al., 2004) sagte das Vorkommen einer P-loop-GTPase-Domäne sowie ein nukleäres Lokalisierungssignal (NLS) vorher. Darüber hinaus wurde ein mitochondriales Import Signal (MTS) und somit eine mitochondriale Lokalisierung durch die Programme Mitoprot II (Claros and Vincens, 1996) und PSORT (Horton et al., 2007) vorausgesagt. Unter Verwendung von ePESTfind (Rogers et al., 1986) wurde eine PEST-Sequenz in der primären Proteinstruktur von mNOA1 prädiktiert. Des Weiteren wurde in dieser und der Sekundärstruktur (Bornberg-Bauer et al., 1998) auch das Vorhandensein einer basischen Leucin-Zipper-Domäne mit 2ZIP vorausgesagt. Diese prädiktierten Domänen sind in Abbildung 25 zusammengefasst.

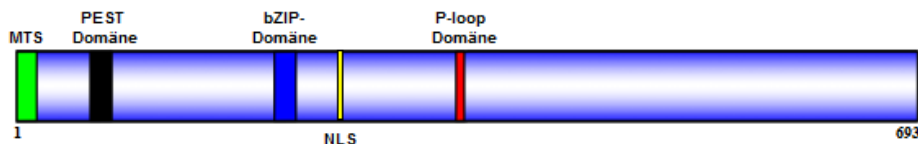


Abbildung 25: schematische Darstellung der primären Struktur von mNOA1 mit den *in silico* prädiktierten Domänen

3.4.2 *Expressionsprofil von mNOA1 in Maus-Gewebe*

Bevor mNOA1 in weitere Experimente einbezogen wurde, wurde die Expression des Proteins in verschiedenen Mausgeweben untersucht. Auf RNA-Ebene ist mNOA1 in allen untersuchten Organen, wenn auch in unterschiedlichem Maß, exprimiert. Wie der Abbildung 26 zu entnehmen ist, wurde die höchste Expression von mNOA1 in den Geweben mit quergestreifter Muskulatur gemessen. Daher wurden die weiteren *in vitro*-Experimente in der Myoblasten-Zelllinie C2C12 durchgeführt.

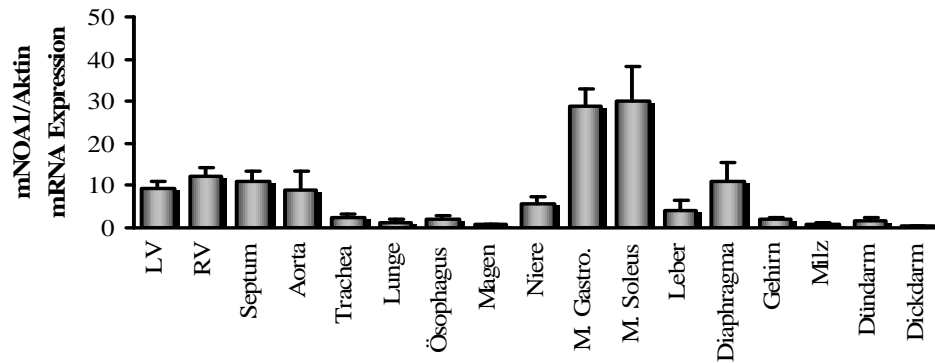


Abbildung 26: mNOA1-mRNA-Expression in Mausgeweben; Angabe der mNOA1- Expression bezogen auf die β -Aktin-Expression als Mittelwert \pm Standardabweichung von n=3 unabhängigen Experimenten; LV = linker Ventrikel, RV = rechter Ventrikel; M.Gastro. = *Musculus Gastrocnemius*, M.Soleus = *Musculus soleus*

3.4.3 Mitochondriale Lokalisation von mNOA1

Die *in silico*- Analyse mit MitoProt II ergab eine 84,9 %-ige Wahrscheinlichkeit einer mitochondrialen Lokalisierung von mNOA1. Um diese *in-vitro* zu überprüfen, wurde ein GFP-Fusionskonstrukt von mNOA1 generiert und in C2C12-Zellen überexprimiert. In diesen Zellen wurden die Mitochondrien mit Mito-Tracker gefärbt.

Wie in der Abbildung 27 deutlich zu erkennen ist, ergab die konfokal-mikroskopische Analyse eine vollständige Überlagerung der grünen Fluoreszenz des GFP-Fusionsproteins mit den rot-fluoreszierenden Mitochondrien und somit eine mitochondriale Lokalisierung von mNOA1.

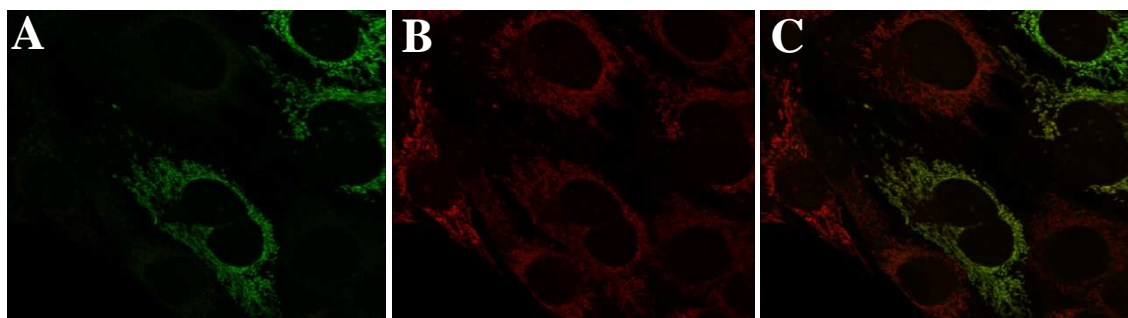


Abbildung 27: mitochondriale Lokalisation von mNOA1 durch konfokal-mikroskopische Analyse der GFP-mNOA1-Überexpression (A) mit der Mitochondrien-Färbung (B) und Überlagerung beider (C); repräsentative Abbildung von 3 unabhängigen Experimenten

Darüber hinaus wurde eine mitochondriale Lokalisierung von mNOA1 auch *in vivo* in Herz- und Lebermitochondrien der Maus durch Western-Analysen bestätigt (Abbildung 28).

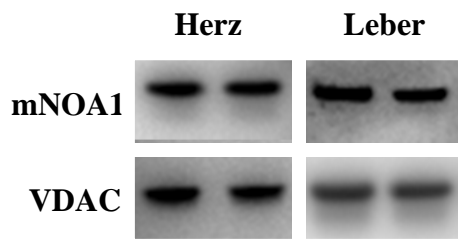


Abbildung 28: Proteinexpression von mNOA1 in Herz- und Lebermitochondrien der Maus; repräsentativ für 3 unabhängige Experimente

3.4.4 *mNOA1-abhängige Aktivierung der mitochondrialen Atmung*

NO ist ein wichtiger Modulator der mitochondrialen Funktion u.a. durch Stimulation der mitochondrialen Biogenese und Regulation der enzymatischen Aktivität der Atmungskettenkomplexe (Brown, 2007), was zur Einbeziehung der angeblichen NO-Synthase mNOA1 in die Untersuchungen zu dieser Dissertation führte. Spätere Analysen konnten jedoch keine direkte NO-Produktion durch mNOA1 zeigen (Zemojtel et al., 2006a). Trotzdem wurde dieses mitochondriale Protein als potentieller Mediator der kardialen Energiebereitstellung hinsichtlich eines Einflusses auf die mitochondriale Respiration untersucht. Dazu wurden mNOA1 in C2C12-Zellen stabil überexprimiert und die enzymatische Aktivität des Komplexes I mit zwei unterschiedlichen Methoden gemessen um eine Produktion von Superoxidradikalen durch den Komplex I bewerten zu können. In der ersten Methode, der Komplex I-Aktivitätsmessung nach Lenaz (Lenaz et al., 1995), wird die NADH-Oxidationsrate des Einzel-Komplexes I gemessen, während in der Methode nach Hatefi und Stempel (Hatefi and Stempel, 1967) die direkte Rate der Elektronenübertragung von Komplex I über Komplex III auf Cytochrom *c* gemessen wird. Abgeglichen wurden auch diese Aktivitäten auf das Markerenzym Citratsynthase und mit denen von Mock-transfizierten Zellen als Kontrolle verglichen.

Wie der Abbildung 29 zu entnehmen ist, führte die mNOA1-Überexpression zu keinen Veränderungen in der NADH-Oxidation durch Komplex I (119 ± 19 %) (Abbildung 29A), aber zu einer signifikant erhöhten Cytochrom *c*-Reduktionsrate (134 ± 10 %) gegenüber der Mock-Transfektion (Abbildung B).

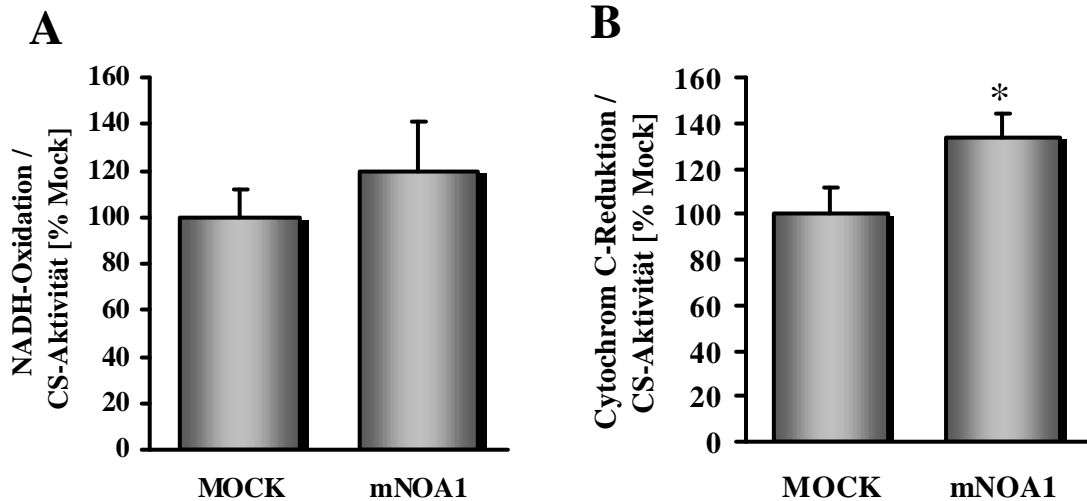


Abbildung 29: Veränderung der enzymatischen Aktivität der NADH-Oxidation (A) und Cytochrom *c*-Reduktion (B) durch Komplex I in stabil mNOA1-überexprimierenden Zellen Angabe in % der Mock-Transfektion als Mittelwert±Standardabweichung von n=5 unabhängigen Experimenten; *p<0,05

Neben dem Komplex I wurde auch die Komplex V-Aktivität in mNOA1-überexprimierenden Zellen bestimmt. Die mNOA1-Überexpression (171±38 %) führte zu einer signifikant erhöhten Komplex V-Aktivität im Vergleich zu Mock-transfizierten Zellen (Abbildung 30A).

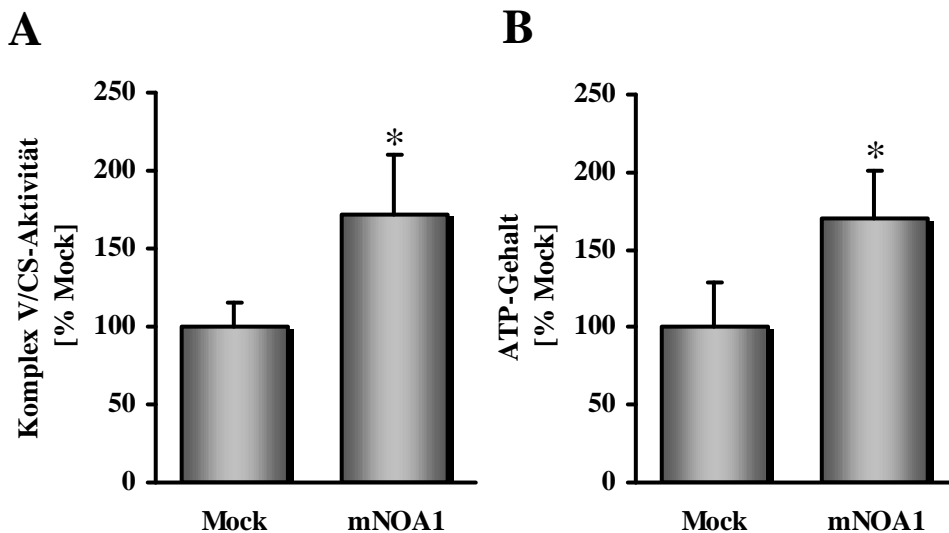


Abbildung 30: Veränderung der Komplex V-Aktivität in mNOA1-überexprimierenden Zellen (A), Erhöhung des ATP-Gehaltes durch die mNOA1-Überexpression (B); Angabe in % der Mock-Transfektion als Mittelwert±Standardabweichung von mindestens 3 unabhängigen Experimenten ; *p<0,05

Die durch mNOA1 erhöhte Komplex V-Aktivität ließ sich durch einen signifikant erhöhten ATP-Gehalt in mNOA1-überexprimierenden Zellen auf 170±31 % der Mock-Kontrolle bestätigen (Abbildung 30B).

3.4.5 Abhängigkeit der mNOA1-induzierten Cytochrom *c*-Reduktion von der P-Loop-Domäne

Sowohl mNOA1 als auch die orthologen Proteine anderer Spezies weisen keinerlei Homologie zu den bekannten NO-Synthasen auf, besitzen aber alle eine charakteristische P-Loop-GTPase-Domäne. Die P-Loop-Domäne ist charakterisiert durch die Konsensussequenz GXXXXGK(S/T), und kommt in vielen Nukleotid-bindenden Proteinen vor. Diese Domäne interagiert mit den Phosphatgruppen des Nukleotids sowie mit dem Magnesiumion und bleibt auch nach der Hydrolyse der Phosphatgruppe an den verbleibenden Phosphatgruppen gebunden ohne dabei selber eine signifikante Konformationsänderung zu erfahren.

Um eine GTPase-Abhängigkeit der in Abb. 29B gezeigten mNOA1-induzierten Cytochrom *c*-Reduktion zu untersuchen, wurde eine mNOA1-Mutante generiert, in welcher die P-Loop-Domäne durch den Aminosäureaustausch K353R mutiert ist (Lu et al., 2005).

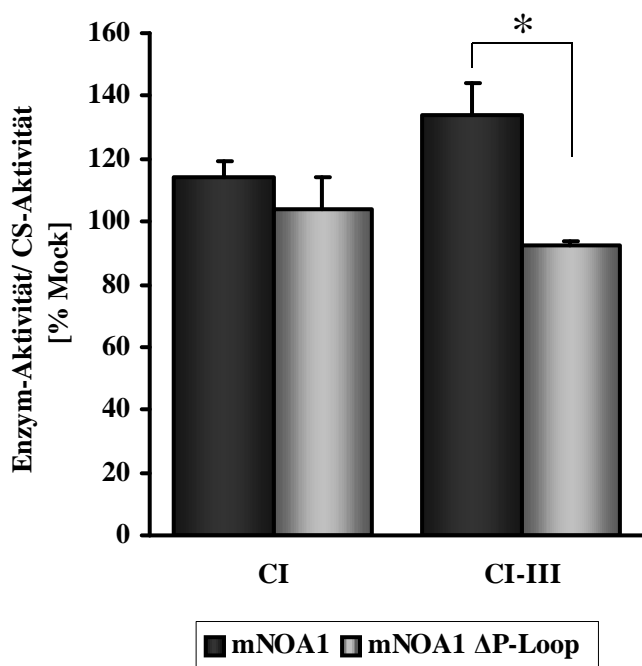


Abbildung 31: P-Loop-Domäne-abhängige Induktion der Cytochrom *c*-Reduktion durch mNOA1; Angabe in % der Mock-Transfektion als Mittelwert \pm Standardabweichung von n=3 unabhängigen Experimenten ; *p<0,05

Wie der Abbildung 31 entnommen werden kann, konnte die Mutante mNOA1 Δ P-Loop die Cytochrom *c*-Reduktion nicht induzieren.

3.4.6 mNOA1-Interaktionen

Rückschlüsse auf die Funktion von Proteinen lassen sich auch durch ihre Interaktionspartner ziehen. Um Interaktionspartner von mNOA1 zu detektieren, wurde eine SILAC-

basierte massenspektroskopische Analyse durchgeführt. Dazu wurden Co-Immunpräzitationen von stabil-transfizierten mNOA1-Flag Zellen angefertigt, die in Medium mit den schweren Isotopen der Aminosäuren gewachsen waren. Als Kontrolle dienten Co-Immunpräzitationen von Mock-transfizierten Zellen, die in normalem Medium gewachsen waren. Die Eluate der beiden Co-Immunpräzitationen wurden vereinigt, elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (Abbildung 32A). Diese eluierten Proteine wurden mit Trypsin verdaut und anschließend massenspektrometrisch durch Dr. Marcus Krüger analysiert.

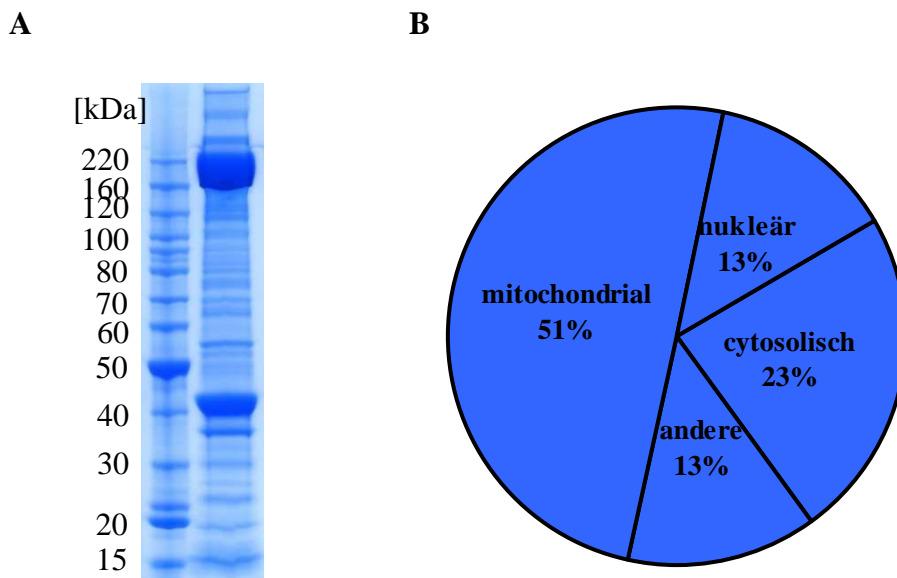


Abbildung 32: Interaktionspartner von mNOA1- Immunpräzitation ; repräsentative Coomassiefärbung der Immunpräzitation (A); Zellorganellverteilung der durch Massenspektrometrie identifizierte Proteine (B)

Es wurden 773 Proteine massenspektrometrisch identifiziert. Diese Proteine wurden nach den p-Werten der Box-Plot-Verteilung sortiert. Es wurden nur die Proteine näher betrachtet, deren p-Wert kleiner als 0,1 war und deren Ratio zwischen schwer- und leichtmarkierten Peptiden größer als 2 war. Innerhalb dieser Gruppe wurden dann die Proteine ausgeschlossen, von denen nur ein Peptid identifiziert wurde. Es ergaben sich 60 Proteine, die diese Bedingungen erfüllt hatten und somit als potentielle Interaktionspartner von mNOA1 näher betrachtet wurden.

Die Hälfte dieser Proteine ist mitochondrial lokalisiert, wobei aber auch Proteine identifiziert wurden, die in anderen Zellkompartimenten lokalisiert sind (Abbildung 32B). Unter diesen befanden sich vor allem Proteine, die an der Proteinsynthese, der Proteinfaltung und auch am Proteintransport beteiligt sind.

Da mNOA1 ein mitochondriales Protein ist, wurde der Fokus auf die mitochondrial identifizierten Proteine gelegt. Diese sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Protein ID	Bezeichnung	Name	Ratio
IPI00121814	mNOA1	Nitric oxide associated protein-1	7,0215
IPI00758392	Atp5f1	ATP-Synthase-Untereinheit b	3,7286
IPI00468481	Atp5b1	ATP-Synthase-Untereinheit β	3,4216
IPI00130280	Atp5a1	ATP-Synthase-Untereinheit α	3,3758
IPI00313475	Atp5c1	ATP-Synthase-Untereinheit γ	3,2752
IPI00132531	NDUFB5	NADH-Ubiquinon-Dehydrogenase 1 β UE 5	4,9017
IPI00116748	NDUFA10	NADH-Ubiquinon-Dehydrogenase 1 α UE 10	4,8278
IPI00308882	NDUFS 75k	NADH-Ubiquinon-Dehydrogenase 75 kDa UE	5,2214
IPI00121288	NDUFB10	NADH-Ubiquinon-Dehydrogenase 1 β UE 10	5,1509
IPI00344004	NDUFA12	NADH-Ubiquinon-Dehydrogenase 1 α UE 12	5,7145
IPI00117978	Cox IV 1	Cytochrom <i>c</i> Reduktase UE IV Isoform 1	6,3153
IPI00111885	Uqcrc1	Ubiquinol-Cytochrom <i>c</i> Reduktase core protein 1	6,2047
IPI00119138	Uqcrc2	Ubiquinol-Cytochrom <i>c</i> Reduktase core protein 2	5,0471
IPI00132347	Uqcrb	Ubiquinol-Cytochrom <i>c</i> Reduktase 14 kDa UE	7,7388
IPI00127841	ANT 2	ADP/ATP Translokase 2	5,7718
IPI00115564	ANT 1	ADP/ATP Translokase 1	5,371
IPI00122549	VDAC 1	Voltage-dependent anion-selective channel 1	8,0252
IPI0012547	VDAC 2	Voltage-dependent anion-selective channel 2	5,5617
IPI00122548	VDAC 3	Voltage-dependent anion channel 3	6,4947
IPI00283611	HK-1	Hexokinase 1	7,6692
IPI00133440	PHB	Prohibitin	5,9429
IPI00321718	PHB 2	Prohibitin 2	7,5124
IPI00228150	Immt	Mitofilin	6,5422
IPI00377728	Tom70	Mitochondrialer Import Rezeptor 70	4,1455
IPI00124771	SLC25a3	Phosphat Carrier Protein	4,983
IPI00128346	mitoNEET	Zinkfinger CDGSH domain containing protein 1	5,3107
IPI00126115	SLC25a24	Phosphat Carrier Protein	5,2028
IPI00128522	Hsp25	Heat-shock protein 25	2,2474
IPI00136253	Hsp40	DnaJ homolog subfamily B member 1	5,4512

Tabelle 8: Zusammenfassung der mitochondrialen Proteine, die in der mNOA1-Immunpräzipitation mittels Massenspektrometrie identifiziert wurden

3.4.7 *mNOA1* bildet Homo-Dimere

Die identifizierten Peptide des SILAC-Experiments können auf die Gelstücke zurückgeführt werden, aus denen sie extrahiert wurden. Die Analyse der MS-Daten ergab, dass als mNOA1-identifizierte Peptide in 2 Gelstücken vorlagen, was einen Hinweis auf eine Homo-Oligomerisierung gab. Um das zu testen, wurden stabil-exprimierende mNOA1-Flag-Zellen mit mNOA1-GFP transfiziert, eine Immunpräzipitation mit anti-Flag-gekoppelter Sepharose durchgeführt und mittels Western Blot analysiert. Wie der Abbildung 33 zu entnehmen ist, konnten im Lysat durch die Inkubation der Membranen mit anti-mNOA1 drei spezifische Banden detektiert werden. Deren Größe entspricht dem endogenen Protein, dem Flag-getaggten Protein und dem GFP-Fusionsprotein. Diese drei Banden ließen sich auch im Flag-Präzipitat detektieren. Bestätigt wurde dies zusätzlich durch die Inkubationen der Membranen mit einem GFP-Antikörper. Ein GFP-Signal wurde sowohl in den Lysaten als auch im Flag-Präzipitat detektiert. Das simultane Vorhandensein von sowohl endogenen mNOA1 als auch von mNOA1-GFP in den Flag-Präzipitaten bewies, dass mNOA1 Homo-Oligomere bilden kann bzw. über Brückenmoleküle miteinander verbunden ist.

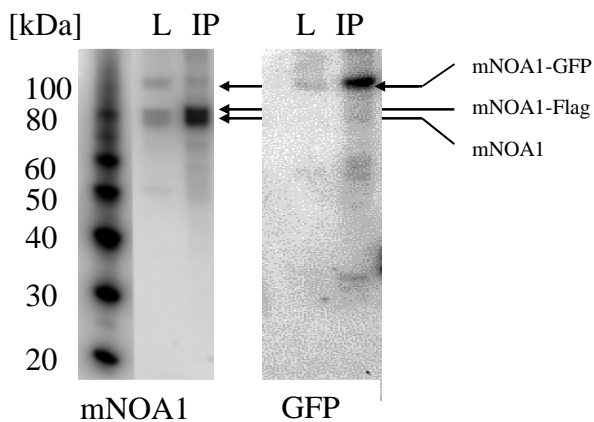


Abbildung 33: Flag-Immunopräzipitation von mNOA1-Flag exprimierenden Zellen nach Transfektion mit mNOA1-GFP; Analyse der Flag-Immunpräzipitate (IP) mit anti-mNOA1 (links) und anti-GFP (rechts); L = Lysat; repräsentativ für 3 unabhängige Experimente

3.4.8 *mNOA1* interagiert mit den mitochondrialen Superkomplexen

Viele der über den SILAC-Versuch identifizierten mitochondrialen Proteine sind Bestandteile von großen Proteinkomplexen (wie die Atmungskettenkomplexe, der PTP-Proteinkomplex, und der Prohibitin-Komplex). Diese Multi-Proteinkomplexe unterscheiden sich in ihrer molekularen Größe und können daher in einem Dichte-Gradienten getrennt werden. Um zu untersuchen, mit welchen dieser Komplexe mNOA1 interagiert, wurden Herz- und Lebermitochondrien mit Digitonin solubilisiert und diese über einen Saccharose-Gradienten in die einzelnen Komplexe aufgetrennt. Der Gradient wurde in 500

μ l-Fractionen entnommen. Die Proteine dieser Fractionen wurden präzipitiert und mittels SDS-Page und entsprechenden Western Blots analysiert.

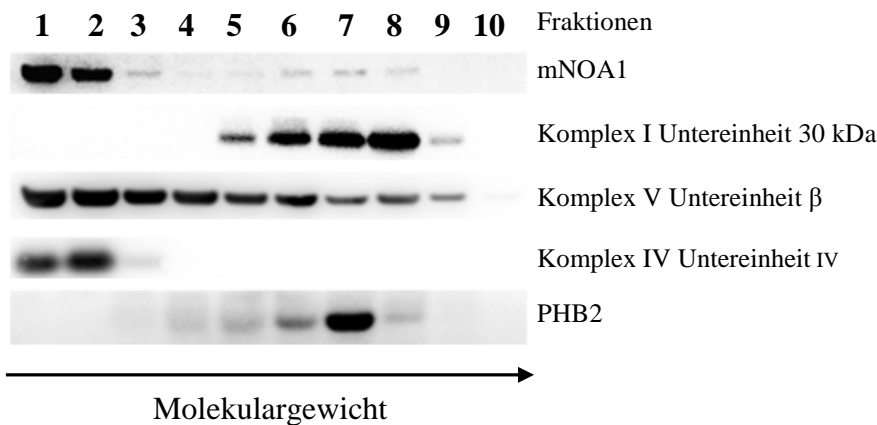


Abbildung 34: Charakterisierung der mNOA1-Verteilung im Saccharose-Gradienten von Digitonin-solubilisierten Herzmitochondrien der Maus; Western Blot repräsentativ für 4 unabhängige Experimente;

Dem Western-Blot der Abbildung 34 kann entnommen werden, dass mNOA1 mit dem mitochondrialen Respirationskomplex IV ko-migriert. Darüber hinaus ist das Protein auch in den Fractionen mit höheren Molekulargewichten nachzuweisen und migriert in diesen zusammen mit dem Respirationskomplex I und dem Prohibitin 2, einem Bestandteil des Prohibitinkomplexes.

In einem zweiten Experiment wurden die mitochondrialen Respirationskomplexe sowie der Prohibitinkomplex in einem *Blue Native*-Gel isoliert, die einzelnen Komplexe anschließend in einer 2. Dimension elektrophoretisch in ihre Einzeluntereinheiten aufgetrennt und mittels Western Blot hinsichtlich der Expression von mNOA1 analysiert, um eine Interaktion von mNOA1 mit den mitochondrialen Komplexen nachzuweisen (Abbildung 35). In diesem Experiment zeigte sich, dass mNOA1 mit den mitochondrialen Atmungskettenkomplexen interagiert. Darüber hinaus konnte hier ebenfalls die stärkste Interaktion mit dem Komplex IV bestätigt werden, wobei mNOA1 aber auch im Komplex V, im Komplex I und in den Superkomplexen nachgewiesen werden konnte. Die Durchführung der zweiten Dimension bei diesem Versuch erfolgte unter reduzierenden Bedingungen.

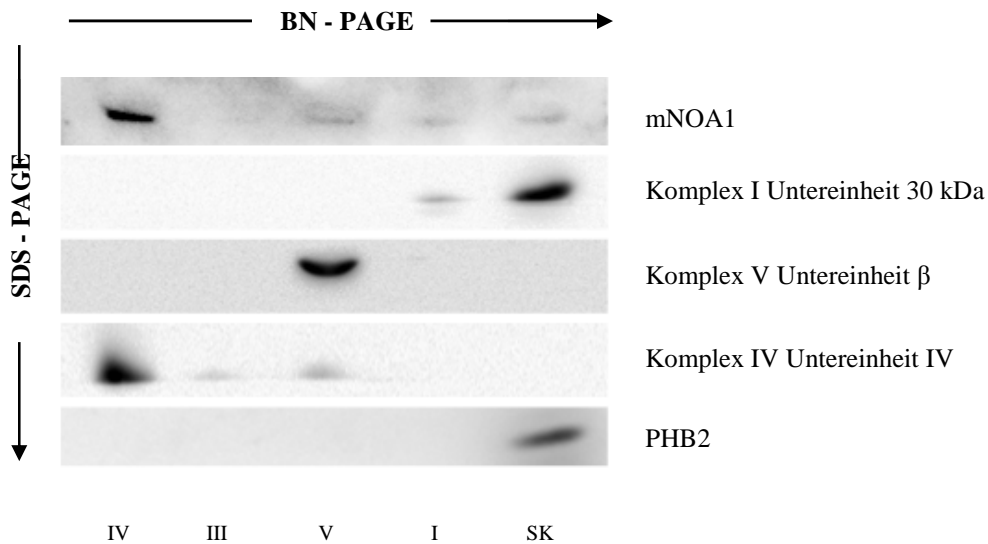


Abbildung 35: Identifizierung von mNOA1 als Bestandteil der mitochondrialen Komplexe in der zweiten Dimension von durch *Blue Native-Gel*-elektrophoretisch aufgetrennten Digitonin-solubilisierten Herzmitochondrien der Maus, IV- Komplex IV, III- Komplex III, V- F_1F_0 -ATPase, I- Komplex I, SK- Superkomplexe; repräsentativ für 3 unabhängige Experimente

Um eine mögliche Rolle der Dimerisierung von mNOA1 bei den Interaktionen zu analysieren, wurde der Versuch wiederholt, wobei die Trizin-PAGE der zweiten Dimension dabei unter nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt wurde. Unter diesen Bedingungen konnte eine weitere, sehr schwache Bande, von mNOA1 nachgewiesen werden, die etwa einer Größe von 160 kDa entsprach (Abbildung 36).

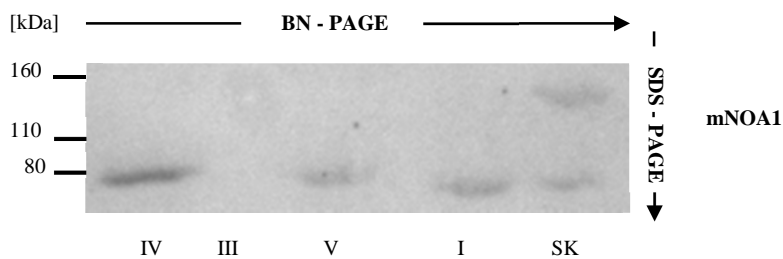


Abbildung 36: Charakterisierung der mNOA1 Expression in den mitochondrialen Atmungsketten - komplexen mittels nicht- reduzierender zwei-dimensionaler *Blue Native PAGE* von Herzmitochondrien der Maus, repräsentativ für 3 unabhängige Experimente

Insgesamt sprechen die Befunde unter 3.4.1 – 3.4.7 dafür, dass mNOA1 durch Homodimerisierung die Superkomplexbildung der mitochondrialen Atmungskette begünstigt oder stabilisiert und so die Kapazität der mitochondrialen Atmungskette erhöht.

3.4.9 Stabilität von mNOA1

In silico- Analysen der mNOA1-Proteinsequenz mit ProtParam (ExPASy ProtParam) haben dem Protein eine Halbwertszeit von weniger als 30 Stunden zugeschrieben. Es wurde ein theoretischer Instabilitätsindex von 54,51 errechnet und mNOA1 somit als ein instabiles Protein eingestuft. Proteine mit einer kurzen Halbwertszeit zeichnen sich häufig durch das Vorhandensein von PEST-Sequenzen aus (Rogers et al., 1986), die auch für mNOA1 *in silico* prediktiert wurde. Um die tatsächliche Stabilität von mNOA1 zu bestimmen, wurden C2C12-Zellen für unterschiedliche Zeitpunkte mit 50 µg/ml des Translationshemmers Cycloheximid (CHX) inkubiert. Die Abbildung 37 zeigt, dass die Halbwertszeit von mNOA1 ca. 12 Stunden betrug. Die Proteinexpression von mNOA1 war bis zu einem Zeitpunkt von 6 Stunden relativ konstant ($90\pm 12\%$), reduzierte sich innerhalb weiterer 2 Stunden auf $77\pm 10\%$ und erreichte nach 12 Stunden die Hälfte der ursprünglichen Expression ($52\pm 3\%$).

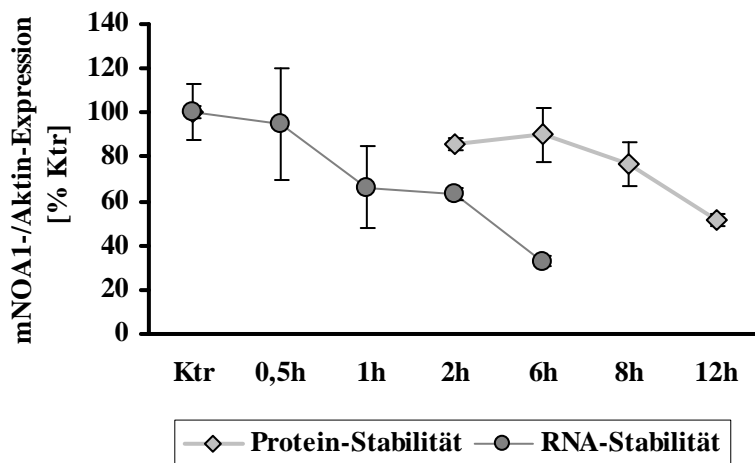


Abbildung 37: Proteinstabilität (Kreise) von mNOA1; Inkubation von C2C12-Zellen mit 50 µg / ml Cycloheximid (CHX) für die angegebene Dauer; mRNA-Stabilität von mNOA1 (Rauten); Inkubation von C2C12-Zellen mit 5 µg / ml Actinomycin D (ActD) für die angegebene Dauer. Angabe in % der Kontrolle als Mittelwert±Standardabweichung von n=3 Experimenten

Zusätzlich zur Proteinstabilität wurde die mRNA-Stabilität untersucht, da auch diese zur Regulation der Genexpression beiträgt. Dazu wurden C2C12-Zellen für unterschiedliche Zeitpunkte mit dem Transkriptionshemmer Actinomycin D (ActD) inkubiert. Die anschließende Analyse der RNA mittels quantitativer PCR ergab, dass bereits nach 2-stündiger Inkubation mit ActD nur noch $64\pm 3\%$ der ursprünglichen mNOA1-mRNA vorhanden war. Nach 6-stündiger Inkubation mit ActD sank dieser Wert weiter auf $33\pm 2\%$ der nicht-behandelten Kontrolle (Abbildung 37).

Diese relativ geringen Halbwertszeiten sprechen dafür, dass mNOA1 eine wichtige regulatorische Funktion bei raschen Anpassungen der mitochondrialen Funktionskapazität an wechselnde Anforderungen hat.

3.4.10 Induktion des Zelltodes durch die Herabregulation von mNOA1

Um den Einfluss einer mNOA1-Herabregulation auf die mitochondriale Respiration untersuchen zu können, wurden ein sh-mNOA1-Vektor konstruiert. Mit diesem wurden C2C12-Zellen transient transfiziert und die mNOA1-Expression auf RNA- und Proteinebene bestimmt.

Die Transfektion mit sh-mNOA1 führte nach 48 Stunden zu einer signifikanten Herabregulation der mNOA1-RNA-Expression auf 43 ± 27 % der Mock-Transfektion (Abbildung 38A). Diese bestätigte sich auch auf Proteinebene, wo sich die mNOA1-Expression auf 52 ± 4 % der Mock-Transfektion signifikant reduzierte (Abbildung 38B).

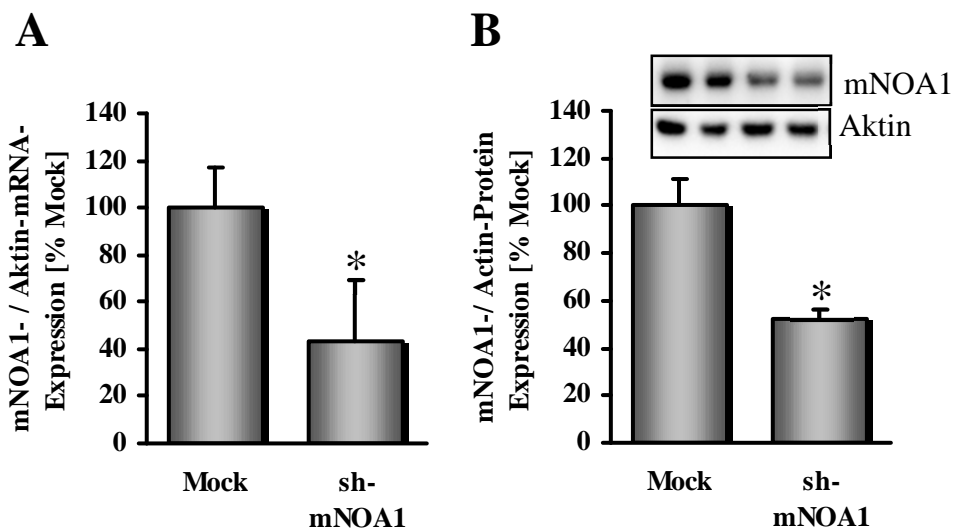


Abbildung 38: sh-RNA vermittelte Herabregulation der mNOA1-Expression auf RNA- (A) und Proteinebene (B) 48 Stunden nach Transfektion; Angabe in % der Mocktransfektion als Mittelwert \pm Standardabweichung von n=3 unabhängigen Experimenten; *p<0,05

Es wurde beobachtet, dass die Transfektion von sh-mNOA1 zu einem Ablösen der Zellen von der Kultivierungsschale führte. Um das Ausmaß des Zellablösens zu analysieren, wurde die Vitalität der Zellen mit Bromphenolblau bestimmt. Wie der Abbildung 39 entnommen werden kann, führte die Herabregulation von mNOA1 zu einer Reduktion der lebenden Zellen auf 51 ± 1 % der Mock-Transfektion.

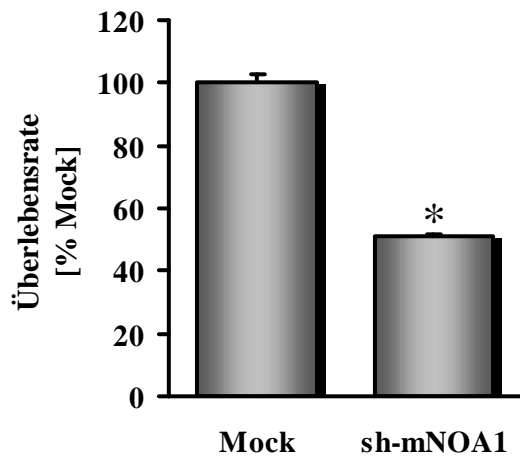


Abbildung 39: Reduktion der Überlebensrate der C2C12-Zellen nach transienter Transfektion von sh-mNOA1; Angabe in % der Mock-Transfektion als Mittelwert \pm Standardabweichung von n= 3 unabhängigen Experimenten;*p<0,05

3.4.11 Induktion einer mitochondrialen Dysfunktion durch Herabregulation von mNOA1

Zur Aufklärung der Frage, ob eine induzierte Herabregulation von mNOA1 zu einer Abnahme der mitochondrialen Respiration führt, wurden C2C12-Zellen mit sh-mNOA1 transfiziert und nach 48 Stunden mitochondriale Enzym-Aktivitäten gemessen, auf die Citratsynthase-Aktivität normalisiert und im Vergleich zu Mock-transfizierten Zellen analysiert.

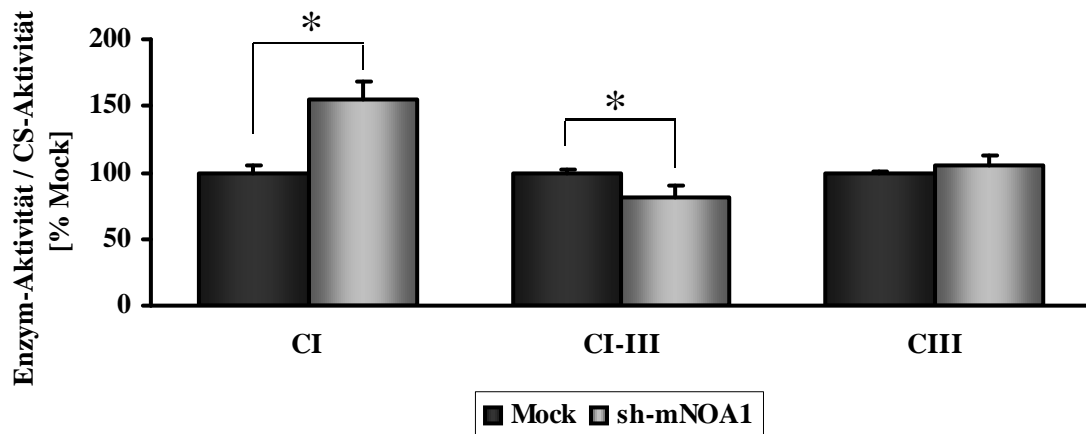


Abbildung 40: Einfluss der sh-mNOA1-Transfektion auf die mitochondrialen Aktivitäten 48 Stunden nach der Transfektion; Induktion der Komplex I-abhängigen NADH-Oxidation sowie Herabregulation der Cytochrom *c*-Reduktion; keine Änderung der Komplex III-Aktivität; Normalisierung der Aktivitätsmessungen auf die Citratsynthase-Aktivität; Angaben in % der Mock-Transfektion als Mittelwert \pm Standardabweichung von n=4 unabhängigen Experimenten; *p<0,05

Wie der Abbildung 40 entnommen werden kann, führte die induzierte Herabregulation der mNOA1-Expression zu einer signifikanten Zunahme der NADH-Oxidationsrate auf 155 \pm 13 %. Wie die Messung der Cytochrom *c*-Reduktionsrate zeigte, wurde der erhöhte Elektronenfluss aber nicht weiter in die Atmungskette geleitet. Vielmehr führte die sh-

mNOA1-Transfektion zu einer signifikanten Abnahme der Cytochrom *c*-Reduktionsrate auf 81 ± 9 % der Mock-Transfektion. Die Komplex III-Aktivität änderte sich durch die mNOA1-Herabregulation nicht

Die Abnahme der Cytochrom *c*-Reduktionsrate besagt, dass weniger Elektronen auf die terminalen Komplexe der mitochondrialen Atmungskette übertragen werden und dadurch letztendlich weniger ATP produziert wird. Das wurde durch die Messung des ATP-Gehalts bestätigt. Die Herabregulation der mNOA1-Expression führte zu einer signifikanten Abnahme des zellulären ATP-Gehalts auf 43 ± 10 % (Abbildung 41) der Mock-Kontrolle.

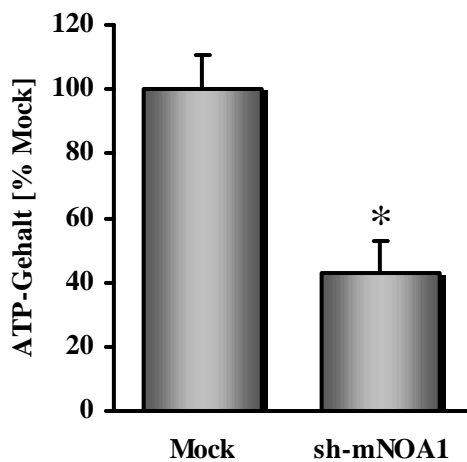


Abbildung 41: Einfluss der sh-mNOA1-Transfektion auf den ATP-Gehalt 48 Stunden nach der Transfektion; Angaben in % der Mock-Transfektion als Mittelwert \pm Standardabweichung von $n=3$ unabhängigen Experimenten; * $p<0,05$

Um die Frage zu klären, ob diese Dysfunktion der mitochondrialen Respiration nach induzierter Herabregulation von mNOA1 auf Assemblierungsfehler der Komplexe zurückzuführen ist, wurde die Menge der assemblierten Atmungskettenkomplexe mit Hilfe von *Blue Native*-Gelen im nativen Blot analysiert. Die einzelnen Komplexe wurden dabei mit Hilfe spezifischer Antikörper der jeweiligen Komplexe identifiziert. Die Abbildung 42 zeigt, dass die induzierte Herabregulation von mNOA1 im Vergleich zu Mock-transfizierten Zellen zu einer signifikanten Abnahme der assemblierten Komplexe IV (77 ± 4 %) und V (46 ± 27 %) sowie der Superkomplexe (40 ± 7 %) führte, die kaum noch zu detektieren waren. Lediglich der Superkomplex mit einem errechneten Molekulargewicht von 1532kDa zeigte keine Änderung der Expression. Zu erwähnen ist, dass der Komplex I nicht detektiert wurde. Die Menge an assemblierten Komplex III wurde durch die Transfektion mit sh-mNOA1 nicht verändert (116 ± 14 %). Der Komplex II wurde nicht untersucht.

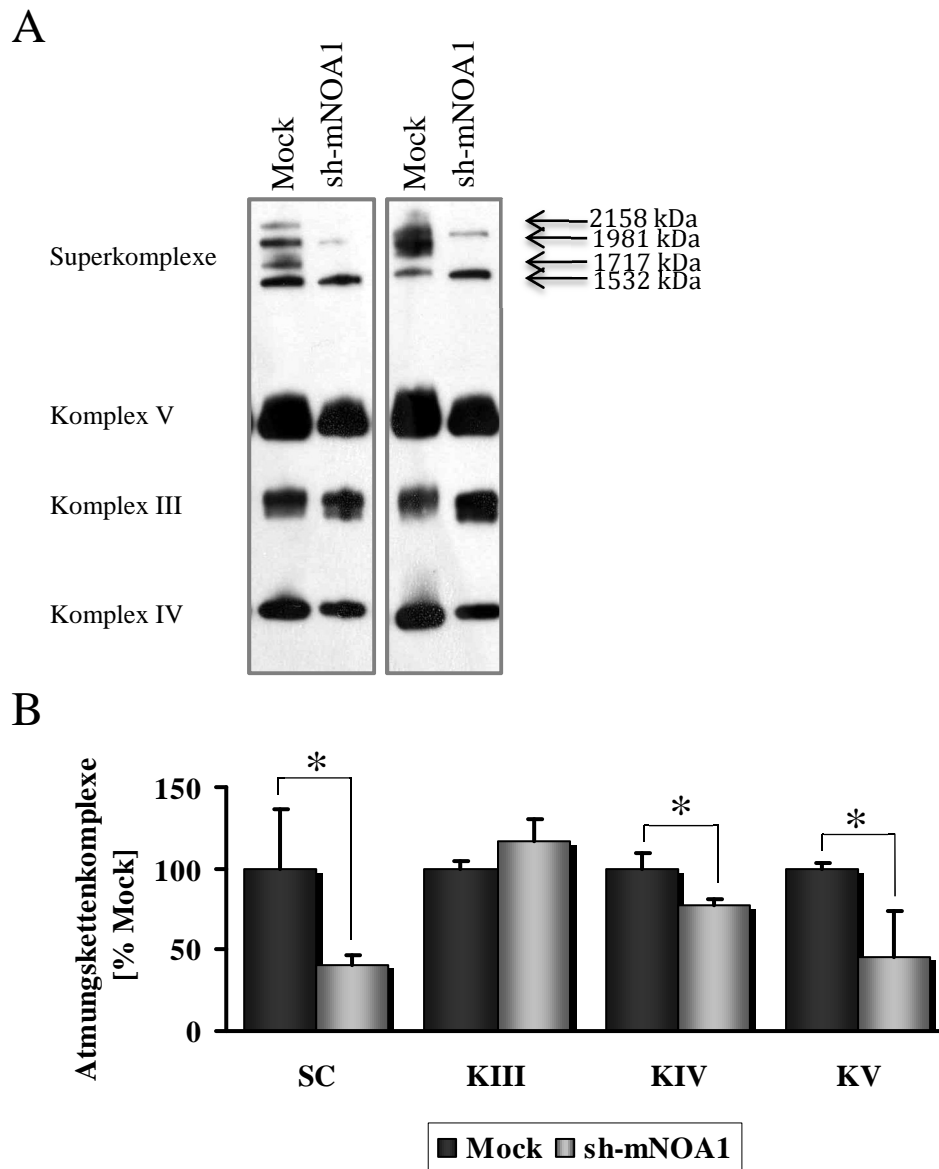


Abbildung 42: Einfluss der induzierten mNOA1-Herabregulation auf die Menge assemblierter Atmungskettenkomplexe analysiert mit Hilfe von *Blue Native* -Gelen und anschließendem nativen Blot. Die einzelnen Komplexe wurden mit Hilfe eines Antikörpermixes, bestehend aus Antikörpern jeweils gegen eine Untereinheit der einzelnen Komplexe gerichtet, identifiziert. Repräsentative Darstellung von zwei Experimenten. Das Molekulargewicht der einzelnen Superkomplexe wurde von Dr. Ilka Wittig errechnet (A). Für die Quantifizierung der Blots wurden entsprechend kürzer exponierte Blots (für Komplex IV und V) herangezogen. Diese ist im Diagramm (B) dargestellt, Angaben in % der Mock-Transfektion als Mittelwert±Standardabweichung von n=3 unabhängigen Experimenten; *p<0,05

3.4.12 Depolarisation der Mitochondrien durch Herabregulation von mNOA1

Der mitochondriale Elektronentransport ist an einen Protonentransport von der Matrix in den IMS gekoppelt, wobei ein elektrochemischer Gradient aufgebaut wird. Eine Abnahme des Elektronentransportes ist daher mit einer Abnahme des Membranpotentials und einer Depolarisation der Mitochondrien verbunden. Um den Einfluss der Herabregulation von mNOA1 auf das Membranpotential zu untersuchen, wurden die Zellen mit sh-mNOA1

transfiziert, 48 Stunden später mit JC-1 gefärbt und im FACS analysiert. JC-1 ist ein kationischer Farbstoff, der in Abhängigkeit vom mitochondrialen Membranpotential in den Mitochondrien akkumuliert, begleitet von einer Verschiebung der Fluoreszenz aus dem roten in den grünen Bereich (Smiley et al., 1991). Eine Depolarisation der Mitochondrien ist gekennzeichnet durch eine Abnahme des Verhältnisses von roter und grüner Fluoreszenz (Di Lisa et al., 1995).

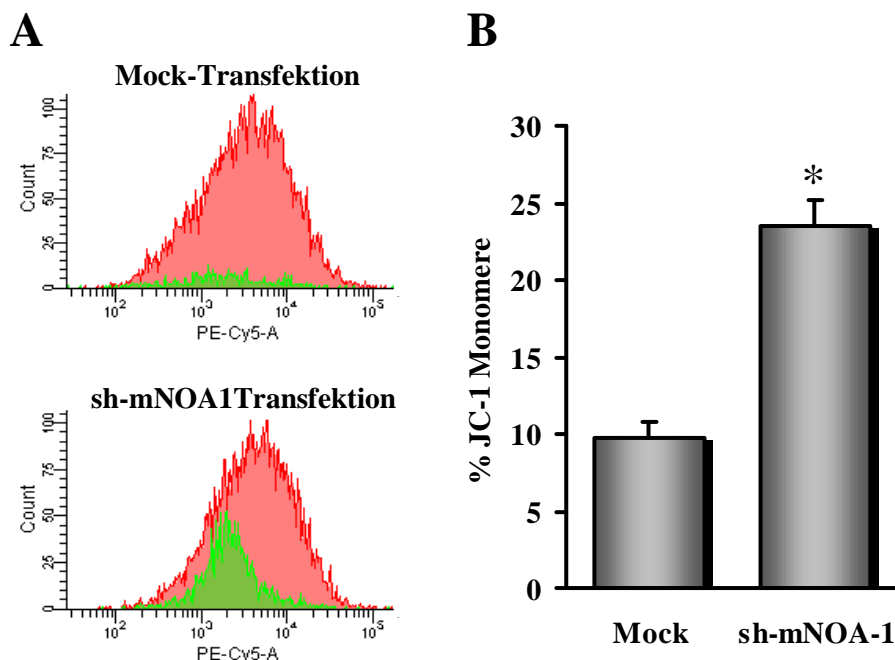


Abbildung 43: Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials in Abhängigkeit von der Herabregulation von mNOA1 gemessen mit dem Farbstoff JC-1 mittels FACS; repräsentatives Histogramm (A) und statistische Auswertung von n= 3 Experimenten; (B); * $p < 0,05$

Die Herabregulation der mNOA1-Expression führte zu einem Anstieg der grünen Fluoreszenz und somit zu einer Abnahme des Verhältnisses der roten und grünen Fluoreszenz (Abbildung 43), was einer Depolarisation der Mitochondrien entsprach.

Eine Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials im Zusammenhang mit einer Abnahme des Protonengradienten verursacht die Bindung von Cyclophilin D an ANT und somit eine Öffnung der Permeabilität-Transitions-Pore PTP, was den Zelltod einleitet. Cyclosporin A (CsA) verhindert die Bindung von Cyclophilin D an ANT (Woodfield et al., 1998) und somit eine Öffnung der PTP, wodurch auch ein PTP-vermittelter Zelltod, inhibiert werden kann.

Um zu testen, ob das durch sh-mNOA1-Transfektion induzierte Sterben der Zellen auf ein Öffnen der PTP beruht, wurden die Zellen unmittelbar nach der Transfektion mit 3 μM CsA inkubiert und die Vitalität der Zellen mit Bromphenolblau gemessen. Wie in der

Abbildung 44 zu sehen ist, verhinderte eine Inkubation der sh-mNOA1-transfizierten Zellen mit CsA den Tod der Zellen nicht. Eine Öffnung der PTP war somit nicht Ursache des Zellsterbens bei einem Mangel an mNOA1.

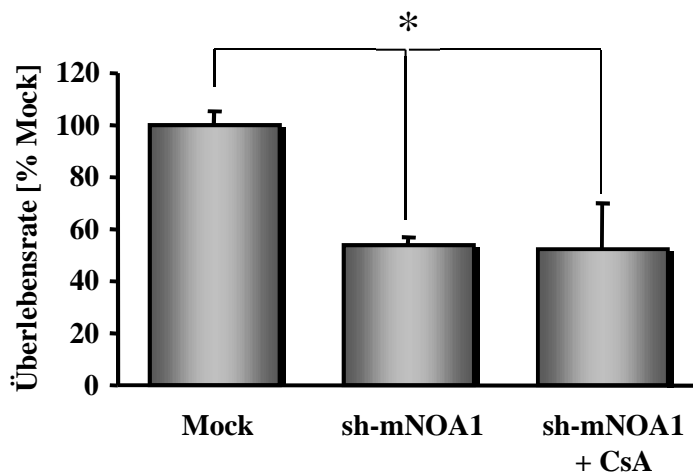


Abbildung 44: Reduktion der Überlebensrate der C2C12-Zellen nach transienter Transfektion von sh-mNOA1 unabhängig von der PTP-Öffnung gezeigt durch die Inhibition mit 3 μ M CsA: Angabe in % der Mock-Transfektion als Mittelwert \pm Standardabweichung von $n=3$ unabhängigen Experimenten; * $p<0,05$

3.4.13 Die Herabregulation von mNOA1 induziert die Bildung von Superoxid-Radikalen

Eine Disproportionalität der mitochondrialen Atmungskette führt zu einer erhöhten Produktion von Radikalen, vornehmlich Superoxid-Radikale (O_2^-) (Turrens, 1997). Eine sh-mNOA1-abhängige O_2^- -Produktion wurde im FACS mit dem Farbstoff MitoSOX-Red gemessen. MitoSOX-Red ist ein Farbstoff, welcher schnell direkt von den Mitochondrien aufgenommen und dort durch vorhandene O_2^- -Radikale oxidiert wird und dadurch rot fluoresziert. Wie die Abbildung 45 zeigt, führte die Herabregulation von mNOA1 zu einer Zunahme der roten MitoSOX-Red-Fluoreszenz im Vergleich zur Mock-Transfektion.

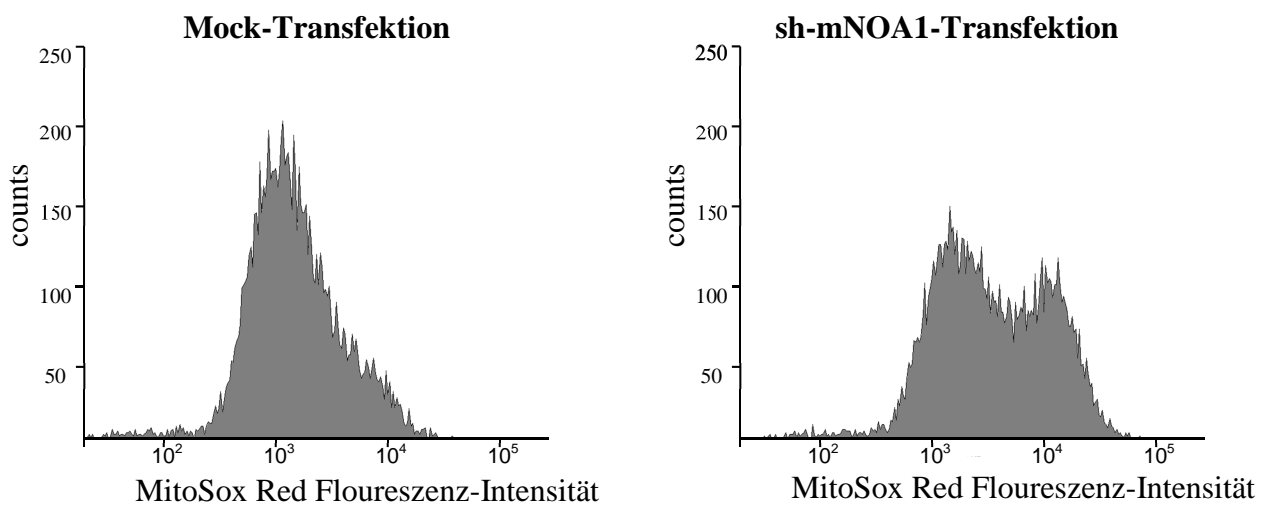


Abbildung 45: Bestimmung der Superoxidproduktion mittels FACS-Analyse unter Verwendung von MitoSOX in Mock-transfizierten und sh-mNOA1-transfizierten C2C12-Zellen 48 Stunden nach Transfektion; repräsentativ für $n=4$ Experimente

Um zu klären, ob diese signifikant erhöhte O_2^- -Produktion Ursache für das Sterben der Zellen nach sh-mNOA1-Transfektion ist, wurden die Zellen mit dem Antioxidans N-Acetylcystein (NAC) während der Transfektion inkubiert. Wie der Abbildung 46 entnommen werden kann, inhibierte die NAC-Inkubation das sh-mNOA1-induzierte Zellsterben und hielt die Anzahl der vitalen Zellen (98 ± 14 %) auf dem Niveau der Mock-Transfektion.

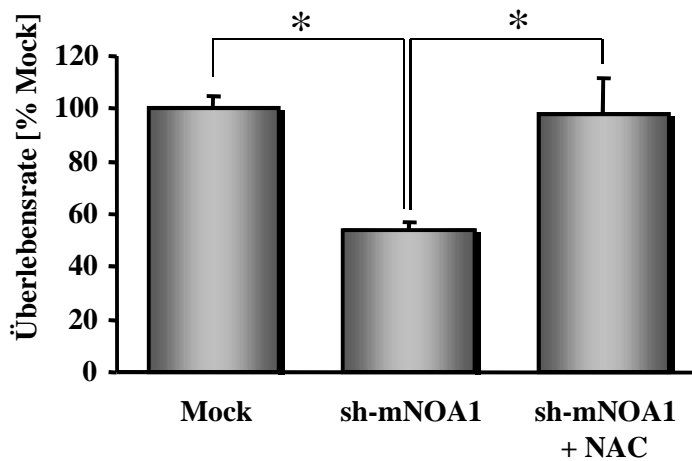


Abbildung 46: Reduktion der Überlebensrate der C2C12-Zellen nach transientscher Transfektion von sh-mNOA1 und Inhibition des sh-mNOA1-induzierten Zellsterbens durch die Inkubation der Zellen mit 10 mM NAC; Angabe in % der Mock-Transfektion als Mittelwert \pm Standardabweichung von $n = 3$ unabhängigen Experimenten; * $p < 0,05$

Eine erhöhte Produktion von O_2^- kann zu einer Verschiebung des gesamten Redoxhaushaltes der Mitochondrien führen. In den Mitochondrien existieren 2 Redox-Systeme, die für den Schutz vor den Schäden durch oxidativen Stress zuständig sind. Das ist zum einen das Gluthation (GSH)-System und zum anderen das Thioredoxin-2-System (Orrenius et al., 2007). Während GSH ständig zwischen den Mitochondrien und dem Zytosol ausgetauscht wird, ist Thioredoxin-2 (Trx-2) ständig in den Mitochondrien vorhanden. Mit Hilfe einer Redox-sensitiven Western-Analyse sollte der Redox-Zustand von Trx-2 nach sh-mNOA1-Transfektion analysiert werden, da ein Vorliegen von oxidiertem Trx-2 einen apoptotischen Zelltod induzieren kann (Masutani et al., 2005). In Abbildung 47 ist eine Redox-Western-Analyse von Trx-2 48 Stunden nach Transfektion von sh-mNOA1 dargestellt. Als Positivkontrolle diente eine 30 minütige Inkubation von C2C12-Zellen mit 1 mM Wasserstoffperoxid (H_2O_2).

Der Abbildung 47 ist deutlich zu entnehmen, dass die 30-minütige Inkubation mit H_2O_2 zu einer kompletten Oxidation von Trx-2 führte. Während in den Mock-transfizierten Zellen der größte Teil von Trx-2 in reduzierter Form vorlag, war in den sh-mNOA1-transfizierten Zellen der Anteil an oxidiertem Trx-2 größer als der Anteil der reduzierten Form.

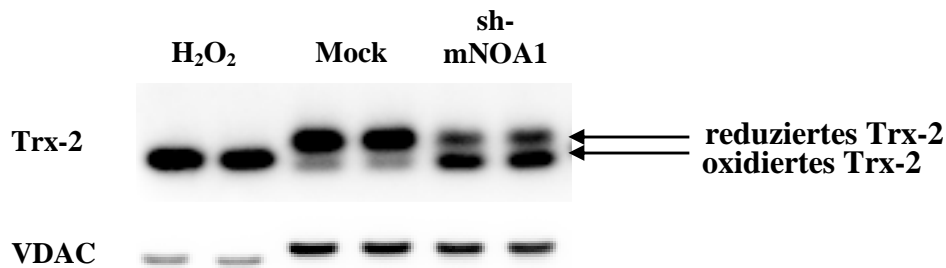


Abbildung 47: Redox-Western-Analyse von Thioredoxin-2 (Trx-2) 48 Stunden nach sh-mNOA1-Transfektion; völlige Oxidation von Trx-2 durch die Inkubation mit 1 mM H_2O_2 als Positivkontrolle; repräsentativ für 3 unabhängige Experimente

Reduziertes Trx-2 ist an die mitochondrial-lokalisierte ASK-1 gebunden und verhindert somit eine Aktivierung dieser. Oxidiertes Trx-2 verliert seine Bindungseigenschaften an ASK-1, wodurch diese aktiviert wird. Eine aktivierte ASK-1 vermittelt die Induktion der Apoptose durch Phosphorylierung von JNK/SAP bzw. p38 (Masutani et al., 2005) und der daraus resultierenden Aktivierung dieser. Um zu untersuchen, ob eine Aktivierung dieser Effektor-Kinasen für das Zellsterben nach sh-mNOA1-Transfektion verantwortlich ist, wurden Western-Analysen durchgeführt. Es wurde gezeigt, dass eine Inkubation von Zellen mit Anisomycin zu einer Aktivierung sowohl von JNK/SAP als auch p38 führt (Goh et al., 2000). Daher diente eine 15-minütige Inkubation von C2C12-Zellen mit 10 ng / ml Anisomycin als Positivkontrolle bei diesem Versuch.

Wie in der Abbildung 48 zu sehen ist, führte diese Inkubation der Zellen zu einer Phosphorylierung und damit Aktivierung von JNK/SAP als auch p38. Eine solche Aktivierung konnte in sh-mNOA1-transfizierten Zellen nicht beobachtet werden.

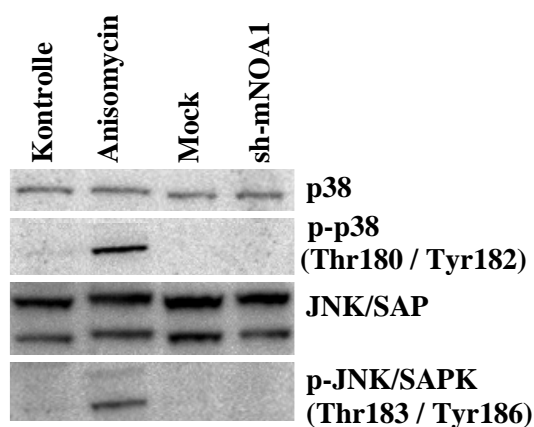


Abbildung 48: Unabhängigkeit des sh-mNOA1-induzierten Zelltod von einer Aktivierung von JNK/SAP bzw. p38; Inkubation von C2C12 mit 10 ng / ml Anisomycin als Positivkontrolle; repräsentativ für 3 unabhängige Experimente

3.4.14 Herabregulation von mNOA1 induziert eine ROS-abhängige Apoptose

Es wurde vielfach in der Literatur gezeigt, dass die Akkumulation von Superoxidanionen zu einer Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweges führt. Dieser ist charakterisiert durch die Freisetzung von Cytochrom *c* aus den Mitochondrien in das Zytosol. In Western-Analysen von Zellfraktionierungen konnte gezeigt werden, dass die Herabregulation von mNOA1 zu einer Freisetzung von Cytochrom *c* in das Zytosol führte (Abbildung 49).

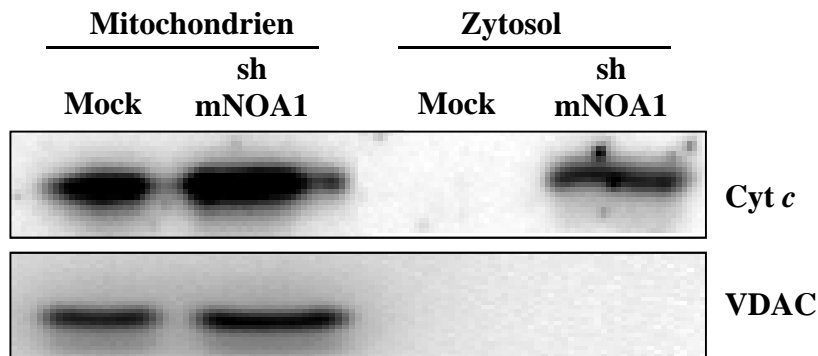


Abbildung 49: Freisetzung von Cytochrom *c* in das Cytosol hervorgerufen durch die Herabregulation von mNOA1; Western-Blot repräsentativ für 3 unabhängige Experimente

Die Freisetzung von Cytochrom *c* in das Zytosol ist die Voraussetzung für die Bildung des sogenannten „Apoptosoms“. Dieses besteht aus Cytochrom *c*, Apaf-1 und möglicherweise dATP und wird nach seiner Bildung zur Procaspase-9 rekrutiert, wodurch diese und somit weitere Caspasen aktiviert werden können (Acehan et al., 2002). Eine der Effektorcaspasen der Apoptose ist die Caspase-3, deren Aktivierung die endgültigen Schritte der Apoptose einleitet. Wie in Western-Analysen gezeigt wurde, führte die Transfektion von sh-mNOA1 nach 48 Stunden nicht nur zu einer Aktivierung von Caspase-3 sondern auch zu einer Spaltung von der Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP), einem weiteren Schlüsselmolekül in der Apoptose (Oliver et al., 1998) (Abbildung 50).

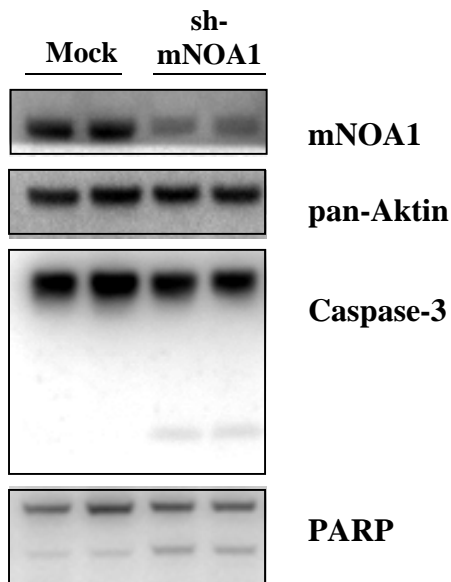


Abbildung 50: Aktivierung von pro-apoptotischer Caspase-3 und PARP durch die Herabregulation von mNOA1, Western Blot repräsentativ für 3 unabhängige Experimente

Die Herabregulation von mNOA-1 führte also zu einem Caspase-abhängigen apoptotischen Zelltod in C2C12-Myoblasten.

3.4.15 Sauerstoff-Abhängigkeit der mNOA1-Expression

Eine *in silico*-Analyse der mNOA1-Promotorregion mit Matinspector (Genomatix Software GmbH, München (Cartharius et al., 2005) hatte u.a. ein *hypoxia response element* (HRE) prädiziert. Dabei handelt es sich um eine spezifische DNA-Sequenz des Typs NCGTG, die in der Promoterregion bestimmter Gene vorkommt und deren Transkription nach Bindung durch den Hypoxie-induzierten Faktor 1 α (Hif-1 α) reguliert wird. Der unter normoxischen Bedingungen instabile Hypoxie-Faktor Hif-1 α wird durch Hypoxie stabilisiert und aktiviert durch die Bindung an HREs die Expression von Genen, die das Überleben unter geringen Sauerstoffbedingungen unterstützen (Chavez et al., 2008). Um eine eventuelle Hypoxie-abhängige Regulation der mNOA1-Expression zu untersuchen, wurden C2C12-Zellen in einer Hypoxie-Kammer mit 0,5 % Sauerstoff inkubiert und anschließend die mNOA1-Expression untersucht. Wie in der Abbildung 51 zu sehen ist, führte die Inkubation unter 0,5 % Sauerstoff zu einer signifikanten Herabregulation der mNOA1-mRNA-Expression auf etwa die Hälfte der Expression unter normoxischen Bedingungen (12 h Hypoxie 49 \pm 15 %; 24 h Hypoxie 60 \pm 11 %). Eine Reoxygenierung (RO) von 2 Stunden führte zu einem Anstieg der mNOA1-Expression. Dieser Anstieg auf 193 \pm 4 % der Normoxie-Kontrolle ist signifikant.

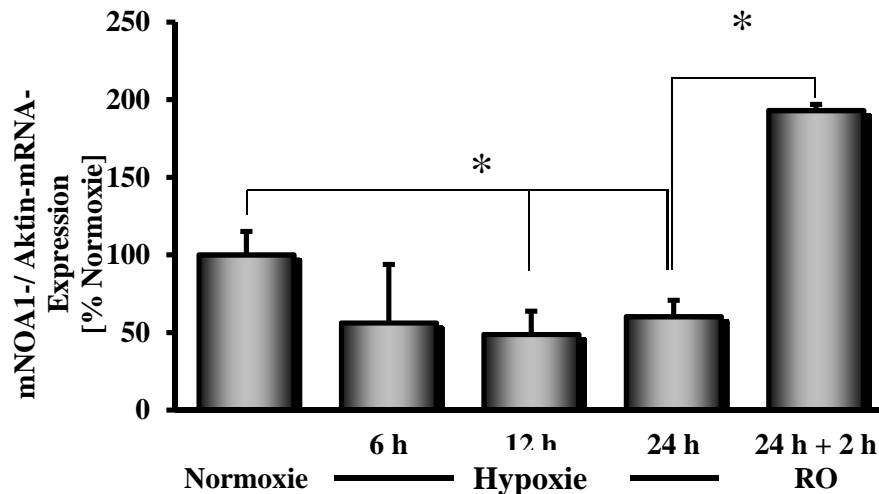


Abbildung 51: Hypoxie-abhängige Herabregulation der mNOA1-mRNA-Expression und Induktion der Expression durch eine 2-stündige Reoxygenierung (RO); Angaben in % der Normoxie als Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens n=3 unabhängigen Experimenten; *p<0,5

3.4.16 Einfluss der mNOA1-Expression auf die mitochondriale Atmung unter Hypoxie

Da die mNOA1-Überexpression eine Aktivierung der mitochondrialen Atmungskette zur Folge hatte, wurde auch unter hypoxischen Bedingungen die Cytochrom *c*-Reduktion als Marker des Elektronenflusses in mNOA1-überexprimierenden Zellen gemessen.

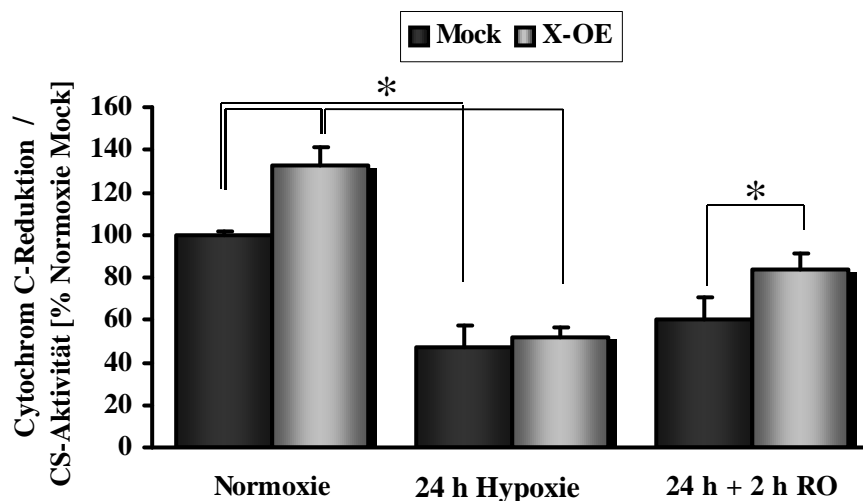


Abbildung 52: Einfluss der mNOA-1 Überexpression auf die Cytochrom *c*-Reduktion unter Hypoxie und nach 2-stündiger Reoxygenierung (RO); Angabe in % der normoxischen Mock-Kontrolle als Mittelwert \pm Standardabweichung von n= 4 unabhängigen Experimenten; *p<0,05; #p<0,05 Normoxie gegen Hypoxie

Wie der Abbildung 52 zu entnehmen ist, führte die Überexpression zu einer Aktivierung unter normoxischen Bedingungen gegenüber der Mock-Transfektion, zeigte aber unter

Hypoxie-Bedingungen keinen Unterschied zu Mock-transfizierten Zellen. Sowohl die Mock- als auch die mNOA1-Überexpression führte zu einem signifikanten Abfall der Cytochrom *c*-Reduktion unter hypoxischen Bedingungen. Die Aktivitäten sanken auf 47 ± 10 % in den Mock-transfizierten und auf 51 ± 5 % in den mNOA1-überexprimierenden Zellen der Mock-transfizierten Normoxie-Kontrolle. Eine 2-stündige Reoxygenierung führte in den Mock-transfizierten Zellen zu keiner Veränderung der Cytochrom *c*-Reduktionsrate, induzierte aber in den mNOA1-überexprimierenden Zellen einen signifikanten Anstieg im Vergleich zu den hypoxischen Bedingungen ohne dabei aber das Normoxie-Niveau zu erreichen.

3.4.17 Hif-1 α -Abhängigkeit der mNOA1 - Expression

Eine Hif-1 α -Abhängigkeit dieser Herabregulation wurde durch die Inkubation von C2C12-Zellen mit 200 nM Kobalt(II)-chlorid (CoCl₂) analysiert. CoCl₂ kann unter Normoxie Hypoxie-vermittelte Signalwege durch die Stabilisierung von Hif-1 α aktivieren (Ho and Bunn, 1996).

Bereits nach 6-stündiger Inkubation mit CoCl₂ wurde eine signifikant herabregulierte mNOA1-mRNA-Expression auf 29 ± 13 % der Kontrolle gemessen (Abbildung 53).

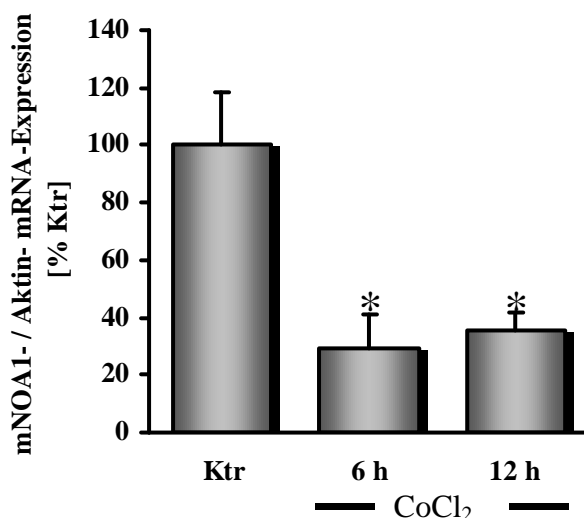


Abbildung 53: Herabregulation der mNOA1-mRNA-Expression durch die Inkubation von C2C12-Zellen mit CoCl₂ unter normoxischen Bedingungen; Angaben in % der Kontrolle als Mittelwert \pm Standardabweichung von n=3 unabhängigen Experimenten; *p<0,5

Um eine direkt Bindung von Hif-1 α an die prädiaktierte HRE-Sequenz im mNOA1-Promotor zu analysieren, wurde ein „*Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA)“ durchgeführt. Diese Gelshiftanalyse wird genutzt um DNA-Protein-Interaktionen zu untersuchen und beruht auf der Beobachtung, dass stabile DNA-Protein-Komplexe

langsamer durch ein Gel diffundieren als freie DNA-Fragmente (Fried and Crothers, 1981). Es wurden Zellkernextrakte von hypoxischen C2C12-Zellen hergestellt. Diese wurden mit IRD[®]700 – markierten Oligonukleotiden, die der prediktierten HRE –Sequenz des mNOA1-Promotors entsprachen, inkubiert. Die sich bildenden DNA-Protein-Komplexe wurden in einem nicht-denaturierendem Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit dem Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences, Bad Homburg) analysiert. Um die Spezifität der Interaktion zu bestimmen, wurden nicht-markierte konsensus Kompetitor-Oligonukleotide sowie nicht-markierte mutante Kompetitor-Oligonukleotide eingesetzt. Es zeigte sich, dass es nach Inkubation des IRD[®]700 –markierten Oligonukleotiden mit dem hypoxischen Zellkernextrakt zu einem Bandshift kam. Dieser konnte durch die gleichzeitige Inkubation mit dem nicht-markierten konsensus Kompetitor-Oligonukleotid im Überschuss kompetitieren. Die DNA-Protein-Interaktion wurde durch die gleichzeitige Inkubation mit dem nicht-markierten mutanten Kompetitor-Oligonukleotid spezifiziert, da diese keine Competition des Bandshifts nach sich zog (Abbildung 54).

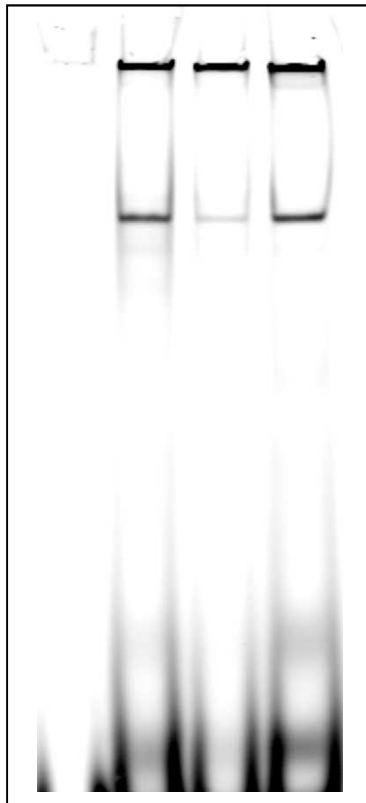


Abbildung 54: Detektion von spezifischen Bandshifts nach der Inkubation von IRD-700 markierten mNOA1-HRE-Oligo-Nukleotiden mit hypoxischen Zellkernextrakten. Spezifizierung der Bindung durch die Competition mit nicht-markierten konsensus Oligonukleotiden und Nicht-Competition mit mutanten Oligonukleotiden. Repräsentativ für 3 unabhängige Experimente

ds IRD-700 HRE oligo	+	+	+	+
Zellkernextrakt	-	+	+	+
konsensus Kompetitor	-	-	+	-
mutanter Kompetitor	-	-	+	+

+	+	+	+
-	+	+	+
-	-	+	-
-	-	+	+

4 Diskussion

4.1 Anpassung der Funktion mitochondrialer Subpopulationen an subzellulär unterschiedliche Sauerstoff-Versorgung

In dem ersten Teil der vorliegenden Arbeit, wurden die kardialen, linksventrikulären mitochondrialen Subpopulationen in zwei Modellen untersucht, um die Frage nach einer funktionellen Kompartimentierung der kardialen Energiebereitstellung zu klären. In dem ersten Modell wurden Schweine einer hyperbaren Oxygenierung als Maß für eine erhöhte Sauerstoffverfügbarkeit unterzogen und in dem zweiten Winterschlafmodell wurde die körperliche Inaktivität als Ursache für eine sehr geringe kardiale Arbeitslast analysiert. Die Ergebnisse der Abbildungen 5 bis 21 zeigen, dass eine Kardiomyozyte in Abhängigkeit von der Sauerstoffverfügbarkeit die mitochondrialen Subpopulationen differentiell regulieren kann, wobei die interfibrillären Mitochondrien dabei erstmals als die regulatorische Einheit identifiziert wurden. Die Anpassung der kardialen IFM an die limitierte lokale Sauerstoffverfügbarkeit in den Schweinen unter Normoxie besteht also insgesamt in einer regelrechten „Umorganisation“ der Atmungskette, sodass deren respiratorische Kapazität dramatisch reduziert ist. Die HBO-Behandlung der Schweine beweist dabei, dass die IFM durch die Sauerstoffverfügbarkeit reguliert werden. So wurden die ruhenden IFM durch die hyperbare Oxygenierung auf den Ebenen der Genexpression, der Komplex-Assemblierung und der Enzymaktivitäten in respiratorisch-aktive, ATP-produzierende Mitochondrien überführt. Die Reversibilität dieses Konzeptes konnte im Modell des Winterschläfers gezeigt werden, wo eine Abnahme der kardialen Arbeitslast und damit des kardialen Energieverbrauchs durch induzierte Verminderung der körperlichen Aktivitäten zu einer Inaktivierung der IFM führte.

Für die Untersuchungen des ersten Modells wurden die mitochondrialen Subpopulationen SSM und IFM aus dem linken Ventrikel des Schweines (*Sus scrofa*) isoliert. Zur Analyse des oxidativen Metabolismus in diesen wurde die enzymatische Aktivität der mitochondrialen Komplexe I, III, IV und V spektrophotometrisch gemessen und auf die Citratsynthase-Aktivität, die sich zwischen SSM und IFM nicht unterschied, normalisiert. Wie in den Diagrammen der Abbildung 6 deutlich zu sehen ist, waren die Aktivitäten aller gemessenen mitochondrialen Komplexe in der Kontrollgruppe in den IFM gegenüber den SSM um mindestens 50 % signifikant reduziert. Damit stehen sie im Gegensatz zu publizierten Daten in anderen Tiermodellen, in denen die Atmungskapazitäten in IFM höher als in SSM waren (Palmer et al., 1977; Palmer et al., 1985). Um unspezifische

NADH-Oxidase- und ATPase-Aktivitäten aus den spektrophotometrischen Messungen auszuschließen, wurden die Aktivitäten des Komplex I und der ATPase in *Blue Native*-Gelen mit einer entsprechenden katalytischen in-Gel-Färbung visualisiert (Abbildung 7). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Holo-Enzym-Aktivitäten der katalytischen Färbung den spektrophotometrisch gemessenen reduzierten Komplexaktivitäten in den IFM entsprachen. Um die Ursachen für diese Aktivitätsunterschiede zwischen SSM und IFM zu klären, wurden die mitochondrialen Komplexe mit *Blue Native PAGE* analysiert. In der Abbildung 8A ist deutlich zu erkennen, dass die geringen Aktivitäten der IFM auf geringere Mengen assemblierter Komplexe zurückzuführen ist. Eine Ausnahme bildete dabei nur Komplex III, dessen Proteinmengen zwischen SSM und IFM gleich waren. Die massivste Reduktion der Komplexassemblierung betraf Komplex V, die F_1F_0 -ATPase, die kaum noch detektiert werden konnte. Die oxidative Phosphorylierung ist an die Generierung eines Protonen-gradienten gekoppelt (Mitchell, 1976), welcher von der F_1F_0 -ATPase zur ATP-Produktion genutzt wird. Eine fehlende F_1F_0 -ATPase-Aktivität, wie sie in den IFM gemessen wurde, würde somit eine Protonierung und daher eine Azidifizierung der mitochondrialen Matrix nach sich ziehen. Zur Bestätigung dieser Annahme wurde der Matrix-pH mit dem fluorophoben Farbstoff BCECF analysiert. In den SSM wurde ein Matrix-pH von $8,6 \pm 0,5$ gemessen, welcher somit dem von respiratorisch aktiven Mitochondrien entspricht (Llopis et al., 1998). Im Gegensatz dazu wurde in den IFM ein im Vergleich zu den SSM geringerer Matrix-pH von $6,7 \pm 0,2$ gemessen. Dieses Ergebnis entsprach der erwarteten Azidifizierung und zeigt, dass die IFM respiratorisch inaktiv sind.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der IFM eine Diskrepanz hinsichtlich des von Skulachev hypothetisch konzipierten Modells. In diesem postuliert er, dass es innerhalb einer Kardiomyozyte Cluster von Mitochondrien gibt, die elektrochemisch miteinander verbunden sind, um das Membranpotential von respiratorisch aktiven Mitochondrien zu inaktiven zu transportieren um somit eine ständige ATP-Produktion in allen Mitochondrien unabhängig von ihrer Lokalisierung innerhalb der Kardiomyozyte zu gewährleisten. Würde dies tatsächlich zutreffen, dann dürfte es zum einen keine Matrix-pH -Unterschiede in den mitochondrialen Subpopulationen geben (Skulachev, 2001) und zum anderen hätten die IFM eine assemblierte, funktionale F_1F_0 -ATPase haben müssen. Beide Aspekte konnten in dieser Arbeit experimentell widerlegt werden. Die oben gezeigten Daten lassen vielmehr den konträren Schluss zu, die mitochondrialen Subpopulationen als elektrochemisch

getrennte Einheiten zu betrachten. Obwohl Skulachevs Hypothese hier keine Gültigkeit hat, kann sein vorgeschlagener Mechanismus dennoch in anderen Zellarten möglich sein.

Der mitochondriale oxidative Metabolismus besteht nicht nur aus der oxidativen Phosphorylierung, sondern auch aus den Stoffwechselwegen, die die Substrate für diese liefern. In einer Kardiomyozyte wird die meiste Energie durch die β -Oxidation von Fettsäuren gewonnen (Stanley et al., 2005). Dabei entsteht Acetyl-CoA, was als Substrat für den Zitronensäurezyklus dient. Um zu untersuchen, ob nur die oxidative Phosphorylierung in den IFM limitiert ist, wurden enzymatische Aktivitäten von Schlüsselmolekülen beider Stoffwechselwege analysiert. In den IFM konnte, im Gegensatz zu den SSM, keine enzymatische Aktivität der mitochondrialen Aconitase, einem essentiellen Enzyms des Zitronensäurezyklus, gemessen werden. Die Aconitase ist aufgrund ihres Eisen-Schwefel-Clusters im aktiven Zentrum des Enzym sehr redox-sensitiv und kann daher durch oxidativen Stress inhibiert werden (Gardner, 1997). Oxidativer Stress wird in den Mitochondrien im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung produziert. Obwohl die Aktivitäten der Atmungskette in den IFM aber reduziert sind und somit auch die Rate der Superoxidproduktion, erscheint eine redox-abhängige Herabregulation der Aconitase-Aktivität unwahrscheinlich, kann aber nicht ausgeschlossen werden, da der Redox-Status der mitochondrialen Subpopulationen nicht untersucht wurde und es in der Literatur momentan keine Hinweise über eine redox-unabhängige Modulation der Aconitase-Aktivität gibt. Obwohl die Ursache der Inhibition der Aconitase-Aktivität nicht geklärt werden kann, resultiert eine Hemmung dieser in einer Inhibition des Zitronensäurezyklus, so dass keine Reduktionsäquivalente über diesen als Substrate für die oxidative Phosphorylierung gebildet werden können (Voet D, 1994). In der Abbildung 15 ist zu erkennen, dass die IFM im Vergleich zu den SSM signifikant erhöhte Aktivitäten der Palmitoyl-Acyl-CoA-Dehydrogenase, einem Enzym der mitochondrialen β -Oxidation der Fettsäuren, aufwiesen. Bei der β -Oxidation der Fettsäuren wird reduziertes Flavin-Adenin-Dinukleotid (FADH_2) gebildet, welches dem mitochondrialen Komplex II als Substrat dient (Voet D, 1994). Daher ist anzunehmen, dass die Aktivität der Palmitoyl-Acyl-CoA-Dehydrogenase in den IFM erhöht ist, um über die Bereitstellung von FADH_2 ein geringes Membranpotential aufrecht zu erhalten.

Die gemessenen mitochondrialen Aktivitäts-Unterschiede zwischen SSM und IFM sind möglicherweise auf die Haltung der 3 Monate alten Tiere zurückzuführen, die in ihren engen Käfigen nicht sehr viel Platz für Bewegungen hatten und somit eine reduzierte körperliche Aktivität zeigten. Deshalb erfolgte in den Schweinen kaum jemals eine

Aktivitäts-bedingte maximale Kontraktilitätssteigerung des Herzens mit entsprechender Zunahme der Myokarddurchblutung und optimaler Oxygenierung aller Kardiomyozytenbereiche. Wie bereits erwähnt, haben spätere Untersuchungen an Bio-Schweinen mit Art-gerechten Auslauf-Möglichkeiten die Funktionseinschränkung der kardialen IFM nicht aufgewiesen. Unterstützt wird diese Annahme von subzellulärer Hypoxie in den Herzen der ständig inaktiven Schweine auch durch die Arbeiten von Eiji Takahashi, der zeigen konnte, dass in isolierten Kardiomyozyten erhebliche radiale intrazelluläre Sauerstoff-Gradienten existieren (Takahashi et al., 1999). Daher wurde angenommen, dass die hier gemessenen reduzierten Aktivitäten der IFM auf solche intrazellulären Sauerstoff-Gradienten zurückzuführen sind.

Um eine ausreichende Oxygenierung aller kardialen Mitochondrien zu erreichen und um die möglichen intramyozytären Sauerstoffgradienten auszugleichen, wurden die Schweine einer 6-stündigen HBO-Behandlung unterzogen. Wie in den Abbildungen 6 bis 8 zu erkennen ist, führte diese Behandlung in den IFM zu einem Angleichen aller Komplexaktivitäten auf das Niveau der SSM, deren Aktivitäten keine Unterschiede mehr zeigten. Darüber hinaus wurden auch die Mengen der assemblierten Atmungskettenkomplexe angehoben, welche nicht mehr von denen der SSM unterschieden werden konnten. Die Messung des Matrix-pH in den IFM ergab einen Anstieg auf $7,8 \pm 0,7$ und näherte sich somit nach der HBO-Behandlung dem Matrix-pH der SSM an ($7,6 \pm 0,6$).

Da in den IFM der Kontrolltiere die Menge der assemblierten Komplexe deutlich geringer als in den SSM war und dieses Ungleichgewicht durch die HBO-Behandlung nivelliert werden konnte, stellte sich die Frage, ob das auf einer Neusynthese der Komplexuntereinheiten beruht oder aber auf eine Neu-Assemblierung bereits vorhandener Proteine zurückzuführen ist. Diese Fragestellung betraf insbesondere den Komplex V, der in den IFM unter Kontrollbedingungen kaum noch detektierbar war. Western Blot-Analysen, die in der Abbildung 9 dargestellt sind, ergaben, dass unter Kontrollbedingungen die Expression der α - und β - Untereinheit der F_1F_0 -ATPase in den IFM gegenüber den SSM deutlich reduziert war, aber durch die HBO-Behandlung den SSM angeglichen werden konnte. Daher ist anzunehmen, dass die Rekonstitution des Komplex V nicht nur allein auf einer Neuassemblierung vorhandener Untereinheiten, sondern auch auf einer Neusynthese beruhen muss. Die 2-dimensionale Analyse der Proteinuntereinheiten des nach HBO rekonstituierten Komplex V ergab in den IFM zusätzliche Proteinbanden (siehe Abbildung 8B gekennzeichnet durch die roten Pfeile), die in den SSM nicht zu finden waren. Diese wurden mittels MS/MS als Fragmente der β -

Untereinheit identifiziert und konnten auch im Western Blot nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurden auch Spaltprodukte für die α - Untereinheit von Komplex V gefunden. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass diese Spaltprodukte der α - und β -Untereinheit des Komplex V ein charakteristisches Zeichen für einen gesteigerten oxidativen Stress sind (Belogradov, 1996). Dieser wird wahrscheinlich durch eine disproportionale Atmungskette während der Neuassemblierung nach der HBO-Behandlung verursacht. Das ist an dieser Stelle eine spekulative Annahme, da, wie schon vorher erwähnt, keine Untersuchungen zum Redox-Status gemacht wurden.

Da angenommen wurde, dass die Rekonstitution der Komplexe nach HBO-Behandlung teilweise auf einer Neusynthese der Proteinuntereinheiten beruht, wurde die mitochondriale Genexpression in den mitochondrialen Subpopulationen analysiert. Die Abbildung 11 zeigt, dass eine starke Herabregulation der mitochondrialen Genexpression in den IFM gemessen wurde. Als Ursache dafür wurde die inhibierte Aconitase-Aktivität angenommen, da gezeigt ist, dass dieses Enzym eine duale Funktion besitzt und neben seiner metabolischen Rolle ein Bestandteil des mitochondrialen Nukleoids ist und daher die mtDNA-Stabilität beeinflussen kann (Chen et al., 2005; Shadel, 2005). Daher wurde sowohl die Menge als auch die Integrität der mtDNA untersucht. Wie der Southern Blot in Abbildung 13 zeigt, konnten aber keine Unterschiede hinsichtlich der Integrität oder der Quantität der mtDNA gefunden werden und sind daher als Ursache für die reduzierte Genexpression in den IFM auszuschließen. Eine weitere mögliche Erklärung dafür findet man in den Daten von Eads et al., die die Vermutung zulassen, dass die mitochondriale Transkription in den IFM durch den gemessenen geringen Matrix-pH inhibiert ist (Eads and Hand, 1999). Die Transkription konnte in den IFM durch die HBO-Behandlung massiv gesteigert werden. Bestätigt wurden diese Messungen durch Analyse der Gesamt-RNA der linksventrikulären Gewebe. Auch hier zeigte sich, dass die HBO-Behandlung zu einem signifikanten Anstieg der mitochondrialen Genexpression gegenüber den Kontrollen führte. Dieser Effekt ist allein auf die IFM zurückzuführen, da die mitochondriale Genexpression in den SSM durch die HBO-Behandlung nicht beeinflusst wurde. Die mitochondriale Transkription ist maßgeblich von dem mitochondrialen Transkriptionsfaktor Tfam abhängig (Fernandez-Silva et al., 2003) und dessen Expression wird wiederum durch PGC-1 α über NRF-1 und NRF-2 aktiviert (Puigserver and Spiegelman, 2003). Eine hoch-signifikante Induktion sowohl der Tfam-Expression als auch von PGC-1 α wurde in der Gesamt-RNA von hyperbaren linksventrikulärem Gewebe gemessen. In Anbetracht der Tatsache, dass die HBO-Behandlung isoliert die

mitochondriale Genexpression der IFM betraf, lässt das den Schluss zu, dass, obwohl die PGC-1 α - und Tfam-Expression die gesamte Zelle und jedes Mitochondrium der Zelle betreffen müsste, deren Wirken gezielt nur die IFM zu betreffen scheint. Dieses Phänomen ist bisher nicht erklärbar. Auch in der Literatur wurden keine ähnlichen Beispiele gefunden. Interessanterweise wurden in weiteren Experimenten keine Unterschiede in der Expression anderer mitochondrialer, nukleär-kodierter Proteine gefunden. Somit bezog sich die gesteigerte Genexpression allein auf die der mitochondrialen Komplexuntereinheiten.

In Abbildung 16 ist zu sehen, dass in den IFM der Kontrolltiere ein signifikant erhöhter Cytochrom *c*-Gehalt gemessen wurde. Dieses erstaunliche Ergebnis spricht gegen einen pro-apoptotischen Phänotyp der IFM, der eigentlich durch die reduzierten Komplexaktivitäten, der fehlenden F₁F₀-ATPase-Aktivität sowie dem inhibierten Zitronensäurezyklus in den IFM der Kontrolltiere zu erwarten gewesen wäre. Es wurde die Expression von Opa-1 untersucht, da von diesem bekannt ist, dass es einen apoptotischen Zelltod verhindern kann, in dem es durch Umbau der Cristae-Struktur, die Freisetzung von Cytochrom *c* verhindert (Frezza et al., 2006), (Olichon et al., 2007). Die Hauptfunktion dieser GTPase, die in der mitochondrialen Innenmembran lokalisiert ist, ist es, die mitochondriale Fusion der inneren mitochondrialen Membranen zu unterstützen (Delettre et al., 2000). Western Blot-Analysen ergaben eine niedrigere Opa1-Expression in den IFM im Vergleich zu den SSM, die auch durch HBO-Behandlung nicht wieder auf das Expressionsniveau der SSM angehoben werden konnte (Abbildung 17). Vielmehr zeigte sich ein unterschiedliches Expressionsmuster der Opa1-Isoformen zwischen SSM und IFM. Alternatives Spleißen produziert 8 unterschiedliche humane Opa-1 Transkripte, die darüber hinaus auch noch proteolytisch gespalten werden können. Momentan wird angenommen, dass die langen Transkripte für die Fusion-abhängige Funktion zuständig sind (Olichon et al., 2007). Auffällig ist, dass in den IFM ein kürzeres Transkript exprimiert ist, welches in den SSM nicht zu detektieren war. Bei diesem könnte es sich um ein Spaltprodukt der Protease PARL handeln, von welchem gezeigt ist, dass es eine anti-apoptotische Funktion besitzt, indem es die Freisetzung von Cytochrom *c* verhindert (Cipolat et al., 2006).

Eine geringe mitochondriale respiratorische Aktivität resultiert in einer geringeren ATP-Produktion (Voet D, 1994). Da 90% des produzierten ATP einer Kardiomyozyte für die Kontraktion genutzt wird, resultiert aus einer reduzierten mitochondrialen respiratorischen

Aktivität auch ein geringeres Kontraktionsvermögen. Trotz des völligen Fehlens der F_1F_0 -ATPase in den IFM, was aufgrund der reduzierten ATP-Produktion in einer eingeschränkten Kontraktionsfähigkeit der benachbarten, inneren Myofibrillen der Kardiomyozyten resultieren muss, wurden die Tiere tierärztlich als völlig gesund eingestuft. Das lässt darauf schließen, dass die von den SSM produzierten Mengen an ATP für die Kontraktionsarbeit der äußeren Kardiomyozyten-Myofibrillen und für die Funktion des Herzens in den Tieren ohne körperliche Aktivität ausreichend waren. Da die Tiere aufgrund ihrer Haltung in engen Ställen nur eine geringe Bewegungsfreiheit und damit einen geringen Bedarf an Herzarbeit hatten, wurde daher angenommen, dass die Aktivität der IFM der tatsächlichen Sauerstoffverfügbarkeit angepasst werden konnte. Daher hatten diese geringen Aktivitäten der IFM auch keinen nachteiligen Effekt für die Herzfunktion der Schweine. Die Reversibilität der angenommenen Anpassungsfähigkeit der IFM wurde durch die HBO-Behandlung, der Schweine gezeigt. In Abhängigkeit von der Sauerstoffverfügung konnten innerhalb von 6 Stunden die respiratorisch ruhenden IFM in metabolisch aktive Mitochondrien umgewandelt werden, induziert durch eine gesteigerte Genexpression und Komplexassemblierung. Wie schon oben erwähnt widerlegen diese Daten Skulachevs Hypothese in Kardiomyozyten. Stattdessen werden mit diesen Ergebnissen Argumente für eine alternative Hypothese geliefert. Unter der Annahme, dass die Schweine ein Modell chronischer, nicht art-gerechter Immobilisation darstellen, lassen die differentielle Regulation von SSM und IFM auf einen Mechanismus schließen, der eine parallele und reversible Abschaltung von Nukleus-nahen Prozessen der Energiebereitstellung (durch die Mitochondrien) und des Energieverbrauchs (durch die Kontraktion der Myofibrillen) ermöglicht unter Bedingungen, wo die mechanische Herzarbeit gering ist. Dann ist dementsprechend auch die Koronardurchblutung und Sauerstoffverfügbarkeit reduziert. Zusammenfassend können demnach die mitochondrialen Subpopulationen als funktionelle Kompartimente der kardialen Energiebereitstellung gesehen werden.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Problematik der funktionellen Kompartimentierung durch Inaktivität in einem weiteren Modell analysiert. Bei diesem Modell handelte es sich um den Syrischen Goldhamster, bei dem die körperliche Inaktivität durch den Eintritt in den Winterschlaf erreicht wird. Bei Winterschläfern ist der Übergang in den sogenannten Torpor begleitet von einer massiven Verlangsamung des Metabolismus und der Herzarbeit. Dabei sind die Tiere vollkommen inaktiv und befinden

sich in einem Zustand der körperlichen Starre. Obwohl die Induktion des Winterschlafes kein monokausaler Prozess ist, beschränkten sich die Untersuchungen auf die Analyse der körperlichen Aktivität für die Funktion der mitochondrialen Subpopulationen. Für die Untersuchungen wurden die Tiere in 3 Gruppen unterteilt - in eine Kontrollgruppe, eine Gruppe mit reduzierter physischer Aktivität und eine Gruppe, die den Torpor erreicht hat. Eine Abnahme der körperlichen Aktivität bis hin zum Erreichen des Torpors wurde durch eine stufenweise Reduktion der Temperatur sowie der Licht-Dunkelzeiten erreicht. Die Analyse der linksventrikulären mitochondrialen Subpopulationen zeigte, dass in der Kontrollgruppe die Cytochrom *c*-Reduktionsrate in den IFM signifikant gegenüber den SSM erhöht war. Eine vergleichbar erhöhte Oxidation von Substraten in den IFM wurde bereits bei der erstmaligen Analyse der mitochondrialen Subpopulationen im Rattenherz gezeigt (Palmer et al., 1977). Die Torporinduktion geht mit einer Abnahme der Cytochrom *c* Reduktionsrate sowohl in den SSM als auch in den IFM einher und kann mit der reduzierten „*State III*“-Atmung in Lebermitochondrien von torpiden Tieren verglichen werden (Martin et al., 1999). In der Abbildung 21 ist deutlich zu erkennen, dass die IFM im Vergleich zu den SSM dabei einen überproportionalen Aktivitätsverlust erlitten. Diese Tatsache unterstützt damit die Hypothese der Abschaltung von Nukleus-nahen Prozessen der Energiebereitstellung, wenn die mechanische Herzarbeit gering ist und beweist die Reversibilität des Mechanismus.

Zusammenfassend haben beiden Modelle gezeigt, dass eine Kardiomyozyte in Abhängigkeit ihres Energiebedarfs und der Sauerstoffverfügbarkeit die mitochondrialen Subpopulationen differentiell und reversibel regulieren kann, wobei die interfibrillären Mitochondrien als regulatorische Einheit identifiziert wurden. Obwohl in dieser Arbeit die grundlegende Frage beantwortet wurde, wie eine Kardiomyozyte ihre Energiebereitstellung dem Bedarf und der lokalen Sauerstoffverfügbarkeit anpassen kann, fehlt bisher noch der Nachweis der funktionellen Kompartimentierung des Energieverbrauchs durch die mechanische Arbeit der Myofibrillen. Auch muss noch der Mechanismus identifiziert werden, wie die reversible Inaktivierung von Mitochondrien und Myofibrillen gekoppelt ist. Ein potentieller Mediator könnte dabei Mikrodomänen von freiem Ca^{2+} spielen, die auch schon in einem Modell von Korzeniewski et al. in diesem Zusammenhang diskutiert wurden (Korzeniewski, 2007).

4.2 Die Funktion mitochondrialer Subpopulationen bei fortgeschrittener Kardiomyopathie

Kardiomyopathien sind laut WHO-Definition Erkrankungen des Herzmuskels verbunden mit einer kardialen Dysfunktion. Im Zuge der Erkrankung verschiebt sich die kardiale Substratpräferenz und damit der gesamte kardiale Metabolismus. Der bevorzugte Stoffwechselweg zur ATP-Gewinnung schaltet von der β -Oxidation auf die Glucose-Oxidation (Stanley et al., 2005). Das resultiert in einer progressiven Abnahme des ATP-Gehaltes und somit in der Kontraktionsfähigkeit des Herzens. Im Endstadium dieser Erkrankung sind diese Patienten bettlägerig. Um unsere Hypothese hinsichtlich der reversiblen Aktivierung/Inaktivierung der IFM weiter zu prüfen, wurde Probenmaterial von explantierten Herzen von Patienten analysiert, die sich im Endstadium einer DCM bzw. ICM befanden, was mit einer hochgradigen Abnahme der Ejektionsfraktion und somit des Kontraktionsvermögens verbunden ist. Der Hypothese entsprechend wurde auch hier eine deutlich reduzierte Aktivität der IFM erwartet. Aus diesen Proben wurden die mitochondrialen Subpopulationen isoliert und analysiert, wobei aufgrund des geringen Probenmaterials keine mitochondrialen Atmungsketten-Aktivitäten gemessen werden konnten. Auffällig bei der Isolation waren die deutlich reduzierten Mengen der IFM in diesen Proben. Mittels Western-Blot-Analysen konnte in den IFM der DCM als auch der ICM keine Expression der β -Untereinheit der ATPase und nur eine geringe Expression von VDAC nachgewiesen werden (Abbildung 22). Es ist deutlich zu erkennen, dass auch die Opa1-Expression in den IFM extrem reduziert war. Während die SSM ein unauffälliges Opa1-Expressionsmuster zeigten, konnte in den IFM nur noch eine schwache Expression mehrerer Opa1- Abbauprodukte detektiert werden. Wie in Abbildung 23 zu sehen ist, konnten keine langen Opa1-Transkripte detektiert werden. Ein Verlust der langen Opa1-Transkripte führt zu einer Fragmentierung der Mitochondrien (Olichon et al., 2003). Eine solche Fragmentierung der IFM konnte in der Abbildung 24 gezeigt werden. Auch Chen et al. zeigten eine reduzierte Opa-1-Expression in humanen ICM –Proben, differenzierten dabei aber nicht zwischen den einzelnen mitochondrialen Subpopulationen (Chen et al., 2009). Ein Verlust von Opa1 wurde auch mit der Induktion von Autophagie in Verbindung gebracht (Twig et al., 2008). Autophagie ist im Zusammenhang mit vakuolisierten Mitochondrien und dem Verlust von Myofibrillen im DCM-Herz beschrieben (Shimomura et al., 2001). Weiter zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen von herzinsuffizienten Patienten-Proben einen vorrangig im perinukleären Teil der Kardiomyozyten stattfindenden Verlust von Myofibrillen und Mitochondrien (Olsen, 1976).

Auch diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass die IFM die regulatorische Einheit der kardialen Energiebereitstellung darstellen. Hier zeigt sich aber auch, dass die Reversibilität der dynamischen Anpassung der IFM begrenzt ist. Dadurch ergibt sich für die IFM eine wichtige Funktion bei der Entstehung der Herzinsuffizienz, die wie folgt zustande kommt: bei bereits eingeschränkter myokardialer Funktion, die mit einer reduzierten körperlichen Belastbarkeit einhergeht, ist die Sauerstoffversorgung der Kardiomyozyten herabgesetzt, was eine metabolische Inaktivierung der IFM zur Folge hat. Eine reduzierte IFM-Aktivität resultiert in einer geringeren ATP-Produktion, was wiederum eine verminderte Kontraktilität zur Folge hat. Diese führt schlussendlich zu einer verringerten pulmonalen Sauerstoffaufnahme des Blutes, wodurch die IFM in einem *circulus vitiosus* geraten und weiter inaktiviert werden. Am Ende dieses Prozesses steht die dekompenzierte bzw. terminale Herzinsuffizienz, die morphologisch durch eine zentrale Autolyse der Kardiomyozyte gekennzeichnet ist.

4.3 mNOA1 als Regulator der mitochondrialen Atmung

Die Aktivierung der interfibrillären Mitochondrien nach hyperbarer Oxygenierung beruhte u.a. auf einer erhöhten Expression von PGC-1 α , dem Hauptregulator der mitochondrialen Biogenese. Die PGC-1 α -Expression kann durch viele verschiedene Signaltransduktionswege induziert werden. Eine davon stellt der NO-vermittelte Signalweg dar (Nisoli et al., 2003). NO kann nicht nur die mitochondriale Biogenese induzieren, sondern ist auch ein gut charakterisierter Modulator der mitochondrialen Energiebereitstellung (Brown, 2007). Keine der drei beschriebenen NO-Synthasen (NOS) (Stuehr and Griffith, 1992) konnte, auch durch Arbeiten unserer Arbeitsgruppe, zweifelsfrei in Mitochondrien nachgewiesen werden. Die Existenz einer mitochondrialen NOS ist in der Literatur Gegenstand heftiger Diskussionen (Brookes, 2004). Nachdem eine neue Klasse pflanzlicher, angeblich NO-produzierender Enzyme auch in Säugerzellen nachgewiesen werden konnte (Zemojtel et al., 2004), (Guo et al., 2003) und diese eine prädikierte mitochondriale Import-Sequenz aufwiesen, sollte mNOA1 als potentieller Mediator und Modulator der funktionellen Kompartimentierung kardialer Energiebereitstellung analysiert werden.

Da es sich um ein noch wenig untersuchtes Protein handelte erfolgten die ersten Untersuchungen zur Expression des Proteins und ergaben, dass mNOA1-mRNA in allen untersuchten Geweben exprimiert ist, wobei eine erhöhte Expression in Geweben mit

quergestreifter Muskulatur gemessen wurde. Wie der Abbildung 26 zu entnehmen ist, wurde die höchste Expression in den beiden Skelettmuskeln *Musculus Gastrocnemius* und *Musculus Soleus* gemessen. Daher wurde die Maus-Myoblastenzelllinie C2C12 für die nachfolgenden *in vitro*- Experimente ausgewählt. Initiale *in silico*-Analysen mit MitoProt II prädiktierten das Vorhandensein eines N-terminalen mitochondrialen Importsignals. Experimentell validiert wurde die prädizierte mitochondriale Lokalisation von mNOA1 durch die konfokal-mikroskopische Analyse von mNOA1-GFP exprimierenden C2C12-Zellen. Die Bilder der Abbildung 27 zeigen deutlich eine vollständige Überlagerung der grünen GFP-Fluoreszenz mit der roten Fluoreszenz des Mito-Trackers und bestätigen somit eine mitochondriale Lokalisation von mNOA1 in C2C12-Myoblasten. Auch *in vivo* konnte eine Expression des mNOA1-Proteins in Mitochondrienpräparationen von Herz und Leber der Maus gezeigt werden. Andere Gruppen konnten das auch für die orthologen Proteine anderer Spezies bestätigen, wobei auch sie diese als Fusionsproteine überexprimierten und mit Hilfe der Konfokalmikroskopie analysierten (Guo and Crawford, 2005; Tang et al., 2009; Zemojtel et al., 2006b). Mit Immungold-Markierung und elektronenmikroskopischer Analyse konnten diese die Lokalisierung an bzw. nah der mitochondrialen Innenmembran spezifizieren (Tang et al., 2009; Zemojtel et al., 2006b). Obwohl atNOS1 als NO produzierendes Protein dargestellt wurde, konnte in mNOA1-überexprimierenden Zellen mit 3 verschiedenen Methoden (kolorimetrischer und radioaktiver Citrullin-Assay, DAF-2DA-Assay) keine NO-Produktion gezeigt werden, was den derzeitigen Literaturerkenntnissen entspricht (Moreau et al., 2008; Zemojtel et al., 2006a).

4.3.1 mNOA1 erhöht die mitochondriale Respiration

Der Einfluss von mNOA1 auf die mitochondriale Atmungskette wurde in mNOA1-überexprimierenden Zellen durch die Messung enzymatischer Aktivitäten ausgewählter Komplexe untersucht. Die Aktivitätsmessungen der Einzelkomplexe I, III und IV ergaben keine Unterschiede nach mNOA1-Transfektion. Die Diagramme in Abbildung 29 und 30 zeigen, dass signifikant erhöhte Raten des Elektronenflusses von Komplex I auf Komplex III sowie eine signifikant erhöhte Aktivität der F_1F_0 -ATPase gemessen wurde. Der Elektronentransport durch die Atmungskettenkomplexe ist an die Generierung eines Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran gebunden, dessen Energie zur ATP-Produktion genutzt wird. Daher resultiert ein erhöhter Elektronenfluss in einer

Erhöhung der zellulären ATP-Konzentration. Übereinstimmend damit führte die Überexpression von mNOA1 zu einem signifikant erhöhten ATP-Gehalt im Vergleich zu Mock-transfizierten Zellen.

Eine charakteristische Domäne von mNOA1 ist die P-loop-Domäne, die in allen homologen Proteinen anderer Spezies konserviert ist (Moreau et al., 2008). Bei dieser Domäne handelt es sich um ein GTP-Bindungs-Motiv, welches eine GTPase-Aktivität besitzt (Leipe et al., 2002). Eine GTP-hydrolysierende Funktion zeigten Moreau et al. in ausführlichen Experimenten für das *Aribidopsis thaliana* homologe Protein atNOA1 (Moreau et al., 2008). Um die Funktion dieser Domäne bei der Erhöhung des Elektronenflusses durch mNOA1 zu charakterisieren, wurde eine GTPase-defiziente Mutante von mNOA1, mNOA1 Δ P-loop, generiert. Das Ergebnis der Aktivitätsmessungen ist in Abbildung 31 dargestellt und zeigt deutlich, dass die Überexpression dieser Mutante keinen Einfluss auf die Rate des Elektronenflusses hatte. Das lässt darauf schließen, dass die Erhöhung des Elektronenflusses einem GTPase-aktiven Mechanismus zugrunde liegt. In den Mitochondrien lokalisieren GTPasen vor allem in der Außen- und Innenmembran bzw. im Intermembranraum und haben eine wichtige Rolle beim Modellieren der Cristae und somit der mitochondrialen Struktur (Misaka et al., 2006). Essentiell sind mitochondrialen GTPasen für die Fusion und Fission, bedeutende Prozesse zur Erhaltung der mitochondrialen Funktionalität (Hom and Sheu, 2009). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Fission essentiell für die normale Atmungskettenfunktion ist (Benard et al., 2007), was dabei den mitochondrialen GTPasen eine Rolle als zentrale Regulatoren der Bioenergetik impliziert. Unter Beachtung der in dieser Arbeit erstmals gezeigten GTP-Hydrolyse-abhängigen Funktion von mNOA1 auf die Erhöhung der mitochondrialen Respiration, passt dieses Protein sehr gut in dieses Konzept.

4.3.2 mNOA1 kontrolliert die mitochondriale Respiration über Superkomplexassemblierung

Aufschluss über den molekularen Mechanismus der mNOA1-Funktion sollten die Interaktionspartner geben. Es wurden bereits direkte Interaktionen von mNOA1 mit der mitochondrialen Atmungskette vermutet (Zemojtel et al., 2006b), (Tang et al., 2009) und konnten in dieser Arbeit durch SILAC-basierte Immunpräzipitationen bestätigt werden. Der Vorteil der SILAC-Methode liegt darin, dass unspezifische Interaktionen durch den quantitativen Vergleich mit der Kontrolle ausgeschlossen werden können. Im Gegensatz zu

Yeast-Two-Hybrid-Analysen, mit denen direkte Interaktionen mit einem einzigen Gen/Protein bestimmt werden können, werden bei Immunpräzipitationen in Abhängigkeit von der Stringenz der Elutionsbedingungen auch gesamte Proteinkomplexe eluiert. In Tabelle 8 sind die 30 mitochondrialen Proteine zusammengefasst, die mittels Massenspektrometrie identifiziert wurden. 13 Proteine von diesen sind Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe I, III, IV und V. Es wurden keine Untereinheiten von Komplex II identifiziert. Eine Erklärung dafür findet man in der supramolekularen Anordnung der Atmungskettenkomplexe. Obwohl die einzelnen Komplexe der Atmungskette untersucht sind, gibt es hinsichtlich der supramolekularen Organisation noch Unklarheiten. In der Literatur sind momentan zwei Modelle beschrieben, die sogenannten „*fluid state*“- und „*solid state*“-Modelle. Dem „*fluid state*“-Modell nach diffundieren die Atmungskettenkomplexe I bis IV frei durch die innere Mitochondrienmembran, wobei der Elektronentransfer auf zufälligen Kollisionen mit den einzelnen Bestandteilen basiert. Gestützt wird dieses Modell dadurch, dass die einzelnen Komplexe in ihrer enzymatisch aktiven Form isoliert werden können (Hackenbrock et al., 1986). Diesem Modell gegenüber steht das „*solid state*“-Modell, in welchem davon ausgegangen wird, dass die einzelnen Komplexe zu Superkomplexen, die auch als Respirasom bezeichnet werden, assemblieren, wodurch ein direkter Transfer der Elektronen und somit eine effizientere Atmung möglich ist (Schagger and Pfeiffer, 2000). In den Mitochondrien von Säugerzellen erfolgt die Assemblierung zu Superkomplexen durch die Komplexe I, III und IV, die in unterschiedlichen Stöchiometrien vorliegen können. Komplex II wurde bisher in keiner Superkomplexassemblierung gefunden (Bianchi et al., 2004), (Schagger and Pfeiffer, 2000) und keine Untereinheit dieses Komplexes konnte als mNOA1-Bindungspartner identifiziert werden. Daher ließen die 13 identifizierten Komplex-Untereinheiten erstmals auf das Vorhandensein von mNOA1 in den mitochondrialen Superkomplexen schließen.

Auch Komplex V wurde bisher nicht als Teil der Superkomplexe gezeigt, obwohl direkte Interaktionen des Komplexes mit Untereinheiten von Komplex I und IV beschrieben wurden (Aggeler et al., 2002). Komplex V liegt nicht nur als monomerer Komplex vor, sondern existiert auch als Homo-Oligomer (Krause et al., 2005; Wittig et al., 2006b). In der Literatur sind sogenannte „*ATP-Synthasome*“ beschrieben (Ko et al., 2003) und deren 3D-Struktur elektronenmikroskopisch aufgeklärt (Chen et al., 2004). Die ATP-Synthasome sind aus der F₁F₀-ATPase, ANT und dem Phosphat-Transporter zusammengesetzt. Diese Proteine befinden sich auch unter den mitochondrialen Proteinen, die als mNOA1-Interaktionspartner in dieser Arbeit identifiziert wurden. ANT wiederum bildet zusammen

mit den auch identifizierten Proteinen VDAC, Hexokinase und den Phosphattransportern die sogenannte „*permeability transition pore*“ (PTP) (Javadov and Karmazyn, 2007). Darüber hinaus wurden auch die Prohibitine 1 und 2 identifiziert, die zusammen den hochmolekularen Prohibitin-Komplex bilden (Nijtmans et al., 2000), welcher in der inneren Mitochondrienmembran mit ANT, VDAC2 und Hax-1 interagiert (Kasashima et al., 2006). Ferner sind Interaktionen der Prohibitine mit den mitochondrial-kodierten Proteinen ND4 und ND5 beschrieben, die Bestandteil des Atmungskettenkomplex I sind (Bourges et al., 2004). Die in der von Tang et al. publizierte Arbeit beschriebenen hNOA1- Interaktionspartner Dap3/Mrp-S29, Mrp-S27 und Mrp 112 konnten für mNOA1 nicht bestätigt werden (Tang et al., 2009).

Obwohl alle identifizierten Proteine in supramolekularen Komplexen vorkommen, wurde das Hauptaugenmerk auf die Interaktionen mit den Atmungskettenuntereinheiten gelegt, da die Überexpression von mNOA1 zu einer Veränderung der mitochondrialen Respiration führte. Da diese nicht die NADH-Oxidationsrate des Komplex I änderte, aber zu einem erhöhten Elektronenfluss auf Komplex III führte und hinsichtlich der identifizierten Interaktionspartner, wurde vermutet, dass mNOA1 eine Rolle bei der Assemblierung bzw. Stabilisierung der Superkomplexe spielt. Unterstützt wird diese Hypothese durch Experimente, die zeigen, dass die Superkomplexassemblierung einen effizienteren Elektronentransport zur Folge hat (Schagger and Pfeiffer, 2000).

Den ersten Beweis dieser Hypothese liefert die sh-RNA vermittelte Herabregulation der mNOA1-Expression. Wie der Abbildung 40 zu entnehmen ist, zeigte diese einen signifikant reduzierten Elektronenfluss zwischen Komplex I und III. Bestätigt werden diese Daten durch die Arbeit von Tang et al. (Tang et al., 2009), in welcher eine induzierte Herabregulation von hNOA1 (dem humanen Homolog) in Hela-Zellen gezeigt ist, die zu einer Reduktion des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs um 20 % führte. Auf molekularer Ebene ist der signifikant reduzierte Elektronenfluss zwischen Komplex I und III zurückzuführen auf eine Abnahme der Menge assemblierter Komplexe nach sh-mNOA1-Transfektion. Wie der Abbildung 42A deutlich entnommen werden kann, führte die Herabregulation von mNOA1 zu einer Reduktion der assemblierten Komplexe IV und V sowie zu einer dramatischen Abnahme der assemblierten Superkomplexe mit errechneten Molekulargewichten von 1717 kDa, 1981 kDa und 2158 kDa die kaum noch zu detektieren waren. Auf den Superkomplex mit dem errechneten Molekulargewicht von 1532 kDa sowie auf Komplex III hatte die induzierte Reduktion von mNOA1 keinen Einfluß. Nach den in Wittig et al. bestimmten Molekulargewichten der mitochondrialen

Superkomplexe entspricht ein Molekulargewicht von 1532kDa einer supramolekularen Zusammensetzung von I₁III₂ (Wittig et al.,2010). Die Superkomplexe mit höheren Molekulargewicht setzen sich zusätzlich aus Komplex IV in unterschiedlichen Stöchiometrien zusammen (1717 kDa = I₁III₂IV₁; 1981 kDa = I₁III₂IV₂; 2158 kDa = I₁III₂IV₁) und gerade die Assemblierung dieser Superkomplexe ist durch die Repression der mNOA1-Expression gestört.

Die sh-RNA vermittelte Herabregulation der mNOA1-Expression zeigte nicht nur einen signifikant reduzierten Elektronenfluss zwischen Komplex I und III, sondern auch einen signifikant reduzierten ATP-Gehalt. Zurückzuführen ist dieser zum einen auf die Abnahme der Menge an assemblierten Komplex V nach mNOA1-Herabregulation und zum anderen auf einen nicht ausreichend aufgebauten Protonengradienten, der die stark endergonische Reaktion der ATP-Produktion treiben könnte, da nach der Mitchell-Theorie der Elektronentransport an den Aufbau des Protonengradienten gekoppelt ist (Mitchell, 1976) Die ersten Hinweise, dass mNOA1 eine regulatorische Funktion in der Assemblierung der einzelnen Komplexe zu Superkomplexen besitzt, wurden aus den Komplex I+III Aktivitätsmessungen von mNOA1-überexprimierenden und mNOA1-herabregulierten Zellen erhalten und wurden in zwei weiteren Experimenten bestätigt.

In einem Saccharose-Gradienten von Digitonin-solubilisierten Mauserz-Mitochondrien wurden Fraktionen gesammelt und mittels Western-Blot analysiert. Das Ergebnis dieses Experimentes ist in Abbildung 34 zu sehen und zeigt, dass der Hauptanteil von mNOA1 mit dem Komplex IV ko-migriert, ein kleinerer Anteil aber auch in Fraktionen mit einem höheren Molekulargewicht gefunden wurde und dort mit Proteinen von Komplex I sowie dem Prohibitin 2 ko-migriert. In einem zweiten Experiment wurde geprüft, ob eine direkte Interaktion zwischen den Atmungskettenkomplexen und mNOA1 stattfindet. Dazu wurden die Atmungskettenkomplexe aus Digitonin-solubilisierten Mauserz-Mitochondrien in einem *Blue Native Gel* isoliert und diese in einer zweiten Dimension analysiert. In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass mNOA1 direkt mit den Atmungskomplexen interagiert. Dabei fand der Hauptteil der Interaktion, dem vorherigen Ergebnis entsprechend, mit dem Komplex IV statt. Dennoch zeigten sich, wenn auch schwächer, Interaktionen mit dem Komplexen I und V. Darüber hinaus konnte mNOA1-Protein in den Superkomplexen nachgewiesen werden (Abbildung 35). Ausschließlich in diesen konnte die Expression von Prohibitin-2 gezeigt werden, worauf auch schon in der Arbeit von Acin-Pérez et al. hingewiesen wurde (Acin-Perez et al., 2008). Ein, wenn auch sehr spekulativer, Hinweis auf eine direkte Interaktion von mNOA1 mit Prohibitin-2 kann in

der Publikation von Kasashima et al. gefunden werden. In dieser ist eine Coomassie-Färbung einer Flag-Immunpräzipitation von Flag-Prohibitin-2 gezeigt, in welcher eine starke Bande auftritt, auf welche die Autoren nicht näher eingehen, die aber größtmäßig mNOA1 entsprechen könnte (Kasashima et al., 2006). Auch in diesem Experiment konnte eine Ko-Migration sowie eine starke Interaktion von mNOA1 und Komplex IV in Mausmitochondrien gezeigt werden. Dennoch ist es erstaunlich, dass es in keiner Proteom-Analyse von Komplex IV, der viel untersucht wurde, Hinweise auf mNOA1 gibt (Capaldi et al., 1983; Khalimonchuk and Rodel, 2005; Tsukihara et al., 1996) und eine Interaktion von hNOA1 mit Komplex IV in der Publikation von Tang et al. ausgeschlossen wurde (Tang et al., 2009). In unserer Arbeitsgruppe konnte Marie-Elisabeth Ingelmann in einem Yeast-Two-Hybrid-Assay auch eine direkte Interaktion von mNOA1 mit den Komplex Untereinheiten ND2 (Komplex I), Cytb (Komplex III) und Cox3 (Komplex IV) zeigen. Dieses Experiment unterstützt mit seinem Ergebnis die identifizierten mNOA1-Interaktionspartner. Daher wird angenommen, dass mNOA1 mit diesen 3 Proteinen der Atmungskettenkomplexe interagiert, um die Superkomplexassemblierung zu treiben.

In den SILAC-basierten Immunpräzipitationen wurden Hinweise gegeben, dass mNOA1 dimerisiert. Bestätigt wurde diese Annahme mit einem Immunpräzipitationsexperiment, in welchem C2C12-Zellen mit mNOA1-Flag und mNOA1-GFP ko-transfiziert wurden. Abbildung 33 zeigt, dass das mNOA1-GFP-Fusionsprotein im Eluat der anschließend stattfindenden Flag-IP nachgewiesen werden konnte. Um eine mögliche Rolle dieser Homo-Dimerisierung von mNOA1 bei der Superkomplexassemblierung zu untersuchen, wurde eine zweite Dimension der vorher durch *Blue Native-PAGE* isolierten Atmungskettenkomplexe unter denaturierenden, aber nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Unter diesen experimentellen Bedingungen konnte eine zweite mNOA1-spezifische Bande nur in den Superkomplexen auf einer Höhe von ungefähr 160 kDa detektiert werden (Abbildung 36).

Daraus wurde geschlussfolgert, dass mNOA1 nach Bindung an ND2, Cytb und Cox3 durch Homo-Dimerisierung eine Superkomplexbildung forciert oder stabilisiert. Dieser Prozess ist abhängig von der mNOA1-GTPase-Aktivität. Dabei ist noch zu klären, ob die Homo-Dimerisierung von der GTPase-Aktivität abhängig ist und welche Rolle Prohibitin-2 bzw. der Prohibitin-Komplex dabei spielt.

In der mNOA1-Proteinsequenz konnte *in silico* eine PEST-Sequenz prädiziert werden. *In vitro* konnten für die mNOA1-mRNA eine Halbwertszeit von ungefähr 4 Stunden und für

das mNOA1-Protein eine von 8-12 Stunden bestimmt werden, die somit als gering einzustufen sind. PEST-Sequenzen kommen insbesondere bei zellulären Schlüsselmolekülen, wie metabolische Regulatoren, Transkriptionsfaktoren, Proteinkinasen, Proteinphosphatasen und den Cyklinen vor (Rechsteiner and Rogers, 1996). Diese Tatsache, zusammengenommen mit den gemessenen, geringen Halbwertszeiten sprechen dafür, dass mNOA1 in der Zelle wichtige regulatorische Funktionen besitzt und unterstützen die Bedeutung dieses Proteins für den mitochondrialen Metabolismus.

4.3.3 Die Herabregulation von mNOA1 induziert Apoptose

Die Messung der Komplex I-abhängige NADH-Oxidationsrate in sh-mNOA1-transfizierten Zellen ergab eine signifikante Erhöhung gegenüber der Mock-Transfektion bei gleichzeitiger Reduktion des Elektronenflusses auf Komplex III. Diese Diskrepanz besagt, dass die zur Verfügung stehenden Elektronen nicht weiter in die Atmungskette gespeist wurden. Die Wanderung der Elektronen durch die Atmungskettenkomplexe wird durch die zunehmenden Redoxpotentiale der einzelnen Komplexe angetrieben. Können die Elektronen des Komplex I nicht weitergegeben werden, erfolgt der direkte Transfer eines Elektrons vom reduzierten Flavin-Nukleotid auf Sauerstoff unter der Bildung von Superoxidradikalen (Kussmaul and Hirst, 2006). Eine erhöhte Superoxidradikalproduktion konnte in sh-mNOA1-transfizierten Zellen mit Mitosox nachgewiesen werden (Abbildung 45). Um das Ausmaß des oxidativen Stresses innerhalb der Mitochondrien bewerten zu können, wurde der Redoxzustand von Thioredoxin-2 untersucht. Trx2 gehört neben Gluthation zu den zwei in den Mitochondrien vorkommenden Redoxsystemen, die vor den Schäden durch oxidativen Stress schützen sollen (Orrenius et al., 2007). Da Gluthation ständig zwischen dem Zytosol und den Mitochondrien transportiert wird, wurde das Hauptaugenmerk auf die Analyse des stets in den Mitochondrien vorkommenden Trx2 gelegt. Abbildung 47 zeigt die Analyse mit einem redox-sensitiven Western Blot, die ergab, dass der Hauptanteil von Trx2 in den sh-mNOA1-transfizierten Zellen im oxidierten Zustand vorlag. Dieses Experiment wies auf den massiven oxidativen Stress hin, der mit der Herabregulation von mNOA1 einhergeht und der die Hauptursache für das Sterben der Zellen nach der sh-mNOA1-Transfektion ist, da das Sterben der Zellen durch die Zugabe des Antioxidans N-Acetylcystein NAC während der Transfektion verhindert werden konnte.

Nach der Mitchell-Theorie (Mitchell, 1976) ist eine weitere Folge des reduzierten Elektronenflusses auf Komplex III eine Abnahme des Protonengradientens. Ein nicht ausreichend aufgebauter Protonengradient resultiert in einem verminderten Membranpotential. Ein reduziertes Membranpotential wurde durch die Analyse der sh-mNOA1-transfizierten Zellen mit JC-1 bestätigt (Abbildung 43). Es ist gezeigt, dass eine Abnahme des Membranpotentials zu einem Öffnen der sogenannten „*permeability transition pore*“ (PTP) (Bernardi et al., 1992) und somit zu einer Depolarisation der Mitochondrien führen kann.

Sowohl eine Abnahme des Membranpotentials als auch oxidativer Stress können einen mitochondrial-induzierten Zelltod auslösen, der sowohl nekrotisch als auch apoptotischer Natur sein kann. Um den Zelltod definieren und zwischen Nekrose - und Apoptose-Induktion nach sh-mNOA1-Transfektion unterscheiden zu können, wurde der ATP-Gehalt der Zellen gemessen, da in der Literatur bekannt ist, dass der ATP-Gehalt entscheidend für einen nekrotischen oder apoptotischen Zelltod ist (Eguchi et al., 1997). Wie Abbildung 41 zeigt, wurde ein signifikant reduzierter ATP-Gehalt nach Herabregulation von mNOA1 im Vergleich zur Mock-Transfektion gemessen. Somit kann der beobachtete Zelltod nach Pedersen als apoptotisch eingestuft werden (Pedersen, 1999). Ein nekrotischer Zelltod hätte eine völlige Depletion des ATP-Gehaltes bedeutet. Die Ergebnisse der Abbildungen 49 und 50 bestätigen einen apoptotischer Zelltod, gezeigt durch die Freisetzung von Cytochrom *c* aus den Mitochondrien in das Zytosol und die Spaltung und somit Aktivierung der Effektorcaspase-3 sowie von PARP in den sh-mNOA1-transfizierten Zellen. Es ist bekannt, dass die Abnahme des Membranpotentials und die damit verbundene Öffnung der PTP zu einer Freisetzung von Cytochrom *c* und infolge dessen zu einer Aktivierung des kanonischen mitochondrialen Apoptoseweges führen kann. Obwohl die Herabregulation von sh-mNOA1 diesen apoptotischen Phänotyp zeigte, konnte der Zelltod durch den PTP-Inhibitor Cyclosporin A nicht verhindert werden, was auf eine PTP-unabhängige Freisetzung von Cytochrom *c* schließen lässt, die schon mehrfach in der Literatur beschrieben wurde (Chen et al., 2000; Eskes et al., 1998; Mather and Rottenberg, 2001). Ein anderer möglicher Mechanismus beruht darauf, dass mitochondrial lokalisierter oxidativer Stress in Abhängigkeit des Trx2-Redoxzustandes Apoptose induzieren kann. Reduziertes Trx-2 ist an die mitochondrial-lokalisierte ASK-1 gebunden und verhindert somit eine Aktivierung dieser. Oxidiertes Trx-2 verliert seine Bindungseigenschaften an ASK-1, wodurch diese aktiviert wird. Eine aktivierte ASK-1 vermittelt die Induktion der Apoptose durch Phosphorylierung von JNK/SAP bzw. p38 (Masutani et al., 2005) und der

daraus resultierenden Aktivierung dieser. Obwohl der größte Anteil von Thioredoxin-2 in seiner oxidierten Form vorlag, konnte eine Aktivierung von p38 und JNK/SAP in sh-mNOA1-transfizierten Zellen nicht detektiert werden (Abbildung 48) und schließt somit als Signalweg, der zum Tod der Zellen führt, aus. Obwohl der genaue Mechanismus der Apoptose-Induktion weiterhin ungeklärt ist, sind die in dieser Arbeit gezeigten Daten hinsichtlich eines sh-mNOA1-abhängigen apoptotischen Zelltods in sich schlüssig, stehen aber dennoch im Gegensatz zu publizierten Arbeiten, in denen gezeigt wurde, dass die Überexpression von mNOA1 zu einer Apoptose-Induktion in MCF-7 (Parihar et al., 2008a) und Neuroblastoma-Zellen SHSY (Parihar et al., 2008b) und die Herabregulation von mNOA1 zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Apoptose (Tang et al., 2009) führte. Es ist nicht auszuschließen, dass diese Diskrepanzen auf die unterschiedlichen Zellarten zurückzuführen sind, die für die Experimente genutzt wurden.

4.3.4 Die Expression von mNOA1 ist sauerstoffabhängig

Besonderes Interesse bestand darin, das Verhalten von mNOA1 unter geringen Sauerstoffkonzentrationen zu untersuchen und damit die Bedeutung von mNOA1 als wichtiger Regulator der mitochondrialen Respiration zu unterstreichen. Die Inkubation von C2C12-Zellen unter hypoxischen Bedingungen mit 0, 5 % Sauerstoff induzierte eine Herabregulation der mNOA1- mRNA bereits nach 6 Stunden. Normalisiert werden konnte diese Herabregulation der mNOA1- mRNA durch eine zweistündige Reoxygenierung (Abbildung 52). Ein sehr ähnliches Expressionsmuster zeigte sich auch auf Proteinebene. Einhergehend mit der sh-RNA-vermittelten Herabregulation von mNOA1, führte auch die durch Hypoxie induzierte, endogene Reduktion der mNOA1-Expression zu einem reduzierten Elektronentransport zwischen Komplex I und Komplex III und somit zu einer weniger effizienten Atmung. Auch diese Reduktion der Atmungsaktivität konnte durch eine Reoxygenierung von 2 Stunden normalisiert werden. Ob diese Reduktion der Atmungsaktivität direkt von der herabregulierten mNOA1-Expression abhängt, ist zweifelhaft, da eine Überexpression von mNOA1 unter hypoxischen Bedingungen keinen Einfluss auf diese nehmen konnte. Vielmehr sind andere Mechanismen beschrieben, die unter Hypoxie zu einer Inhibition/ Reduktion der mitochondrialen Atmung führen, wie zum Beispiel die Induktion der Pyruvatdehydrogenasekinase- und Laktat-Dehydrogenase A-Expression. Das bewirkt eine Abnahme des Pyruvatflusses in den Zitronensäurezyklus, wodurch dieser inhibiert wird, dadurch weniger bzw. keine Reduktionsäquivalente für die

mitochondriale Atmungsaktivität zur Verfügung stehen und somit der Sauerstoffverbrauch minimiert wird (Papandreou et al., 2006). Ein anderer Mechanismus bezieht sich auf das Wirken von Stickstoff. Unter physiologischen Konzentrationen kompetiert dieses mit molekularem Sauerstoff um die Bindung an die Cytochrom *c*-Oxidase (Brown, 2001). Daher können steigende NO-Konzentrationen bzw. sinkende Sauerstoffkonzentrationen zu einer reversiblen Bindung von NO an diese führen und somit vor einem weiteren Sauerstoffverbrauch schützen. Die Hemmung der mitochondrialen Respiration unter hypoxischen Bedingungen und der damit verbundenen Abnahme der ATP-Produktion würde zu einem schnellen Zelltod führen. Um dies zu verhindern, aktivieren die Zellen, wenn eine kritische Sauerstoffkonzentration unterschritten wird, den Transkriptionsfaktor Hif-1 α , welcher die Expression von Genen aktiviert um die Zelle an die veränderten Bedingungen anzupassen. Hif-1 α ist die Sauerstoff-abhängige Untereinheit des HIF-Tetramers, welches aus je einer Hif-1 α , Hif-2 α und Hif-3 α sowie einer Hif-1 β -Untereinheit besteht. Hypoxie stabilisiert Hif-1 α , welches unter Normoxie sehr instabil ist, durch die Inhibierung der von von Hippel-Lindau induzierten Ubiquitinierung von Hif-1 α und der daraus resultierenden Degradation im 26S-Proteasom (Huang and Bunn, 2003). Stabilisiertes Hif-1 α bindet an bestimmte Konsensus-Sequenzen, die HRE, und aktiviert dadurch die Expression von Hypoxie-induzierten Genen (Caro, 2001). Darüber hinaus kann die Aktivierung von Hif-1 α auch zu einer Herabregulation von Genen führen (Koshiji et al., 2004; To et al., 2006). Eine Hif-1 α -abhängige Herabregulation von mNOA1 würde gut in das Konzept einer Hypoxie-abhängigen Inhibierung der mitochondrialen Respiration passen und tatsächlich ergab eine Analyse der mNOA1-Promotersequenz *in silico* das Vorhandensein eines putativen HRE. Darüber hinaus ließen auch die geringen Halbwertszeiten von mNOA1-mRNA- und Protein, die in Abbildung 37 gezeigt sind, auf eine transkriptionelle Regulation schließen. Um eine Hif-1 α -Abhängigkeit der mNOA1-Herabregulation zu zeigen, wurde Hif-1 α unter normoxischen Bedingungen mit CoCl₂ stabilisiert und die Expression von mNOA1-mRNA analysiert. Es konnte in Abbildung 53 gezeigt werden, dass diese Behandlung von C2C12-Zellen bereits nach 6 Stunden zu einer signifikanten Abnahme der mNOA1-mRNA führte. Darüber hinaus konnte in einem EMSA-Assay ein Bandshift nach einer Inkubation eines Oligonukleotids mit der putativen HRE-Sequenz des mNOA1-Promoters mit einem hypoxischen Kernextrakt erreicht werden. Wie in Abbildung 54 zu sehen ist, wurde die Spezifität des Bandshifts durch Kompetitionsansätze gezeigt. Leider war es in diesem Experiment technisch nicht möglich einen Supershift mit einem spezifischen Hif-1 α -Antikörper zu erreichen, womit man eine

direkt Bindung von Hif-1 α hätte zeigen können. Obwohl beide Experimente auf eine Hif-1 α -Abhängigkeit schließen lassen, ist kein Mechanismus bekannt, wie eine transkriptionelle Repression durch Hif-1 α abläuft, da in der Literatur fast ausschließlich Hif-1 α -abhängige Genexpressionaktivierungen beschrieben sind. Möglicherweise handelt es sich bei der hier gezeigten Hypoxie-abhängigen Herabregulation von mNOA1 um einen Hif-1 α -vermittelten Effekt, der über andere inhibitorische Transkriptionsfaktoren läuft, die Hif-1 α -abhängig aktiviert werden. Für einen solchen Mechanismus sind einige Beispiele aus der Literatur bekannt (Gui et al., 2008; Heinis et al., 2010).

Aus diesen Daten wird geschlossen, dass mNOA1 eine bedeutende Rolle in den Mitochondrien einnimmt, um die ATP-Produktion dem Bedarf der Zelle anzupassen. Dabei lassen sowohl die kurze Halbwertszeit als auch die Hypoxie-abhängige Repression der mNOA1-Expression auf ein Protein mit einer regulatorischen, möglicherweise auch sensorischen Funktion schließen. mNOA1 bindet direkt an die Atmungskettenkomplexe und unterstützt in einem GTPase-abhängigen Prozess die Assemblierung zu Superkomplexen, die einen effizienteren Elektronentransport durch die Atmungskette ermöglichen (Abbildung 55). Eine sh-RNA induzierte Herabregulation resultiert in einem apoptotischen Phänotyp hervorgerufen durch eine dysfunktionale Atmungskette.

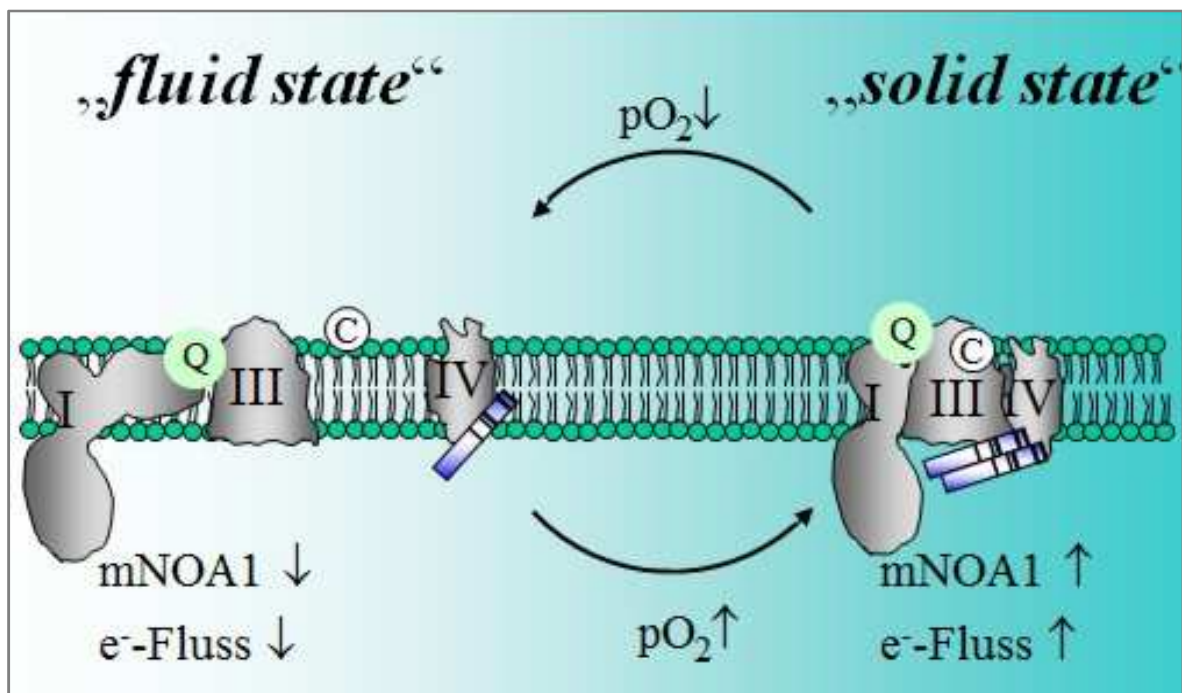


Abbildung 55 zeigt die Rolle von mNOA1 als Regulator der mitochondrialen Atmungsadaptation in Abhängigkeit von der Sauerstoffverfügbarkeit.

Dysfunktionale Mitochondrien stehen im Zusammenhang mit der Entwicklung von Kardiomyopathien (Lesnefsky et al., 2001), die alle durch den Verlust der kontraktilen Funktion charakterisiert sind und meistens auf überlappenden mitochondrialen Veränderungen, wie z.B. der Abnahme des Kreatin-Gehaltes, einer verminderten ATP-Produktion sowie erhöhtem oxidativen Stress durch eine dysfunktionale Atmungskette, beruhen (Melanie et al., 2008). Leider zeigte der mNOA1-Antikörper ausschließlich eine murine Spezifität. Es wäre sehr interessant gewesen, die Expression von mNOA1 in den mitochondrialen Subpopulationen des Schweine- und Hamstermodells sowie in den Patientenproben zu analysieren. Nachdem in dieser Arbeit die Sauerstoffverfügbarkeit als wichtiger Modulator der kardialen mitochondrialen Subpopulationen gezeigt wurde, die Expression von mNOA1 Sauerstoff-abhängig reguliert ist und über diese die Superkomplexassemblierung beeinflusst, lässt das den spekulativen Schluss zu, dass mNOA1 ein potentieller Mediator bei dem Prozess der funktionellen Kompartimentierung der kardialen Energiebereitstellung ist. Alle hier beschriebenen Eigenschaften von mNOA1 passen gut zu dieser möglichen Mediator-Rolle für die reversible Herabregulation der kardialen IFM bei reduziertem Sauerstoffangebot. Der Beweis für diese Mediator-Rolle erfordert nicht nur den Nachweis der Verminderung von mNOA1 in herab regulierten IFM, sondern auch die Identifizierung eines Mechanismus für präferentiellen mNOA1-Import in gut oxygenierte Herzmitochondrien. Beides steht noch aus.

Eine kürzlich erschienene Publikation zeigt eine fehlende Superkomplexassemblierung in insuffizienten Herzen und identifizierte somit einen neuen Mechanismus, der mit einer verminderten mitochondrialen Funktionalität nach einem Herzversagen verbunden ist (Rosca et al., 2008). Die Ergebnisse dieser Publikation zusammen mit den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen zur Funktion von mNOA1 lassen erstmals auf eine Rolle dieses Proteins in der Entstehung von Kardiomyopathien / Herzinsuffizienz schließen, die noch aufgeklärt werden sollten und möglicherweise neue therapeutische Ansatzpunkte in der Prävention und Behandlung dieser Krankheit liefern.

5 Zusammenfassung

Eine unentbehrliche Grundvoraussetzung für die Existenz höherer Lebewesen ist die ständige und exakte Anpassung der mitochondrialen Energiebereitstellung an die kardiale Herzarbeit. Die Regulation dieser Anpassung ist in einigen Computer- und experimentellen Modellen beschrieben ohne dabei aber auf die Zellgröße und der damit verbundenen Komplexität der subzellulären Strukturen in der Kardiomyozyte einzugehen. In dieser Arbeit wurde die Frage nach einer funktionellen Kompartimentierung der kardialen Energiebereitstellung in 2 unterschiedlichen Modellen analysiert. In dem ersten HBO-Schweinmodell ergaben Untersuchungen respiratorisch inaktive interfibrilläre Mitochondrien im Normzustand. Diese konnten durch eine hyperbare Oxygenierung in respiratorisch aktive Mitochondrien überführt werden. Diese Inaktivität der IFM wurde auf eine chronische, nicht-artgerechte Haltung und damit körperlicher Inaktivität zurückgeführt. Das führte zu der Annahme, dass Kern-nahe Prozesse der Energiebereitstellung und des Energieverbrauchs unter Bedingungen geringer mechanischer Herzarbeit reversibel abgeschaltet werden können. Diese Hypothese konnte im Winterschlaf-Modell bestätigt werden, da die IFM mit zunehmender körperlicher Immobilisierung respiratorisch inaktiviert wurden. Somit konnte in dieser Arbeit erstmals in zwei unterschiedlichen Modellen gezeigt werden, dass eine Kardiomyozyte in Abhängigkeit von der Sauerstoffverfügbarkeit als auch von ihrem energetischen Bedarf die mitochondrialen Subpopulationen differentiell und reversibel regulieren kann. Dabei wurden die IFM als die regulatorische Einheit identifiziert. Die Frage nach einem potentiellen Modulator der kardialen Energiebereitstellung lenkte den Fokus auf mNOA1, ein ursprünglich als NO-produzierend beschriebenes mitochondriales Enzym. Obwohl mNOA1 tatsächlich kein NO-bildendes Enzym ist, konnte erstmals gezeigt werden, dass mNOA1 direkt an die Atmungskettenkomplexe bindet und durch Dimerisierung in einem GTPase-abhängigen Prozess die Assemblierung der mitochondrialen Komplexe in Superkomplexe unterstützt und somit einen effizienteren Elektronentransport ermöglicht. Damit einhergehend verursacht eine sh-RNA vermittelte Herabregulation von mNOA1 eine dysfunktionale Atmungskette, durch welche ein apoptotischer Zelltod induziert wird. Die berechnete kurze Halbwertszeit und die Hypoxie-abhängige Repression der mNOA1-Expression sprechen dafür, dass mNOA1 eine bedeutende Rolle als Modulator der mitochondrialen Energiebereitstellung in Abhängigkeit von der Sauerstoffverfügbarkeit einnehmen kann.

Summary

A permanent and accurate adaptation of mitochondrial energy supply to mechanic heart work is an essential prerequisite for life. The regulation of these adaptations is described in several computer and experimental models without addressing the size of cardiomyocytes, which determines the complexity of subcellular structures. In this thesis, the presence of a functional compartmentalization for cardiac energy supply was examined in 2 different models. Analysis of mitochondrial subpopulations in the HBO-pig model revealed respiratory inactive interfibrillar mitochondria (IFM) under normal conditions, which were respiratory reactivated upon hyperbaric oxygenation. The inactivity of IFM presumably arose from non-adequate animal housing causing a physical immobilization of the pigs. Hence, we hypothesized, that nucleus-proximal processes for energy supply and energy consumption can be switched off reversibly under conditions with low mechanic heart work. This hypothesis was proven in the hibernation model. Here, cardiac IFM of animals with decreasing physical activity were respiratory inactivated. Consequently, this study shows for the first time, that a cardiomyocyte, depending on the oxygen availability and/or its energy demand is able to regulate mitochondrial subpopulations in a differential and reversible manner. The IFM were identified as the regulatory unit. The existence of a potential modulator of cardiac energy supply directed the attention to mNOA1, a protein originally described as a mitochondrial NO-producing enzyme. Even though mNOA1 is not a NO-producing enzyme, it was demonstrated that mNOA1 directly binds to respiratory complexes and supports the assembly of supercomplexes in a GTPase-dependent fashion. In line with this function a shRNA mediated knockdown of mNOA1 led to a dysfunctional respiratory chain, which induces apoptotic cell death. The short half-life calculated for mNOA1 as well as its hypoxia-dependent repression of expression show, that this protein can function as an important modulator of mitochondrial energy demand in dependence of oxygen availability.

6 Literatur

- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D.G., Heuser, J.E., Wang, X. and Akey, C.W. (2002) Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell*, **9**, 423-432.
- Acin-Perez, R., Fernandez-Silva, P., Peleato, M.L., Perez-Martos, A. and Enriquez, J.A. (2008) Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell*, **32**, 529-539.
- Aggeler, R., Coons, J., Taylor, S.W., Ghosh, S.S., Garcia, J.J., Capaldi, R.A. and Marusich, M.F. (2002) A functionally active human F1F0 ATPase can be purified by immunocapture from heart tissue and fibroblast cell lines. Subunit structure and activity studies. *J Biol Chem*, **277**, 33906-33912.
- Alberts B, J.A., Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2002) *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, New York.
- Arnoult, D., Grodet, A., Lee, Y.J., Estaquier, J. and Blackstone, C. (2005) Release of OPA1 during apoptosis participates in the rapid and complete release of cytochrome c and subsequent mitochondrial fragmentation. *J Biol Chem*, **280**, 35742-35750.
- Attardi, G. (1985) Animal mitochondrial DNA: an extreme example of genetic economy. *Int Rev Cytol*, **93**, 93-145.
- Attardi, G. and Schatz, G. (1988) Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol*, **4**, 289-333.
- Bakeeva, L.E., Chentsov Yu, S. and Skulachev, V.P. (1978) Mitochondrial framework (reticulum mitochondriale) in rat diaphragm muscle. *Biochim Biophys Acta*, **501**, 349-369.
- Balaban, R.S., Kantor, H.L., Katz, L.A. and Briggs, R.W. (1986) Relation between work and phosphate metabolite in the in vivo paced mammalian heart. *Science*, **232**, 1121-1123.
- Belogradov, G.I. (1996) Mitochondrial ATP synthase: Fe²⁺-catalyzed fragmentation of the soluble F1-ATPase. *Arch Biochem Biophys*, **335**, 131-138.
- Benard, G., Bellance, N., James, D., Parrone, P., Fernandez, H., Letellier, T. and Rossignol, R. (2007) Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J Cell Sci*, **120**, 838-848.
- Bernardi, P. (1992) Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. Evidence that the pore can be opened by membrane depolarization. *J Biol Chem*, **267**, 8834-8839.
- Bernardi, P. (1996) The permeability transition pore. Control points of a cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death. *Biochim Biophys Acta*, **1275**, 5-9.
- Bernardi, P. (1999) Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev*, **79**, 1127-1155.
- Bernardi, P., Vassanelli, S., Veronese, P., Colonna, R., Szabo, I. and Zoratti, M. (1992) Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. *J Biol Chem*, **267**, 2934-2939.
- Bessman, S.P. and Geiger, P.J. (1981) Transport of energy in muscle: the phosphorylcreatine shuttle. *Science*, **211**, 448-452.
- Bianchi, C., Genova, M.L., Parenti Castelli, G. and Lenaz, G. (2004) The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: kinetic evidence using flux control analysis. *J Biol Chem*, **279**, 36562-36569.
- Bonawitz, N.D., Clayton, D.A. and Shadel, G.S. (2006) Initiation and beyond: multiple functions of the human mitochondrial transcription machinery. *Mol Cell*, **24**, 813-825.
- Bornberg-Bauer, E., Rivals, E. and Vingron, M. (1998) Computational approaches to identify leucine zippers. *Nucleic Acids Res*, **26**, 2740-2746.

- Bourges, I., Ramus, C., Mousson de Camaret, B., Beugnot, R., Remacle, C., Cardol, P., Hofhaus, G. and Issartel, J.P. (2004) Structural organization of mitochondrial human complex I: role of the ND4 and ND5 mitochondria-encoded subunits and interaction with prohibitin. *Biochem J*, **383**, 491-499.
- Brookes, P.S. (2004) Mitochondrial nitric oxide synthase. *Mitochondrion*, **3**, 187-204.
- Brown, G.C. (2001) Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta*, **1504**, 46-57.
- Brown, G.C. (2007) Nitric oxide and mitochondria. *Front Biosci*, **12**, 1024-1033.
- Capaldi, R.A., Malatesta, F. and Darley-Usmar, V.M. (1983) Structure of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta*, **726**, 135-148.
- Caro, J. (2001) Hypoxia regulation of gene transcription. *High Alt Med Biol*, **2**, 145-154.
- Cartharius, K., Frech, K., Grote, K., Klocke, B., Haltmeier, M., Klingenhoff, A., Frisch, M., Bayerlein, M. and Werner, T. (2005) MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics*, **21**, 2933-2942.
- Chan, D.C. (2006) Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **22**, 79-99.
- Chavez, A., Miranda, L.F., Pichiule, P. and Chavez, J.C. (2008) Mitochondria and hypoxia-induced gene expression mediated by hypoxia-inducible factors. *Ann N Y Acad Sci*, **1147**, 312-320.
- Chen, C., Ko, Y., Delannoy, M., Ludtke, S.J., Chiu, W. and Pedersen, P.L. (2004) Mitochondrial ATP synthasome: three-dimensional structure by electron microscopy of the ATP synthase in complex formation with carriers for Pi and ADP/ATP. *J Biol Chem*, **279**, 31761-31768.
- Chen, L., Gong, Q., Stice, J.P. and Knowlton, A.A. (2009) Mitochondrial OPA1, apoptosis, and heart failure. *Cardiovasc Res*, **84**, 91-99.
- Chen, Q., Gong, B. and Almasan, A. (2000) Distinct stages of cytochrome c release from mitochondria: evidence for a feedback amplification loop linking caspase activation to mitochondrial dysfunction in genotoxic stress induced apoptosis. *Cell Death Differ*, **7**, 227-233.
- Chen, X.J., Wang, X., Kaufman, B.A. and Butow, R.A. (2005) Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance. *Science*, **307**, 714-717.
- Chipuk, J.E. and Green, D.R. (2008) How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol*, **18**, 157-164.
- Cipolat, S., Rudka, T., Hartmann, D., Costa, V., Serneels, L., Craessaerts, K., Metzger, K., Frezza, C., Annaert, W., D'Adamio, L., Derks, C., Dejaegere, T., Pellegrini, L., D'Hooge, R., Scorrano, L. and De Strooper, B. (2006) Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell*, **126**, 163-175.
- Claros, M.G. and Vincens, P. (1996) Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem*, **241**, 779-786.
- Cortassa, S., Aon, M.A., Marban, E., Winslow, R.L. and O'Rourke, B. (2003) An integrated model of cardiac mitochondrial energy metabolism and calcium dynamics. *Biophys J*, **84**, 2734-2755.
- Cortassa, S., Aon, M.A., O'Rourke, B., Jacques, R., Tseng, H.J., Marban, E. and Winslow, R.L. (2006) A computational model integrating electrophysiology, contraction, and mitochondrial bioenergetics in the ventricular myocyte. *Biophys J*, **91**, 1564-1589.
- Danial, N.N. and Korsmeyer, S.J. (2004) Cell death: critical control points. *Cell*, **116**, 205-219.
- Delettre, C., Lenaers, G., Griffoin, J.M., Gigarel, N., Lorenzo, C., Belenguer, P., Pelloquin, L., Grosgeorge, J., Turc-Carel, C., Perret, E., Astarie-Dequeker, C., Lasquelléc, L., Arnaud, B., Ducommun, B., Kaplan, J. and Hamel, C.P. (2000) Nuclear gene OPA1,

- encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet*, **26**, 207-210.
- Denton, R.M. and McCormack, J.G. (1985) Ca²⁺ transport by mammalian mitochondria and its role in hormone action. *Am J Physiol*, **249**, E543-554.
- Di Lisa, F., Blank, P.S., Colonna, R., Gambassi, G., Silverman, H.S., Stern, M.D. and Hansford, R.G. (1995) Mitochondrial membrane potential in single living adult rat cardiac myocytes exposed to anoxia or metabolic inhibition. *J Physiol*, **486** (Pt 1), 1-13.
- Doenst, T., Guthrie, P.H., Chemnitz, J.M., Zech, R. and Taegtmeyer, H. (1996) Fasting, lactate, and insulin improve ischemia tolerance in rat heart: a comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol*, **270**, H1607-1615.
- Eads, B.D. and Hand, S.C. (1999) Regulatory features of transcription in isolated mitochondria from *Artemia franciscana* embryos. *Am J Physiol*, **277**, R1588-1597.
- Eguchi, Y., Shimizu, S. and Tsujimoto, Y. (1997) Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res*, **57**, 1835-1840.
- Elsasser, A., Suzuki, K. and Schaper, J. (2000) Unresolved issues regarding the role of apoptosis in the pathogenesis of ischemic injury and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*, **32**, 711-724.
- Erecinska, M. and Wilson, D.F. (1982) Regulation of cellular energy metabolism. *J Membr Biol*, **70**, 1-14.
- Eskes, R., Antonsson, B., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Richter, C., Sadoul, R., Mazzei, G., Nichols, A. and Martinou, J.C. (1998) Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg²⁺ ions. *J Cell Biol*, **143**, 217-224.
- Fernandez-Silva, P., Enriquez, J.A. and Montoya, J. (2003) Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp Physiol*, **88**, 41-56.
- Frey, T.G. and Mannella, C.A. (2000) The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci*, **25**, 319-324.
- Frezza, C., Cipolat, S., Martins de Brito, O., Micaroni, M., Beznoussenko, G.V., Rudka, T., Bartoli, D., Polishuck, R.S., Danial, N.N., De Strooper, B. and Scorrano, L. (2006) OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell*, **126**, 177-189.
- Frezza, C., Cipolat, S. and Scorrano, L. (2007) Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nat Protoc*, **2**, 287-295.
- Fried, M. and Crothers, D.M. (1981) Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res*, **9**, 6505-6525.
- Gardner, P.R. (1997) Superoxide-driven aconitase FE-S center cycling. *Biosci Rep*, **17**, 33-42.
- Gardner, P.R., Nguyen, D.D. and White, C.W. (1994) Aconitase is a sensitive and critical target of oxygen poisoning in cultured mammalian cells and in rat lungs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 12248-12252.
- Gellerich, F.N., Laterveer, F.D., Zierz, S. and Nicolay, K. (2002) The quantitation of ADP diffusion gradients across the outer membrane of heart mitochondria in the presence of macromolecules. *Biochim Biophys Acta*, **1554**, 48-56.
- Goh, K.C., deVeer, M.J. and Williams, B.R. (2000) The protein kinase PKR is required for p38 MAPK activation and the innate immune response to bacterial endotoxin. *Embo J*, **19**, 4292-4297.
- Green, D.R. (2005) Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell*, **121**, 671-674.
- Green, D.R. and Reed, J.C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science*, **281**, 1309-1312.
- Gui, C., Wang, J.A., He, A.N., Chen, T.L., Liu, X.B., Luo, R.H. and Jiang, J. (2008) Expression of heregulin and ErbB receptors in mesenchymal stem cells. *Chin Med J (Engl)*, **121**, 155-160.

- Guo, F.Q. and Crawford, N.M. (2005) Arabidopsis nitric oxide synthase1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence. *Plant Cell*, **17**, 3436-3450.
- Guo, F.Q., Okamoto, M. and Crawford, N.M. (2003) Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science*, **302**, 100-103.
- Hackenbrock, C.R., Chazotte, B. and Gupte, S.S. (1986) The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J Bioenerg Biomembr*, **18**, 331-368.
- Hagerhall, C. (1997) Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme. *Biochim Biophys Acta*, **1320**, 107-141.
- Halestrap, A.P., Woodfield, K.Y. and Connern, C.P. (1997) Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. *J Biol Chem*, **272**, 3346-3354.
- Harris, D.A. and Das, A.M. (1991) Control of mitochondrial ATP synthesis in the heart. *Biochem J*, **280 (Pt 3)**, 561-573.
- Hatefi, Y. and Stempel, K.E. (1967) Resolution of complex I (DPNH-coenzyme Q reductase) of the mitochondrial electron transfer system. *Biochem Biophys Res Commun*, **26**, 301-308.
- Heinis, M., Simon, M.T., Ilc, K., Mazure, N.M., Pouyssegur, J., Scharfmann, R. and Duvillie, B. Oxygen tension regulates pancreatic beta-cell differentiation through hypoxia-inducible factor 1alpha. *Diabetes*, **59**, 662-669.
- Henze, K. and Martin, W. (2003) Evolutionary biology: essence of mitochondria. *Nature*, **426**, 127-128.
- Herrmann, J.M. and Neupert, W. (2000) Protein transport into mitochondria. *Curr Opin Microbiol*, **3**, 210-214.
- Hirst, J., Carroll, J., Fearnley, I.M., Shannon, R.J. and Walker, J.E. (2003) The nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, **1604**, 135-150.
- Ho, V.T. and Bunn, H.F. (1996) Effects of transition metals on the expression of the erythropoietin gene: further evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Biochem Biophys Res Commun*, **223**, 175-180.
- Holian, A., Owen, C.S. and Wilson, D.F. (1977) Control of respiration in isolated mitochondria: quantitative evaluation of the dependence of respiratory rates on [ATP], [ADP], and [Pi]. *Arch Biochem Biophys*, **181**, 164-171.
- Hom, J. and Sheu, S.S. (2009) Morphological dynamics of mitochondria--a special emphasis on cardiac muscle cells. *J Mol Cell Cardiol*, **46**, 811-820.
- Hoppel, C.L., Tandler, B., Parland, W., Turkaly, J.S. and Albers, L.D. (1982) Hamster cardiomyopathy. A defect in oxidative phosphorylation in the cardiac interfibrillar mitochondria. *J Biol Chem*, **257**, 1540-1548.
- Horton, P., Park, K.J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C.J. and Nakai, K. (2007) WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res*, **35**, W585-587.
- Huang, L.E. and Bunn, H.F. (2003) Hypoxia-inducible factor and its biomedical relevance. *J Biol Chem*, **278**, 19575-19578.
- Javadov, S. and Karmazyn, M. (2007) Mitochondrial permeability transition pore opening as an endpoint to initiate cell death and as a putative target for cardioprotection. *Cell Physiol Biochem*, **20**, 1-22.
- Judge, S., Jang, Y.M., Smith, A., Hagen, T. and Leeuwenburgh, C. (2005) Age-associated increases in oxidative stress and antioxidant enzyme activities in cardiac interfibrillar

- mitochondria: implications for the mitochondrial theory of aging. *Faseb J*, **19**, 419-421.
- Kasashima, K., Ohta, E., Kagawa, Y. and Endo, H. (2006) Mitochondrial functions and estrogen receptor-dependent nuclear translocation of pleiotropic human prohibitin 2. *J Biol Chem*, **281**, 36401-36410.
- Kelly, D.P. and Scarpulla, R.C. (2004) Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev*, **18**, 357-368.
- Khalimonchuk, O. and Rodel, G. (2005) Biogenesis of cytochrome c oxidase. *Mitochondrion*, **5**, 363-388.
- Kim, S.B. and Berdanier, C.D. (1999) Oligomycin sensitivity of mitochondrial F(1)F(0)-ATPase in diabetes-prone BHE/Cdb rats. *Am J Physiol*, **277**, E702-707.
- Klingenberg, M. (2008) The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. *Biochim Biophys Acta*, **1778**, 1978-2021.
- Ko, Y.H., Delannoy, M., Hullihen, J., Chiu, W. and Pedersen, P.L. (2003) Mitochondrial ATP synthasome. Cristae-enriched membranes and a multiwell detergent screening assay yield dispersed single complexes containing the ATP synthase and carriers for Pi and ADP/ATP. *J Biol Chem*, **278**, 12305-12309.
- Kobayashi, K. and Neely, J.R. (1979) Control of maximum rates of glycolysis in rat cardiac muscle. *Circ Res*, **44**, 166-175.
- Korzeniewski, B. (2007) Regulation of oxidative phosphorylation through parallel activation. *Biophys Chem*, **129**, 93-110.
- Korzeniewski, B., Noma, A. and Matsuoka, S. (2005) Regulation of oxidative phosphorylation in intact mammalian heart in vivo. *Biophys Chem*, **116**, 145-157.
- Koshiji, M., Kageyama, Y., Pete, E.A., Horikawa, I., Barrett, J.C. and Huang, L.E. (2004) HIF-1alpha induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *Embo J*, **23**, 1949-1956.
- Krause, F., Reifschneider, N.H., Goto, S. and Dencher, N.A. (2005) Active oligomeric ATP synthases in mammalian mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*, **329**, 583-590.
- Kussmaul, L. and Hirst, J. (2006) The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 7607-7612.
- Kwast, K.E. and Hand, S.C. (1996) Oxygen and pH regulation of protein synthesis in mitochondria from *Artemia franciscana* embryos. *Biochem J*, **313** (Pt 1), 207-213.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Leipe, D.D., Wolf, Y.I., Koonin, E.V. and Aravind, L. (2002) Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J Mol Biol*, **317**, 41-72.
- Lenaz, G., Fato, R., Genova, M.L., Formiggini, G., Parenti Castelli, G. and Bovina, C. (1995) Underevaluation of complex I activity by the direct assay of NADH-coenzyme Q reductase in rat liver mitochondria. *FEBS Lett*, **366**, 119-121.
- Lesnefsky, E.J., Moghaddas, S., Tandler, B., Kerner, J. and Hoppel, C.L. (2001) Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia-reperfusion, aging, and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*, **33**, 1065-1089.
- Llopis, J., McCaffery, J.M., Miyawaki, A., Farquhar, M.G. and Tsien, R.Y. (1998) Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 6803-6808.
- Lloreta-Trull, J. and Serrano, S. (1998) Biology and pathology of the mitochondrion. *Ultrastruct Pathol*, **22**, 357-367.
- Loffler, M., Jockel, J., Schuster, G. and Becker, C. (1997) Dihydroorotat-ubiquinone oxidoreductase links mitochondria in the biosynthesis of pyrimidine nucleotides. *Mol Cell Biochem*, **174**, 125-129.

- Lu, C., Wang, A., Wang, L., Dorsch, M., Ocain, T.D. and Xu, Y. (2005) Nucleotide binding to CARD12 and its role in CARD12-mediated caspase-1 activation. *Biochem Biophys Res Commun*, **331**, 1114-1119.
- Martin, S.L., Maniero, G.D., Carey, C. and Hand, S.C. (1999) Reversible depression of oxygen consumption in isolated liver mitochondria during hibernation. *Physiol Biochem Zool*, **72**, 255-264.
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jurgensmeier, J.M., Susin, S.A., Vieira, H.L., Prevost, M.C., Xie, Z., Matsuyama, S., Reed, J.C. and Kroemer, G. (1998) Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science*, **281**, 2027-2031.
- Masutani, H., Ueda, S. and Yodoi, J. (2005) The thioredoxin system in retroviral infection and apoptosis. *Cell Death Differ*, **12 Suppl 1**, 991-998.
- Mather, M. and Rottenberg, H. (2001) Polycations induce the release of soluble intermembrane mitochondrial proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1503**, 357-368.
- McBride, H.M., Neuspiel, M. and Wasiaik, S. (2006) Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr Biol*, **16**, R551-560.
- McCormack, J.G. and Denton, R.M. (1989) Influence of calcium ions on mammalian intramitochondrial dehydrogenases. *Methods Enzymol*, **174**, 95-118.
- McMillin-Wood, J., Wolkowicz, P.E., Chu, A., Tate, C.A., Goldstein, M.A. and Entman, M.L. (1980) Calcium uptake by two preparations of mitochondria from heart. *Biochim Biophys Acta*, **591**, 251-265.
- Melanie, Y.W., Alistair, V.G.E., Stuart, J.C. and Jennifer, E.V.E. (2008) Mitochondria: A mirror into cellular dysfunction in heart disease. *PROTEOMICS - CLINICAL APPLICATIONS*, **2**, 845-861.
- Misaka, T., Murate, M., Fujimoto, K. and Kubo, Y. (2006) The dynamin-related mouse mitochondrial GTPase OPA1 alters the structure of the mitochondrial inner membrane when exogenously introduced into COS-7 cells. *Neurosci Res*, **55**, 123-133.
- Mitchell, P. (1976) Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems. *J Theor Biol*, **62**, 327-367.
- Moghaddas, S., Hoppel, C.L. and Lesnefsky, E.J. (2003) Aging defect at the QO site of complex III augments oxyradical production in rat heart interfibrillar mitochondria. *Arch Biochem Biophys*, **414**, 59-66.
- Moreau, M., Lee, G.I., Wang, Y., Crane, B.R. and Klessig, D.F. (2008) AtNOS/AtNOA1 is a functional Arabidopsis thaliana cGTPase and not a nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*, **283**, 32957-32967.
- Nijtmans, L.G., de Jong, L., Artal Sanz, M., Coates, P.J., Berden, J.A., Back, J.W., Muijsers, A.O., van der Spek, H. and Grivell, L.A. (2000) Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins. *Embo J*, **19**, 2444-2451.
- Nisoli, E., Clementi, E., Paolucci, C., Cozzi, V., Tonello, C., Sciorati, C., Bracale, R., Valerio, A., Francolini, M., Moncada, S. and Carruba, M.O. (2003) Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science*, **299**, 896-899.
- Noack, H., Bednarek, T., Heidler, J., Ladig, R., Holtz, J. and Szibor, M. (2006) TFAM-dependent and independent dynamics of mtDNA levels in C2C12 myoblasts caused by redox stress. *Biochim Biophys Acta*, **1760**, 141-150.
- Olichon, A., Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P. and Lenaers, G. (2003) Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem*, **278**, 7743-7746.
- Olichon, A., Elachouri, G., Baricault, L., Delettre, C., Belenguer, P. and Lenaers, G. (2007) OPA1 alternate splicing uncouples an evolutionary conserved function in mitochondrial fusion from a vertebrate restricted function in apoptosis. *Cell Death Differ*, **14**, 682-692.

- Oliver, F.J., de la Rubia, G., Rolli, V., Ruiz-Ruiz, M.C., de Murcia, G. and Murcia, J.M. (1998) Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. *J Biol Chem*, **273**, 33533-33539.
- Olsen, E.G. (1976) Structural and ultrastructural basis of myocardial disease. *Proc R Soc Med*, **69**, 195-197.
- Ong, S.E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A. and Mann, M. (2002) Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics*, **1**, 376-386.
- Ong, S.E. and Mann, M. (2006) A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Nat Protoc*, **1**, 2650-2660.
- Orrenius, S., Gogvadze, V. and Zhivotovsky, B. (2007) Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **47**, 143-183.
- Palmer, J.W., Tandler, B. and Hoppel, C.L. (1977) Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle. *J Biol Chem*, **252**, 8731-8739.
- Palmer, J.W., Tandler, B. and Hoppel, C.L. (1985) Biochemical differences between subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria from rat cardiac muscle: effects of procedural manipulations. *Arch Biochem Biophys*, **236**, 691-702.
- Papandreou, I., Cairns, R.A., Fontana, L., Lim, A.L. and Denko, N.C. (2006) HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab*, **3**, 187-197.
- Parihar, A., Parihar, M.S., Chen, Z. and Ghafourifar, P. (2008a) mAtNOS1 induces apoptosis of human mammary adenocarcinoma cells. *Life Sci*, **82**, 1077-1082.
- Parihar, M.S., Parihar, A., Chen, Z., Nazarewicz, R. and Ghafourifar, P. (2008b) mAtNOS1 regulates mitochondrial functions and apoptosis of human neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta*, **1780**, 921-926.
- Pedersen, P.L. (1999) Mitochondrial events in the life and death of animal cells: a brief overview. *J Bioenerg Biomembr*, **31**, 291-304.
- Portman, M.A., Xiao, Y., Song, Y. and Ning, X.H. (1997) Expression of adenine nucleotide translocator parallels maturation of respiratory control in heart in vivo. *Am J Physiol*, **273**, H1977-1983.
- Puigserver, P. and Spiegelman, B.M. (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev*, **24**, 78-90.
- Rechsteiner, M. and Rogers, S.W. (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci*, **21**, 267-271.
- Rogers, S., Wells, R. and Rechsteiner, M. (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science*, **234**, 364-368.
- Rosca, M.G., Vazquez, E.J., Kerner, J., Parland, W., Chandler, M.P., Stanley, W., Sabbah, H.N. and Hoppel, C.L. (2008) Cardiac mitochondria in heart failure: decrease in respirasomes and oxidative phosphorylation. *Cardiovasc Res*, **80**, 30-39.
- Rost, B., Yachdav, G. and Liu, J. (2004) The PredictProtein server. *Nucleic Acids Res*, **32**, W321-326.
- Sano, S., Inoue, S., Tanabe, Y., Sumiya, C. and Koike, S. (1959) Significance of mitochondria for porphyrin and heme biosynthesis. *Science*, **129**, 275-276.
- Scarpulla, R.C. (2002) Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. *Gene*, **286**, 81-89.
- Scarpulla, R.C. (2008) Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev*, **88**, 611-638.
- Schagger, H. (2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc*, **1**, 16-22.

- Schagger, H. and Pfeiffer, K. (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *Embo J*, **19**, 1777-1783.
- Schagger, H. and von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem*, **199**, 223-231.
- Schaper, J., Meiser, E. and Stammers, G. (1985) Ultrastructural morphometric analysis of myocardium from dogs, rats, hamsters, mice, and from human hearts. *Circ Res*, **56**, 377-391.
- Schlattner, U., Tokarska-Schlattner, M. and Wallimann, T. (2006) Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Biochim Biophys Acta*, **1762**, 164-180.
- Schmidt R, T.G. (1997) *Physiologie des Menschen*. Springer Verlag.
- Sekhar, B.S., Kurup, C.K. and Ramasarma, T. (1987) Generation of hydrogen peroxide by brown adipose tissue mitochondria. *J Bioenerg Biomembr*, **19**, 397-407.
- Shadel, G.S. (2005) Mitochondrial DNA, aconitase 'wraps' it up. *Trends Biochem Sci*, **30**, 294-296.
- Shepherd, D. and Garland, P.B. (1969) The kinetic properties of citrate synthase from rat liver mitochondria. *Biochem J*, **114**, 597-610.
- Shimizu, S., Narita, M. and Tsujimoto, Y. (1999) Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*, **399**, 483-487.
- Shimomura, H., Terasaki, F., Hayashi, T., Kitaura, Y., Isomura, T. and Suma, H. (2001) Autophagic degeneration as a possible mechanism of myocardial cell death in dilated cardiomyopathy. *Jpn Circ J*, **65**, 965-968.
- Skulachev, V.P. (2001) Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends Biochem Sci*, **26**, 23-29.
- Smiley, S.T., Reers, M., Mottola-Hartshorn, C., Lin, M., Chen, A., Smith, T.W., Steele, G.D., Jr. and Chen, L.B. (1991) Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 3671-3675.
- Stanley, W.C., Recchia, F.A. and Lopaschuk, G.D. (2005) Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev*, **85**, 1093-1129.
- Stenger RJ, S.D. (1961) Structure of the cardiac muscle cell. *Am J Med*, **30**, 653-665.
- Stuehr, D.J. and Griffith, O.W. (1992) Mammalian nitric oxide synthases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, **65**, 287-346.
- Suh, J.H., Heath, S.H. and Hagen, T.M. (2003) Two subpopulations of mitochondria in the aging rat heart display heterogenous levels of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, **35**, 1064-1072.
- Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., Bartlam, M. and Rao, Z. (2005) Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell*, **121**, 1043-1057.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M. and Kroemer, G. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, **397**, 441-446.
- Taanman, J.W. (1997) Human cytochrome c oxidase: structure, function, and deficiency. *J Bioenerg Biomembr*, **29**, 151-163.
- Takahashi, E., Endoh, H. and Doi, K. (1999) Intracellular gradients of O₂ supply to mitochondria in actively respiring single cardiomyocyte of rats. *Am J Physiol*, **276**, H718-724.
- Tang, T., Zheng, B., Chen, S.H., Murphy, A.N., Kudlicka, K., Zhou, H. and Farquhar, M.G. (2009) hNOA1 Interacts with Complex I and DAP3 and Regulates Mitochondrial Respiration and Apoptosis. *J Biol Chem*, **284**, 5414-5424.

- To, K.K., Sedelnikova, O.A., Samons, M., Bonner, W.M. and Huang, L.E. (2006) The phosphorylation status of PAS-B distinguishes HIF-1alpha from HIF-2alpha in NBS1 repression. *Embo J*, **25**, 4784-4794.
- Toole, L., Belai, A., Shochina, M. and Burnstock, G. (1999) The effects of hibernation on the myenteric plexus of the golden hamster small and large intestine. *Cell Tissue Res*, **296**, 479-487.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. and Yoshikawa, S. (1996) The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science*, **272**, 1136-1144.
- Turrens, J.F. (1997) Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep*, **17**, 3-8.
- Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G., Alroy, J., Wu, M., Py, B.F., Yuan, J., Deeney, J.T., Corkey, B.E. and Shirihai, O.S. (2008) Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *Embo J*, **27**, 433-446.
- Ugalde, C., Vogel, R., Huijbens, R., Van Den Heuvel, B., Smeitink, J. and Nijtmans, L. (2004) Human mitochondrial complex I assembles through the combination of evolutionary conserved modules: a framework to interpret complex I deficiencies. *Hum Mol Genet*, **13**, 2461-2472.
- Unitt, J.F., McCormack, J.G., Reid, D., MacLachlan, L.K. and England, P.J. (1989) Direct evidence for a role of intramitochondrial Ca²⁺ in the regulation of oxidative phosphorylation in the stimulated rat heart. Studies using ³¹P n.m.r. and ruthenium red. *Biochem J*, **262**, 293-301.
- Van Coster, R., Smet, J., George, E., De Meirleir, L., Seneca, S., Van Hove, J., Sebire, G., Verhelst, H., De Bleecker, J., Van Vlem, B., Verloo, P. and Leroy, J. (2001) Blue native polyacrylamide gel electrophoresis: a powerful tool in diagnosis of oxidative phosphorylation defects. *Pediatr Res*, **50**, 658-665.
- van Loo, G., Schotte, P., van Gurp, M., Demol, H., Hoorelbeke, B., Gevaert, K., Rodriguez, I., Ruiz-Carrillo, A., Vandekerckhove, J., Declercq, W., Beyaert, R. and Vandenabeele, P. (2001) Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ*, **8**, 1136-1142.
- Vande Walle, L., Lamkanfi, M. and Vandenabeele, P. (2008) The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview. *Cell Death Differ*, **15**, 453-460.
- Ventura-Clapier, R., Garnier, A. and Veksler, V. (2008) Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovasc Res*, **79**, 208-217.
- Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J. and Vaux, D.L. (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, **102**, 43-53.
- Voet D, V.J. (1994) *Biochemie*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Weinstein, E.S., Benson, D.W. and Fry, D.E. (1986) Subpopulations of human heart mitochondria. *J Surg Res*, **40**, 495-498.
- Williams, R.S. (1986) Mitochondrial gene expression in mammalian striated muscle. Evidence that variation in gene dosage is the major regulatory event. *J Biol Chem*, **261**, 12390-12394.
- Wittig, I., Beckhaus, T., Wumaier, Z., Karas, M. and Schagger, H. Mass estimation of native proteins by blue native electrophoresis: principles and practical hints. *Mol Cell Proteomics*, **9**, 2149-2161.
- Wittig, I., Braun, H.P. and Schagger, H. (2006a) Blue native PAGE. *Nat Protoc*, **1**, 418-428.

- Wittig, I., Carrozzo, R., Santorelli, F.M. and Schagger, H. (2006b) Supercomplexes and subcomplexes of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*, **1757**, 1066-1072.
- Woodfield, K., Ruck, A., Brdiczka, D. and Halestrap, A.P. (1998) Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition. *Biochem J*, **336** (Pt 2), 287-290.
- Xia, D., Yu, C.A., Kim, H., Xia, J.Z., Kachurin, A.M., Zhang, L., Yu, L. and Deisenhofer, J. (1997) Crystal structure of the cytochrome bc1 complex from bovine heart mitochondria. *Science*, **277**, 60-66.
- Yaffe, M.P. (1999) Dynamic mitochondria. *Nat Cell Biol*, **1**, E149-150.
- Youle, R.J. and Strasser, A. (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 47-59.
- Zemojtel, T., Frohlich, A., Palmieri, M.C., Kolanczyk, M., Mikula, I., Wyrwicz, L.S., Wanker, E.E., Mundlos, S., Vingron, M., Martasek, P. and Durner, J. (2006a) Plant nitric oxide synthase: a never-ending story? *Trends Plant Sci*, **11**, 524-525; author reply 526-528.
- Zemojtel, T., Kolanczyk, M., Kossler, N., Stricker, S., Lurz, R., Mikula, I., Duchniewicz, M., Schuelke, M., Ghafourifar, P., Martasek, P., Vingron, M. and Mundlos, S. (2006b) Mammalian mitochondrial nitric oxide synthase: characterization of a novel candidate. *FEBS Lett*, **580**, 455-462.
- Zemojtel, T., Penzkofer, T., Dandekar, T. and Schultz, J. (2004) A novel conserved family of nitric oxide synthase? *Trends Biochem Sci*, **29**, 224-226.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

ActD	Actinomycin D
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
AMS	4-Acetoamido-4'-Maleimidylstilben-2,2'-Disulfonsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintri-phosphat
BCECF	2',7'-Bis(2-Carboxyethyl)-5(6)-Carboxyfluorescein-Acetoxymethylester
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Ca	Kalzium
cDNA	komplementäre DNA
CDS	kodierende mRNA Sequenz
CHX	Cycloheximid
CoA	Coenzym A
CsA	Cyclosporin A
Cu	Kupfer
Da	Dalton
ddH ₂ O	deionisiertes Wasser
DDM	Dodecylmaltosid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribo-Nukleotide
DPI	Dichlorophenolindophenol
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoesäure)
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-Aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
et al.	et al.tera, und andere
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	Fötale Rinderserum
FMN	Flavinmononukleotid
g	Gramm
GFP	green fluorescent protein

GTP	Guanosintriphosphat
HBO	Hyperbare Oxygenierung
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
Hif1	hypoxia-induced-factor 1
HRE	Hypoxia-response element
Hyg	Hygromycin
IFM	interfibrilläre Mitochondrien
kb	Kilobasenpaare
Ktr	Kontrolle
l	Liter
L-Arg	L-Arginin
L-Lys	L-Lysin
L-NNA	No-Nitro-L-Arginin
μ	mikro
M	Molarität (mol/l)
m	milli
mA	Milliampere
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mt-DNA	mitochondriale DNA
mtTFB	mitochondrialer Transkriptionsfaktor B
n	nano-
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP+	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NBT	Nitrotetrazolium-Blau
NO	Stickstoffmonoxid
OD	Optische Dichte
p	pico-
p.a.	per analysis
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaktion
PGC	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
pH	Potentium Hydrogenii (-log[H ₃ O ⁺])
PMS	Phenazinmetasulfat
PTP	Permeabilität-Transitions-Pore
RNA	Rinonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SILAC	stable isotope labeling of amino acids in cell culture
SNAP	S-Nitrosopenicillamin
SSM	subsarcolemmare Mitochondrien

TEMED	N,N,N',N'-Tris-hydroxyethyl-aminomethan
Tfam	mitochondrialer Transkriptionsfaktor A
TIM	Translokase der mitochondrialen Innenmembran
TOM	Translokase der mitochondrialen Außenmembran
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
t-RNA	Transfer-RNA
U	Unit
u.a.	unter anderem
UV	x
V	Volt
VDAC	voltage dependent anion channel
w/v	Masse/Volumen

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 zeigt die schematische Darstellung eines Mitochondriums.	1
Abbildung 2 zeigt eine schematische Darstellung der mitochondrialen Atmungskette. Die Atmungsketten-komplexe I-IV transportieren Elektronen von NADH auf molekularen Sauerstoff, wobei der Transport der Elektronen an die Erzeugung eines elektrochemischen Protonengradientens über die Innenmembran gekoppelt ist. Die Energie dieses Gradientens wird durch den Komplex V, der F_1F_0 -ATPase, genutzt, um ATP zu produzieren. Abbildung adaptiert nach Ilya Belevich (www.biocenter.helsinki.fi).....	4
Abbildung 3 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme einer Kardiomyozyte. Zu erkennen sind Mitochondrien die sich direkt unterhalb der Plasmamembran befinden (gekennzeichnet mit weißen Pfeilen). Diese stellen die subsarkolemmalen Mitochondrien dar. Andere befinden sich zwischen den Myofibrillen, die interfibrillären Mitochondrien (innerhalb des weißen Kreises). (Abbildung aus (Palmer et al., 1977)).	10
Abbildung 4 zeigt einen möglichen Mechanismus der Energietransmission in einer Myozyte. Sauerstoff und Substrate werden von den subsarkolemmalen Mitochondrien über die Atmungskette unter der Generierung eines Protonengradienten verbraucht. Die Protonen diffundieren im Zytosol in den Kernbereich der Zelle entlang eines mitochondrialen Filamentes, welches die subsarkolemmalen (SSM) mit den interfibrillären (IFM) Mitochondrien verbindet. Nach Erreichen der interfibrillären Mitochondrien werden die Protonen für die Produktion von ATP über die F_1F_0 -ATPase genutzt. In der Matrix produziertes ATP gelangt über den ATP/ADP-Antiporter in das Zytosol, wo es beispielsweise von Aktomyosinfilamenten genutzt wird. Das dabei wieder entstehende ADP+Pi wird in die Matrix importiert. Die sich nach der ATP-Synthese in der Matrix befindenden Protonen diffundieren über die Matrix der mitochondrialen Filamente wieder zu den subsarkolemmalen Mitochondrien zurück (Skulachev, 2001) Abbildung aus (Skulachev, 2001)	12
Abbildung 5: spezifische Citratsynthase-Aktivität der SSM (ausgefüllte Balken) und IFM des Schweins (leere Balken) in der Kontrolle und nach hyperbarer Oxygenierung (HBO); Angaben in % der SSM-Kontrolle als Mittelwert±Standardabweichung von n=5 unabhängigen Experimenten	54
Abbildung 6: Veränderung der enzymatischen Aktivitäten bezogen auf die Citratsynthase-Aktivität (CS) von Komplex I (A), Komplex III (B), Komplex IV (C) und Komplex V (D) durch hyperbare Oxygenierung in SSM (ausgefüllte Balken) und IFM (leere Balken) des Schweins; Komplex I Aktivitätsmessung nach Hatefi und Stempel (Hatefi and Stempel, 1967); Angaben in % der SSM-Kontrolle als Mittelwert± Standardabweichung von n=5 unabhängigen Experimenten; *p<0,05.....	55
Abbildung 7: katalytische in-Gel-Färbung der Atmungskettenkomplexe des Schweins nach <i>Blue Native PAGE</i> repräsentativ für 3 unabhängige Experimente . A: Färbung der NADH-Oxidase-Aktivität (Komplex I) in SSM und IFM mit und ohne HBO-Behandlung; B: Färbung der ATPase-Aktivität (F_1F_0 -ATPase) als Holo-Enzymkomplex bei 600 kDa und als F_1 -Untereinheit bei ca. 370 kDa in SSM und IFM mit und ohne HBO-Behandlung	57
Abbildung 8: Darstellung der Atmungskettenkomplexe in den mitochondrialen Subpopulationen des Schweins mit und ohne HBO-Behandlung nach elektrophoretischer Auftrennung in einem <i>Blue Native-Gel</i> (A); Auftrennung der mit einem Skalpell ausgeschnittenen Komplexe V in einem Tricin-SDS-Gel als 2. Dimension; Darstellung von zusätzlichen Untereinheiten nach HBO-Behandlung in den IFM (roter Pfeil)(B) ; repräsentativ für 3 unabhängige Experimente	58
Abbildung 9: Western-Analyse von Komplex V-Untereinheiten in SSM und IFM des Schweins mit und ohne HBO-Behandlung; A: Antikörpernachweis der Abbauprodukte der β -Untereinheit in den IFM; B: Antikörpernachweis der Abbauprodukten der α -Untereinheit in den IFM; repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.....	59

Abbildung 10: elektrophoretische Auftrennung der mitochondrialen Subpopulation des Schweins mit und ohne HBO- Behandlung – Coomassie-Färbung; repräsentativ für 3 unabhängige Experimente	59
Abbildung 11: Genexpressionslevel mitochondrial-kodierter Komplexuntereinheiten in SSM (A) und IFM (B) des Schweins nach hyperbarer Oxygenierung bezogen auf die jeweiligen Kontrollen in mitochondrialer RNA; Angaben in % als Mittelwert± Standardabweichung von n=3 unabhängigen Experimenten; *p<0,05	61
Abbildung 12: Genexpressionslevel mito-chondrial-kodierter Komplexuntereinheiten nach hyperbarer Oxygenierung in der Gesamt-RNA des Schweins; Angaben in % der Kontrolle als Mittelwert± Standardabweichung von n=3 unabhängigen Experimenten; *p<0,05.....	61
Abbildung 13: Veränderung der mtDNA-Level in SSM (ausgefüllter Balken) und IFM (leerer Balken) des Schweins nach hyperbarer Oxygenierung; A: Bestimmung der mtDNA mittels quantitativer PCR; Angabe in ND6-Molekül-zahl/mg Protein als Mittelwert ±Standardabweichung; B: repräsentativer Southern Blot	62
Abbildung 14: Veränderung der mRNA-Expression von PGC1 α und Tfam durch hyperbare Oxygenierung im Schwein; Angaben in % der Kontrolle als Mittelwert± Standardabweichung von n= 3 unabhängigen Experimenten; *p<0,05	63
Abbildung 15: Einfluss der erhöhten Sauerstoffverfügbarkeit (HBO) auf den mitochondrialen Matrix-pH in SSM (ausgefüllter Balken) und IFM (leerer Balken) des Schweins; Angabe in pH-Einheiten alsMittel-wert±Standardabweichung von n=5 unabhängigen Experimenten;*p<0,05	64
Abbildung 16: Unterschiede des Cytochrom <i>c</i> -Gehaltes in SSM (ausgefüllter Balken) und IFM (leerer Balken) des Schweins in Abhängigkeit von der Sauerstoffverfügbarkeit (HBO); Abgleich der Cytochrom <i>c</i> -Expression auf die VDAC-Expression; Angaben in % der SSM-Kontrolle als Mittelwert±Standardabweichung von n=3 unabhängigen Experimenten;*p<0,05	64
Abbildung 17: Unterschiede in der Opa-1-Transkript-Expression zwischen SSM und IFM des Schweins mit und ohne HBO-Behandlung (oben) dargestellt im Western Blot; Beweis einer einheitlichen Proteinauftragung durch die VDAC-Expression (unten)	65
Abbildung 18: Veränderung der spezifischen Aconitase-Aktivität in SSM (ausgefüllter Balken) und IFM (leerer Balken) des Schweins durch die hyperbare Oxygenierung; Angaben als Mittelwert±Standardabweichung von n=5 unabhängigen Experimenten.....	66
Abbildung 19: Veränderung der spezifischen Acyl-CoA-Dehydrogenase-Aktivität in SSM (ausgefüllter Balken) und IFM (leerer Balken) des Schweins durch eine erhöhte Sauerstoffverfügbarkeit (HBO); Angaben als Mittelwert± Standardabweichung von n=5 unabhängigen Experimenten	66
Abbildung 20: Reduktion der körperlichen Aktivität im Syrischem Hamster durch Induktion der Hibernation; A: 12 h hell-12 h dunkel bei 22 °C (entspricht der Kontroll-Gruppe I); B: 10 h hell-14 h dunkel bei 20 °C; C: 08 h hell-16 h dunkel bei 16 °C (entspricht Gruppe II); D: 02 h hell: 22 h dunkel bei 5 °C (entspricht der Torporgruppe III); Angaben als Mittelwert±Standardabweichung mit n=6; *p<0,05	68
Abbildung 21: Veränderung der Cytochrom <i>c</i> Reduktionsrate im Syrischem Hamster in SSM (ausgefüllte Balken) und IFM (leerer Balken) mit Abnahme der Bewegungs-Aktivität; Abgleich der Enzymaktivitäten auf die Citratsynthase-Aktivität; Angaben in % als Mittelwert±Standardabweichung von n=3 unabhängigen Experimenten;*p<0,05; #p<0,05 bezogen auf die gesamte Gruppe	68
Abbildung 22: Proteinexpression der β -ATPase-Untereinheit in den mitochondrialen Subpopulationen von Patienten mit DCM und ICM (oben) dargestellt im Western Blot;VDAC-Protein-Expression als Marker der Proteinladung (unten)	69

Abbildung 23: Unterschiede in der Opa-1-Transkript-Expression zwischen SSM und IFM in Patienten mit DCM bzw ICM dargestellt im Western Blot unter Kennzeichnung der 5 möglichen Opa-1-Transkripte L1,L2, S1,S2 und S3.....	70
Abbildung 24: elektrophoretische Auftrennung der mitochondrialen Subpopulationen von Patienten mit DCM bzw. ICM –Coomassie-Färbung	71
Abbildung 25: schematische Darstellung der primären Struktur von mNOA1 mit den <i>in silico</i> prädiktierten Domänen.....	72
Abbildung 26: mNOA1-mRNA-Expression in Mausgeweben; Angabe der mNOA1-Expression bezogen auf die β -Aktin-Expression als Mittelwert \pm Standardabweichung von n=3 unabhängigen Experimenten; LV = linker Ventrikel, RV = rechter Ventrikel; M.Gastro. = <i>Musculus Gastrocnemius</i> , M.Soleus = <i>Musculus soleus</i>	73
Abbildung 27: mitochondriale Lokalisation von mNOA1 durch konfokal-mikroskopische Analyse der GFP-mNOA1-Überexpression (A) mit der Mitochondrien-Färbung (B) und Überlagerung beider (C); repräsentative Abbildung von 3 unabhängigen Experimenten.....	73
Abbildung 28: Proteinexpression von mNOA1 in Herz-und Lebermitochondrien der Maus; repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.....	74
Abbildung 29: Veränderung der enzymatischen Aktivität der NADH-Oxidation (A) und Cytochrom <i>c</i> -Reduktion (B) durch Komplex I in stabil mNOA1-überexprimierenden Zellen Angabe in % der Mock-Trans-fektion als Mittelwert \pm Standardabweichung von n=5 unabhängigen Experimenten;*p<0,05.....	75
Abbildung 30: Veränderung der Komplex V-Aktivität in mNOA1-überexprimierenden Zellen (A), Erhöhung des ATP-Gehaltes durch die mNOA1-Überexpression (B); Angabe in % der Mock-Transfektion als Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens 3 unabhängigen Experimenten ; *p<0,05	75
Abbildung 31: P-Loop-Domäne-abhängige Induktion der Cytochrom <i>c</i> -Reduktion durch mNOA1; Angabe in % der Mock-Transfektion als Mittel-wert \pm Standardabweichung von n=3 unabhängigen Experimenten ; *p<0,05.....	76
Abbildung 32: Interaktionspartner von mNOA1- Immunpräzipitation ; repräsentative Coomassiefärbung der Immunpräzipitation (A); Zellorganellverteilung der durch Massenspektrometrie identifizierten Proteine (B).....	77
Abbildung 33: Flag-Immunopräzipitation von mNOA1-Flag exprimierenden Zellen nach Transfektion mit mNOA1-GFP; Analyse der Flag-Immunpräzipitate (IP) mit anti-mNOA1 (links) und anti-GFP (rechts); L = Lysat; repräsentativ für 3 unabhängige Experimente	79
Abbildung 34: Charakterisierung der mNOA1-Verteilung im Saccharose-Gradienten von Digitonin-solubilisierten Herzmitochondrien der Maus; Western Blot repräsentativ für 4 unabhängige Experimente;.....	80
Abbildung 35: Identifizierung von mNOA1 als Bestandteil der mitochondrialen Komplexe in der zweiten Dimension von durch <i>Blue Native-Gel</i> -elektrophoretisch aufgetrennten Digitonin-solubilisierten Herzmitochondrien der Maus, IV- Komplex IV, III- Komplex III, V- F ₁ F ₀ -ATPase, I- Komplex I, SK- Superkomplexe; repräsentativ für 3 unabhängige Experimente..	81
Abbildung 36: Charakterisierung der mNOA1 Expression in den mitochondrialen Atmungsketten - komplexen mittels nicht- reduzierender zwei-dimensionalen <i>Blue Native PAGE</i> von Herzmitochondrien der Maus, repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.....	81
Abbildung 37: Proteininstabilität (Kreise) von mNOA1; Inkubation von C2C12-Zellen mit 50 μ g / ml Cyclo-heximid (CHX) für die angegebene Dauer; mRNA-Stabilität von mNOA1 (Rauten); Inkubation von C2C12-Zellen mit 5 μ g / ml Actinomycin D (ActD) für die angegebene Dauer Angabe in % der Kontrolle als Mittelwert \pm Standardabweichung von n=3 Experimenten	82
Abbildung 38: sh-RNA vermittelte Herabregulation der mNOA1-Expression auf RNA- (A) und Proteinebene (B) 48 Stunden nach Transfektion; Angabe in % der Mocktransfektion als Mittelwert \pm Standardabweichung von n=3 unabhängigen Experimenten;*p<0,05.....	83

Abbildung 39: Reduktion der Überlebensrate der C2C12-Zellen nach transienter Transfektion von sh-mNOA1; Angabe in % der Mock-Transfektion als Mittelwert± Standardabweichung von n= 3 unabhängigen Experimenten; *p<0,05	84
Abbildung 40: Einfluss der sh-mNOA1-Transfektion auf die mitochondrialen Aktivitäten 48 Stunden nach der Transfektion; Induktion der Komplex I-abhängigen NADH-Oxidation sowie Herabregulation der Cytochrom c-Reduktion; keine Änderung der Komplex III-Aktivität; Normalisierung der Aktivitätsmessungen auf die Citratsynthase-Aktivität; Angaben in % der Mock-Transfektion als Mittelwert±Standardabweichung von n=4 unabhängigen Experimenten; *p<0,05	84
Abbildung 41: Einfluss der sh-mNOA1-Transfektion auf den ATP-Gehalt 48 Stunden nach der Transfektion; Angaben in % der Mock-Transfektion als Mittelwert±Standardabweichung von n=3 unabhängigen Experimenten; *p<0,05	85
Abbildung 42: Einfluss der induzierten mNOA1-Herabregulation auf die Menge assemblierter Atmungskettenkomplexe analysiert mit Hilfe von <i>Blue Native</i> -Gelen und anschließendem nativen Blot. Die einzelnen Komplexe wurden mit Hilfe eines Antikörpermixes, bestehend aus Antikörpern jeweils gegen eine Untereinheit der einzelnen Komplexe gerichtet, identifiziert. Repräsentative Darstellung von zwei Experimenten. Das Molekulargewicht der einzelnen Superkomplexe wurde von Dr. Ilka Wittig errechnet (A). Für die Quantifizierung der Blots wurden entsprechend kürzer exponierte Blots (für Komplex IV und V) herangezogen. Diese ist im Diagramm (B) dargestellt, Angaben in % der Mock-Transfektion als Mittelwert±Standardabweichung von n=3 unabhängigen Experimenten; *p<0,05	86
Abbildung 43: Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials in Abhängigkeit von der Herabregulation von mNOA1 gemessen mit dem Farbstoff JC-1 mittels FACS; repräsentatives Histogramm (A) und statistische Auswertung von n= 3 Experimenten; (B); *p<0,05.....	87
Abbildung 44: Reduktion der Überlebensrate der C2C12-Zellen nach transienter Transfektion von sh-mNOA1 unabhängig von der PTP-Öffnung gezeigt durch die Inhibition mit 3 µM CsA; Angabe in % der Mock-Transfektion als Mittelwert± Standardabweichung von n= 3 unabhängigen Experimenten; *p<0,05	88
Abbildung 45: Bestimmung der Superoxidproduktion mittels FACS-Analyse unter Verwendung von MitoSOX in Mock-transfizierten und sh-mNOA1-transfizierten C2C12-Zellen 48 Stunden nach Transfektion; repräsentativ für n= 4 Experimente	88
Abbildung 46: Reduktion der Überlebensrate der C2C12-Zellen nach transienter Transfektion von sh-mNOA1 und Inhibition des sh-mNOA1-induzierten Zellsterbens durch die Inkubation der Zellen mit 10 mM NAC; Angabe in % der Mock-Transfektion als Mittelwert± Standardabweichung von n= 3 unabhängigen Experimenten; *p<0,05.....	89
Abbildung 47: Redox-Western-Analyse von Thioredoxin-2 (Trx-2) 48 Stunden nach sh-mNOA1-Transfektion; völlige Oxidation von Trx-2 durch die Inkubation mit 1 mM H ₂ O ₂ als Positivkontrolle; repräsentativ für 3 unabhängige Experimente	90
Abbildung 48: Unabhängigkeit des sh-mNOA1-induzierten Zelltod von einer Aktivierung von JNK/SAP bzw. p38; Inkubation von C2C12 mit 10 ng /ml Anisomycin als Positivkontrolle; repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.....	90
Abbildung 49: Freisetzung von Cytochrom c in das Cytosol hervorgerufen durch die Herabregulation von mNOA1; Western-Blot repräsentativ für 3 unabhängige Experimente .	91
Abbildung 50: Aktivierung von pro-apoptotischer Caspase-3 und PARP durch die Herabregulation von mNOA1, Western Blot repräsentativ für 3 unabhängige Experimente..	92
Abbildung 51: Hypoxie-abhängige Herabregulation der mNOA1-mRNA-Expression und Induktion der Expression durch eine 2-stündige Reoxygenierung (RO); Angaben in % der Normoxie als Mittelwert±Standardabweichung von mindestens n=3 unabhängigen Experimenten; *p<0,5	93

Abbildung 52: Einfluss der mNOA-1 Überexpression auf die Cytochrom <i>c</i> -Reduktion unter Hypoxie und nach 2-stündiger Reoxygenierung (RO); Angabe in % der normoxischen Mock-Kontrolle als Mittelwert \pm Standardabweichung von n= 4 unabhängigen Experimenten; *p<0,05; #p<0,05 Normoxie gegen Hypoxie	93
Abbildung 53: Herabregulation der mNOA1-mRNA-Expression durch die Inkubation von C2C12-Zellen mit CoCl ₂ unter normoxischen Bedingungen; Angaben in % der Kontrolle als Mittelwert \pm Standardabweichung von n=3 unabhängigen Experimenten; *p<0,5.....	94
Abbildung 54: Detektion von spezifischen Bandshifts nach der Inkubation von IRD-700 markierten mNOA1-HRE-Oligo-Nukleotiden mit hypoxischen Zellkernextrakten. Spezifizierung der Bindung durch die Konkurrenz mit nicht-markierten konsensus Oligonukleotiden und Nicht-Konkurrenz mit mutanten Oligonukleotiden. Repräsentativ für 3 unabhängige Experimente	95
Abbildung 55 zeigt die Rolle von mNOA1 als Regulator der mitochondrialen Atmungsadaptation in Abhängigkeit von der Sauerstoffverfügbarkeit.....	116

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenfassung der verwendeten PCR-Primer	18
Tabelle 2: Zusammenfassung der verwendeten Antikörper.....	23
Tabelle 3: Zusammensetzung der Gellösungen für die <i>Blue Native PAGE</i>	40
Tabelle 4: Zusammensetzung der Gellösungen für die Trizin-SDS-PAGE.....	42
Tabelle 5: Zusammenfassung der molaren Extinktionskoeffizienten	44
Tabelle 6: Zusammenfassung des in-Gel Trypsinverdaus	51
Tabelle 7 : Zusammenfassung der Peptidextraktion	52
Tabelle 8: Zusammenfassung der mitochondrialen Proteine, die in der mNOA1- Immunpräzipitation mittels Massenspektrometrie identifiziert wurden	78

7.4 Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich bei der Erarbeitung meiner Dissertation zu allen Zeiten unterstützt haben.

Zuerst gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Jürgen Holtz für die Vergabe dieses interessanten Themas und die Unterstützung und Betreuung bei der Erstellung der Arbeit, die auch durch seine Emeritierung nicht geschmälert wurde. Insbesondere seine tollen Kritiken bei der Korrektur meiner Dissertation haben sehr geholfen. Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Werner Roos, der sich bereit erklärt hat meine Dissertation nach der Emeritierung von Herrn Prof. Dr. Jürgen Holtz weiter zu betreuen.

Ganz herzlich danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. Thomas Braun, dem Direktor des Max-Planck-Instituts für Herz- und Lungenforschung in Bad Nauheim, dass ich die Promotion an seinem Institut fortsetzen durfte und auch für seine unerschöpflichen konstruktiven Ideen und Diskussionen.

Weiterhin möchte ich mich ganz, ganz herzlich bei Dr. Marten Szibor bedanken - für seine ständige Hilfsbereitschaft, seinem großen Ideenreichtum, seinem wissenschaftlichen Enthusiasmus und seine sehr große Unterstützung sowie den vielen kritischen Diskussionen, die wir oft auch mal am Abend bei einem Glas Wein hatten. Seine Hilfe hat maßgeblich zu dem erfolgreichen Abschluss dieser Promotion geführt.

Für die Zeit in Halle möchte ich mich ganz sehr bei dem besten Laborteam ever bedanken - tausend Dank Toby, Roman, Frau Leitloff und Frau Gall.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des Max-Planck-Instituts für Herz- und Lungenforschung, die mich unterstützt haben - besonders erwähnen möchte ich dabei Zaber, Marie, Luca, Ewa, Jason, Ulrike, Nicole Marion, Katja Kolditz, Susanne, Nadine, Frank, Isabell, Thomas Böttger, Marcus Krüger, und die Arbeitsgruppe Kubin.

Dr. Dirk Henze und Dr. Corinna Krüger danke ich für die Bereitstellung der Schweineherzen im HBO-Experiment.

Dr. Ilka Wittig danke ich für ihre experimentelle Hilfe, die schönen Diskussionen und Gespräche.

Für die große seelische Unterstützung und die vielen schönen, lustigen Zeiten zusammen danke ich von ganzem Herzen meiner lieben Freundin Ole. Schön, dass es dich gibt!

Ein ganz besonders großes Dankeschön gilt meiner Familie, die niemals den Glauben an mich verloren und mich in allen Lebenslagen immer unendlich unterstützt hat.

D A N K E

7.5 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Juliana Heidler
Geburtstag: 06. Oktober 1979
Geburtsort: Görlitz

Bildungsgang

9/1986 – 7/1991 Grundschule „Friedrich Schiller“, Halle

8/1991 – 7/1998 Gymnasium „Latina August Hermann Francke“, Halle

7/1998 Abitur

10/1998 – 8/2003 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

8/2003 Abschluss Diplom-Biochemie; Note: 1,0

11/2003 – 6/2009 Promotion am Institut für Pathophysiologie der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und Max-Planck-Institut
für Herz-und Lungenforschung in Bad Nauheim

Ab 7/2009 wissenschaftlicher Mitarbeiter der Molekularen Hämatologie am
Uniklinikum der Johann-Wolfgang-Goethe Universität in Frankfurt

7.6 Publikationen

Noack H, Bednarek T, **Heidler J**, Ladig R, Holtz J, Szibor M. TFAM-dependent and independent dynamics of mtDNA levels in C2C12 myoblasts caused by redox stress. *Biochem Biophys Acta*. 2006 Feb;1760(2):141-50.

Catar RA, Müller G, **Heidler J**, Schmitz G, Bornstein SR, Morawietz H. Low-density lipoproteins induce the renin-angiotensin system and their receptors in human endothelial cells. *Horm Metab Res*. 2007 Nov;39(11):801-5.

Heidler J, Al-Furoukh N, Kukat C, Salwig I, Ingelmann ME, Seibel P, Krüger M, Holtz J, Braun T and Szibor M. Noa1 is necessary for oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiratory complexes. *JBC in Revision*

Heidler J^{*}, Szibor M^{*}, Al-Furoukh N, Kostin S, Pöling J, Bednarek T, Henze D, Krüger C, Holtz J, Braun T. Reversible Dysfunction of Cardiac Mitochondria Following Physical Inactivity Initiates a State Resembling Early Cardiac Failure. *Eingereicht*

^{*}Gleichberechtigte Erstautoren

7.7 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich mich mit dieser Arbeit erstmals um die Erlangung eines akademischen Grades beworben habe. Ich versichere, dass die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt wurde. Den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Juliana Heidler

Frankfurt, 21.05.2011