

Aus dem Institut für Pharmakologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Rolle von Cardiolipinen für die Herzfunktion von  
*Drosophila melanogaster*

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sarah Leberer  
aus Friedrichshafen

Datum der Promotion: 26.06.2022

## **Vorwort**

Teilergebnisse der hier vorliegenden Arbeit wurden am 19.11.2021 unter dem Titel „Depletion of Cardiac Cardiolipin Synthase Alters Systolic and Diastolic Function“ in *iScience* (*iScience* 19;24(11):103314) veröffentlicht. Dies betrifft sowohl die Daten der Herzfunktionsanalyse der *Drosophila*-Spezies mit Cardiolipin Synthase Mutation als auch die Ergebnisse der Herzfunktionsanalyse des Cardiolipin Knockdown und der Mitochondrienfunktionsanalyse. (Abbildungen 27-31 & 33).

## Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
<b>1</b>	<b>Abbildungsverzeichnis ..... 4</b>
<b>2</b>	<b>Tabellenverzeichnis ..... 6</b>
<b>3</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis ..... 7</b>
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung..... 8</b>
<b>5</b>	<b>Einleitung..... 11</b>
5.1	Herzinsuffizienz – eine Gesundheitsökonomische Herausforderung..... 11
5.1.1	Definition und Ätiologie der HI ..... 11
5.1.2	HI als Folge mitochondrialer Dysfunktion ..... 15
5.2	Mitochondrien ..... 16
5.3	Cardiolipine..... 19
5.3.1	Biosynthese und Remodeling von Cardiolipinen ..... 20
5.3.2	Funktionen von CL ..... 22
5.3.3	Cardiolipine als Ursache für Erkrankungen ..... 24
5.4	Der Modellorganismus <i>Drosophila melanogaster</i> ..... 25
5.5	<i>Drosophila</i> Herz und Zirkulationssystem..... 27
5.5.1	Methoden der Herzfunktionsanalyse in <i>Drosophila</i> ..... 29
5.6	Zielsetzung der Arbeit..... 30
<b>6</b>	<b>Material..... 33</b>
6.1	Allgemeine und <i>Drosophila</i> spezifische Laborgeräte ..... 33
6.1.1	<i>Drosophila</i> aufzucht und -experimente..... 33
6.1.2	Laborgeräte ..... 33
6.2	Chemikalien und Kits ..... 34
6.3	<i>Drosophila</i> Genotypen ..... 35
6.4	Software..... 36
<b>7</b>	<b>Methoden ..... 37</b>
7.1	Haltung und Zucht von <i>Drosophila</i> ..... 37
7.2	Zucht von <i>Drosophila</i> ..... 38
7.2.1	<i>Drosophila</i> mit Mutation..... 40
7.2.2	<i>Drosophila</i> mit herzspezifischem Knockdown ..... 40
7.2.3	Kreuzungsschemata..... 41
7.2.3.1	Cardiolipinsynthese Mutante ..... 41

7.2.3.2 Tafazzin Mutante .....	42
7.2.3.3 Herzspezifischer CLS KD .....	43
7.2.3.4 Herzspezifischer Taz KD .....	44
7.3 Herzfunktionsanalyse.....	45
7.4 Massenspektrometrische Lipidomanalyse .....	48
7.5 Mitochondrienfunktionsanalyse mittels Seahorse .....	50
7.6 TBARS.....	53
7.7 Langzeitüberleben .....	55
7.8 Statistische Analysen.....	55
<b>8 Ergebnisse.....</b>	<b>56</b>
8.1 Tafazzin .....	56
8.1.1 Kardiale Charakterisierung der Taz-Mutante.....	56
8.1.2 Kardiale Charakterisierung der herzspezifischen Taz -KD-Fliege (KK) .....	59
8.1.3 Kardiale Charakterisierung der herzspezifischen Taz -KD-Fliege (GD) .....	62
8.2 Cardiolipinsynthese .....	65
8.2.1 Kardiale Charakterisierung der CLS-Mutante.....	65
8.2.2 Kardiale Charakterisierung der herzspezifischen CLS-KD-Fliege ...	69
8.3 Weiterführende Charakterisierung CLS Mutante .....	73
8.3.1 Lipidomanalyse der CLS-Mutante .....	73
8.3.2 Mitochondriale Funktion der CLS-Mutante .....	74
8.3.2.1 TBARS.....	78
8.3.3 Langzeitüberleben der CLS-Mutante.....	79
<b>9 Diskussion .....</b>	<b>80</b>
9.1 <i>Drosophila</i> als Modellorganismus in der kardiovaskulären Forschung .....	80
9.2 Tafazzin .....	82
9.3 CLS-Mutante.....	86
9.3.1 Herzfunktion bei CLS-Defizit .....	86
9.3.2 Auswirkung eines CLS-Defizites auf den Alterungsprozess des Fliegenherzens.....	88
9.3.3 Auswirkung von CL-Mutation auf zellulärer Ebene.....	91
9.4 Cardiolipine ein pharmakologisches Ziel der Zukunft .....	94
9.5 Zusammenfassung .....	96
<b>10 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>98</b>
<b>11 Eidesstaatliche Erklärung .....</b>	<b>111</b>

---

<b>12 Lebenslauf .....</b>	<b>113</b>
<b>13 Publikationsliste.....</b>	<b>114</b>
<b>14 Danksagung.....</b>	<b>115</b>

# 1 Abbildungsverzeichnis

	<u>Seite</u>
Abbildung 1	Universelle Diagnosekriterien der HI (5)..... 12
Abbildung 2	Circulus Vitiosus der HI ..... 15
Abbildung 3	Das Mitochondrium und seine Kompartimente..... 18
Abbildung 4	Grundstruktur CL..... 20
Abbildung 5	Syntheseschritte und Remodeling von Cardiolipin in der inneren Mitochondrienmembran..... 22
Abbildung 6	Funktionen von CL. .... 23
Abbildung 7	Zirkulus Vitiosus ..... 25
Abbildung 8	Parallelen zwischen <i>Drosophila</i> und dem menschlichen Körper. .... 26
Abbildung 9	<i>Drosophila</i> Herz und umgebende Strukturen. .... 29
Abbildung 10	Experimenteller Aufbau ..... 32
Abbildung 11	Generationen <i>Drosophila</i> . .... 38
Abbildung 12	Unterscheidung von <i>Drosophila</i> aufgrund optischer Merkmale. .... 39
Abbildung 13	Schematischer Ablauf eines KD mit dem UAS-Gal4-System..... 41
Abbildung 14	Kreuzungsschema CLS Mutante und Kontrolle..... 42
Abbildung 15	Kreuzungsschema Tafazzin Mutante und Kontrolle. .... 42
Abbildung 16	Kreuzungsschema CLS RNAi <sup>KK</sup> und Kontrollen. .... 43
Abbildung 17	Kreuzungsschema Tafazzin RNAi <sup>GD</sup> und Kontrollen. .... 44
Abbildung 18	Kreuzungsschema Tafazzin RNAi <sup>KK</sup> und Kontrollen. .... 45
Abbildung 19	Herzfunktionsanalyse nach Klassen..... 47
Abbildung 20	Arbeitsablauf Mitochondrienfunktionsanalyse. .... 53
Abbildung 21	Herzfunktionsanalyse bei Taz-Mutation. .... 57
Abbildung 22	Kalkulierte Parameter aus der Herzfunktionsanalyse bei Taz-Mutation. .... 59
Abbildung 23	Herzfunktionsanalyse bei KD von Taz (KK). .... 60
Abbildung 24	Kalkulierte Parameter aus der Herzfunktionsanalyse bei KD von Taz (KK). .... 62

---

Abbildung 25	Herzfunktionsanalyse bei KD von Taz (GD).....	63
Abbildung 26	Kalkulierte Parameter aus der Herzfunktionsanalyse bei Taz-KD (GD). ....	65
Abbildung 27	Herzfunktionsanalyse drei und sieben Wochen alte CLS Mutante. Herzfunktion drei und sieben Wochen alter CLS Mutanten im Vergleich zum Wildtyp.....	67
Abbildung 28	Kalkulierte Parameter aus der Herzfunktionsanalyse von drei und sieben Wochen alten CLS Mutanten. ....	69
Abbildung 29	Herzfunktionsanalyse CLS Knockdown.....	71
Abbildung 30	Kalkulierte Parameter aus der Herzfunktionsanalyse des CLS KD. ....	72
Abbildung 31	Massenspektrometrische Bestimmung der CL-Spezies in CLS-Mutanten (rot) und Kontrollfliegen (schwarz).....	74
Abbildung 32	Mitochondriale Funktionsmessung in Herzen der CLS-Mutante und Kontrollfliegen.....	76
Abbildung 33	Mitochondriale Funktionsmessung in Herzen der CLS-Mutante und Kontrollfliegen mit Lipidreichem Serum. ....	77
Abbildung 34	Lipidperoxidation in CLS-Mutanten und Kontrollen. ....	78
Abbildung 35	Langzeitüberleben von CLS Mutante und Kontrollgruppe. ....	79
Abbildung 36	Grafische Zusammenfassung. ....	97

## 2 Tabellenverzeichnis

	<u>Seite</u>
Tabelle 1 Stadien der HI nach NYHA .....	13
Tabelle 2: Inhaltsstoffe Formula 4-24® Instant <i>Drosophila</i> Medium .....	37
Tabelle 3 Verwendete Mikroskop- und HClmage Einstellungen .....	46
Tabelle 4 Berechnung von Herzzeitvolumen und Schlagvolumen .....	48
Tabelle 5 Versuchsmedium Mitochondrienfunktion mit DMEM .....	51
Tabelle 6 Im Rahmen der Seahorse-Experimente verwendete Inhibitoren und deren Funktion, finale Konzentration, sowie zeitliche Reihenfolge der Zugabe in die Wells. ....	51
Tabelle 7 Zusammensetzung artifizielle Hämolymphe (104,105) .....	52

### 3 Abkürzungsverzeichnis

HI	Herzinsuffizienz
KD	Knockdown
CLS	Cardioliinsynthese
Taz	Tafazzin
RNAi	Interferenz RNA
UAS	Upstream Activating Sequence
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
IMM	Innere Mitochondrienmembran
ATP	Adenosintri-phosphat
PL	Phospholipid
CDP-DAG	Cytidin Diphosphat Diacylglycerol
GFP	grünes Fluoreszenzprotein
EF	Ejektionsfraktion
tdtk	Tandem Dimer Tomatoe Konstrukt

## 4 Zusammenfassung

Herzinsuffizienz (HI) ist eine Erkrankung von zunehmender Prävalenz, die unsere Gesellschaft vor große medizinische und gesundheitsökonomische Herausforderungen stellt. Für die Herzfunktion ist eine adäquate Energieversorgung essenziell. Ist diese nicht gewährleistet, führt dies zu zahlreichen Erkrankungen, beispielsweise HI. In Kardiomyozyten gewährleisten Mitochondrien die Bereitstellung von Energie in Form von Adenosintriphosphat. Für die Funktion und Integrität des Mitochondriums sind Cardiolipine (CL) von zentraler Bedeutung. Sie befinden sich überwiegend in der inneren Mitochondrienmembran, wo sie zur Cristae-Formation beitragen, die Komplexe der Atmungskette stabilisieren und in zahlreiche Stoffwechselforgänge involviert sind.

Der letzte Schritt der CL-Synthese erfolgt durch die Cardiolipinsynthase (CLS), die zwei Phospholipid-Substrate zu unreifem CL verbindet. Anschließend erfolgt ein Remodeling durch das Enzym Tafazzin (Taz), wodurch reifes CL entsteht. Es ist bekannt, dass Defekte im CL-Metabolismus zu schwerer mitochondrialer Dysfunktion führen, die auch Einfluss auf das Herz nehmen. Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von CL für die Herzfunktion der Fliege zu charakterisieren. In *Drosophila melanogaster* sind sowohl Taz als auch CLS konserviert. In der vorliegenden Arbeit wurden die kardialen Phänotypen von CLS- und Taz-Mutanten Fliegen, sowie von herzspezifischen Taz- und CLS-Knockdowns (KD) in vivo mittels fluoreszenzbasierter Hochgeschwindigkeitsmikroskopie untersucht. Um die Auswirkungen des CL-Defizites genauer zu erfassen, wurden ergänzende Versuche mit CLS-Mutanten durchgeführt. Neben der Messung der mitochondrialen Respiration erfolgte die massenspektrometrische Quantifizierung und Klassifizierung der CL-Spezies. Das Langzeitüberleben von Fliegen mit CLS-Defizit wurde untersucht, ebenso wie die Herzfunktion der gealterten CLS-Mutanten.

Die Herzfunktionsanalyse von Taz-Mutanten zeigte eine erhöhte Herzfrequenz und eine verkürzte Relaxationszeit. Dies ließ sich im herzspezifischen Taz-KD jedoch nicht bestätigen.

Die CLS-Mutanten wiesen in der Herzfunktionsanalyse vergrößerte Herzen mit signifikant erhöhten Diametern sowie eine verminderte Herzfrequenz auf. Die Kontraktion zeigte keine Veränderungen. Im herzspezifischen CLS KD stellten sich ebenfalls vergrößerte Herzdiameter dar. Zusätzlich konnte eine signifikant reduzierte systolische

Funktion detektiert werden. Weiterhin zeigte sich für Fliegen mit CLS-Defizit eine prolongierte Relaxationszeit, was auf einen diastolischen Defekt hindeutet. Massenspektrometrisch zeigte sich die Reduktion zahlreicher CL-Spezies in den CLS-Mutanten. Die mitochondriale Respiration von CLS-defizitären Kardiomyozyten unterschied sich von ihren Kontrollen. Die Untersuchung des gealterten Fliegenherzens ergab, dass Alterung bei CLS-Mutanten zu einem weiteren Abfall, der bereits in jüngerem Alter beeinträchtigten Herzfunktionsparameter führt, jedoch das Langzeitüberleben der CLS Mutanten nicht beeinträchtigt.

Unsere Daten zeigen, welche zentrale Rolle eine intakte CLS-mediierte CL-Synthese für eine adäquate Herzfunktion spielt. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um herauszuarbeiten, wie CLS die verschiedenen CL-Intermediate reguliert und damit Einfluss auf die mitochondriale und zelluläre Funktion nimmt.

## Summary

Heart failure (HF) is a disease of increasing prevalence that is developing into a major health and economic challenge for our society. The heart strongly depends on constant energy supply. A lack of energy can lead to numerous diseases including HF. In cardiomyocytes, mitochondria ensure the provision of energy. Cardiolipins (CL) are a group of lipid species crucial for mitochondrial function. Localized in the inner mitochondrial membrane, CL organize the cristae structure thereby stabilizing complexes of the electron transport chain and are involved in metabolic processes.

The final step of CL synthesis is catalyzed by cardiolipin synthase (CLS). Two phospholipid substrates are formed to nascent CL which is further remodeled by Tafazzin (Taz). Defects in CL metabolism lead to severe mitochondrial dysfunction which then also affects the heart. To study the impact of CL metabolism on cardiomyocytes, we used *Drosophila melanogaster* as a model where both CLS and Taz are conserved.

In this study, cardiac phenotypes of CLS and Taz mutant flies, as well as of heart-specific Taz and CLS knockdowns (KD) were analyzed using fluorescence-based high-speed video microscopy. To clarify the effect of the CL-deficit further experiments were performed using CLS mutant flies. Mitochondrial respiration was measured using Seahorse technology. Mass spectrometry was used to identify the CL subtypes and their quantity. Long-term survival of CLS-mutant flies and heart function analysis on aged CLS-deficient flies was performed. Our data showed that CLS-mutant flies had enlarged hearts with significantly increased endsystolic and enddiastolic diameter, and a

reduced heart rate but preserved contractile performance. Enlarged heart diameters were also present in heart specific CLS KD flies, accompanied by a significant reduction of systolic function. Both, CLS mutants and CLS KD had a prolonged relaxation time indicating diastolic defects. Taz mutants had increased heart rate and shortened relaxation time, however, this could not be confirmed in heart specific Taz KD.

The analysis of CL species using mass spectrometry revealed numerous CL-subtypes decreased in CLS mutant flies. Mitochondrial respiration of the CLS deficient cardiomyocytes differed mildly from controls. Heart function parameters that were already decreased compared to controls at young age revealed a further decrease in the aged fly heart. The longtime survival of CLS mutant flies was not affected.

Our data demonstrate the importance of intact CLS-mediated CL synthesis for adequate cardiac function. Further studies are required to elucidate how CLS regulates different CL intermediates which then affects mitochondrial and cellular function.

## 5 Einleitung

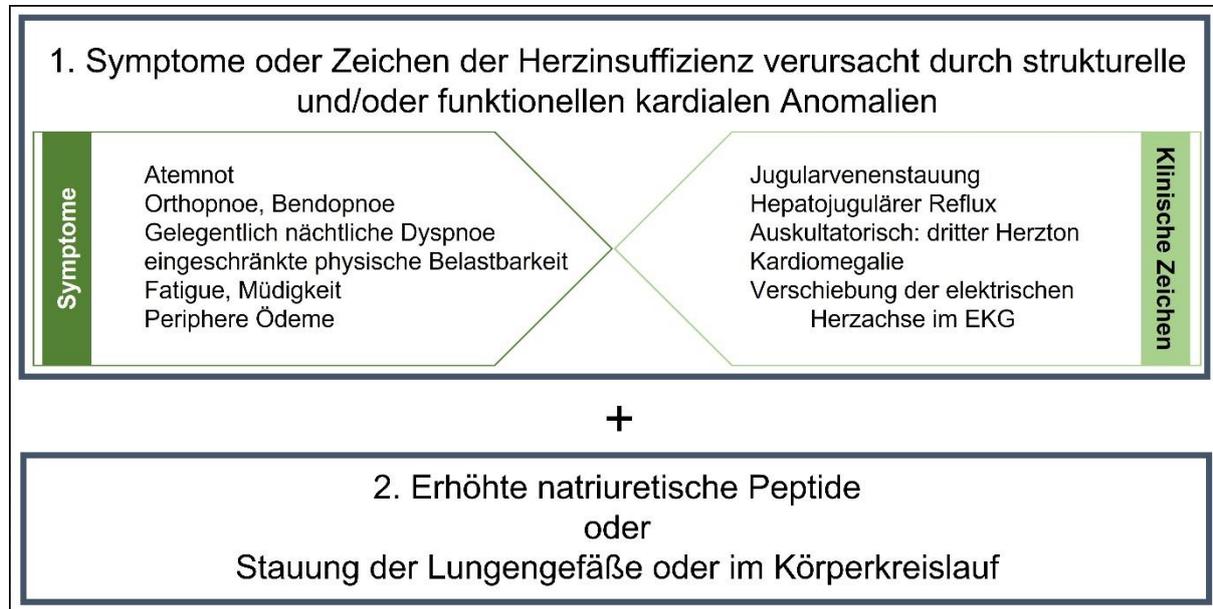
### 5.1 Herzinsuffizienz – eine Gesundheitsökonomische Herausforderung

Ist das Herz nicht in der Lage den Körperkreislauf durch seine Pumpleistung unbeeinträchtigt aufrechtzuerhalten, spricht man von Herzinsuffizienz (HI). Die global steigende Prävalenz von HI stellt die Medizin und die Gesundheitsökonomie vor große Herausforderungen (1). Trotz Weiterentwicklung der pharmakologischen Therapien und sich stetig verbessernder Versorgung von akuten Herzerkrankungen in hochentwickelten Ländern, ist es bislang nicht gelungen die Prävalenz von HI zu senken. Mit der zunehmenden Überalterung unserer Gesellschaft bleibt eine weiterhin steigende Prävalenz der HI zu erwarten. Dies spiegelt sich auch in den Zahlen des Statistischen Bundesamtes wieder, wonach 2018 die häufigste Einzeldiagnose für vollstationär behandelte Patienten ICD 150 – HI war (2). Derzeit sind umfassende Möglichkeiten der Diagnostik, des Monitorings und der symptomatischen Therapie von HI vorhanden. Eine kurative Therapie existiert jedoch nicht.

#### 5.1.1 Definition und Ätiologie der HI

Im März 2021 wurde im internationalen Konsens eine Neudefinition von HI veröffentlicht (s. Abbildung 1) (3). Die HI ist demnach ein Syndrom, dessen klinisches Bild aufgrund einer nicht ausreichenden Pumpleistung des Herzens zustande kommt. Ein Kardinalsymptom ist bei Belastung zunehmende Luftnot. Patienten mit HI sind daher häufig geringer belastbar. Aufgrund des Rückstaus von Blut im Körperkreislauf, infolge der eingeschränkten Pumpleistung, kommt es zur Ausbildung von Ödemen (4). Auch im Rahmen einer klinischen Untersuchung finden sich unspezifische Hinweise auf eine HI wie ein hepatojugulärer Rückfluss oder ein dritter Herzton (s. Abbildung 1)(4). Ursächlich für eine HI können sowohl funktionelle als auch strukturelle Anomalien des Herzens sein (3,5). Diese lassen sich sonographisch durch ein verringertes Herzzeitvolumen oder die pathologische Veränderung der Ventrikel feststellen. Auch ein verändertes Füllverhalten der Ventrikel lässt dopplerechokardiografisch nachweisen (Verhältnis aus E zu E') und erhärtet den Hinweis auf einen HI (3). Der Neudefinition folgend, muss zusätzlich zu dem klinischen Bild ein weiteres Kriterium zur Feststellung einer HI vorliegen. Hierfür kann laborchemisch ein erhöhter Spiegel an natriuretischen Peptiden gesichert werden oder eine objektivierbare Stauung entweder der Lungen-

gefäße oder im gesamten Körperkreislauf, was durch bildgebende Verfahren beispielsweise Röntgenthorax, Echokardiografie oder hämodynamische Messungen im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung erfasst werden kann (5).



**Abbildung 1** **Universelle Diagnosekriterien der HI (5).** Neben Symptomen und klinischen Zeichen, für das Vorliegen einer kardialen Anomalie, müssen zur Diagnosestellung entweder die natriuretischen Peptide erhöht sein oder sich eine Stauung der Lungengefäße oder der Gefäße im Körperkreislauf nachweisen lassen. EKG: Elektrokardiogramm

Die HI ist das Endstadium einer breiten Reihe von Erkrankungen. Die zugrunde liegende Ursache einer HI zu kennen ist, insbesondere mit Hinblick auf das therapeutische Regime, relevant. Den systolischen Ventrikelfunktionsstörungen liegt eine verminderte Kontraktionskraft des Herzens zugrunde. Dazu zählen die Koronare Herzkrankheit, Kardiomyopathien sowie die Myokarditis (4). Die Insuffizienz der Aortenklappe führt zur Entstehung eines sogenannten Pendelvolumens und damit zu einer erhöhten Volumenbelastung, gegen die das Herz anpumpt (4). Arterielle und pulmonale Hypertonie sowie die stenotische Veränderung einer Herzklappe führen hingegen zu einer Druckbelastung im Ventrikel (4). Die diastolischen Ventrikelfunktionsstörungen können beispielsweise durch Hypertrophie des Herzens oder durch eine behinderte Füllung des Ventrikels entstehen (4). Die häufigste Ursache hierfür ist die arterielle Hypertonie, deutlich seltener die konstriktive Perikarditis, restriktive Kardiomyopathien sowie die meist akut auftretende Herzbeutel tamponade (4). Auch anhaltende Herzrhythmusstörungen sowohl tachykarder, als auch bradykarder Art, können zur HI führen (4).

Echokardiografisch kann die HI weiterhin anhand ihrer Linksventrikulären Auswurffraktion (EF) eingeteilt werden (5). Hierbei unterscheiden sich die HI mit reduzierter Auswurffraktion, auch HFrEF genannt, wo die Auswurfleistung des linken Ventrikels unter 40% liegt, von der HI mit leichtgradig eingeschränkter linksventrikulärer Auswurffraktion (HFmrEF). Weiterhin wird die HI mit einer echokardiografisch erhaltenen linksventrikulären Auswurffraktion unterschieden (HFpEF). Hier liegt trotz eingeschränkter Pumpleistung keine Verringerung der linksventrikulären Auswurffraktion von unter 50% vor. Im Konsens der Neudefinition wurde die Kategorie HI mit verbesserter linksventrikulärer Auswurffraktion hinzugefügt (HFimpEF) (5). Diese Kategorie umfasst Patienten, die im Vergleich zur ersten Untersuchung ihre linksventrikuläre Auswurffraktion, beispielsweise durch geeignete medikamentöse Therapie um mindestens zehn Prozent verbessern konnten, nachdem sie in der initialen Messung eine Auswurffraktion von weniger als 40% aufwiesen (3).

Wie in Abbildung 1 dargestellt, sind die Symptome der HI sehr vielgestaltig. Je nach Intensität der Ausprägung, beeinflusst dies die Funktionalität der betroffenen Patienten. Zur Objektivierung der Symptome sowie der funktionellen Kapazität der Patienten, fließen in eine Therapieentscheidung die Kriterien der New York Heart Association (NYHA) ein (3). Die Stadien der HI reichen, wie in Tabelle 1 dargestellt, von keinen körperlichen Limitationen in Stadium I trotz dem Nachweis einer kardialen Dysfunktion bis hin zu Atemnot und Beschwerden in Ruhe im Stadium IV.

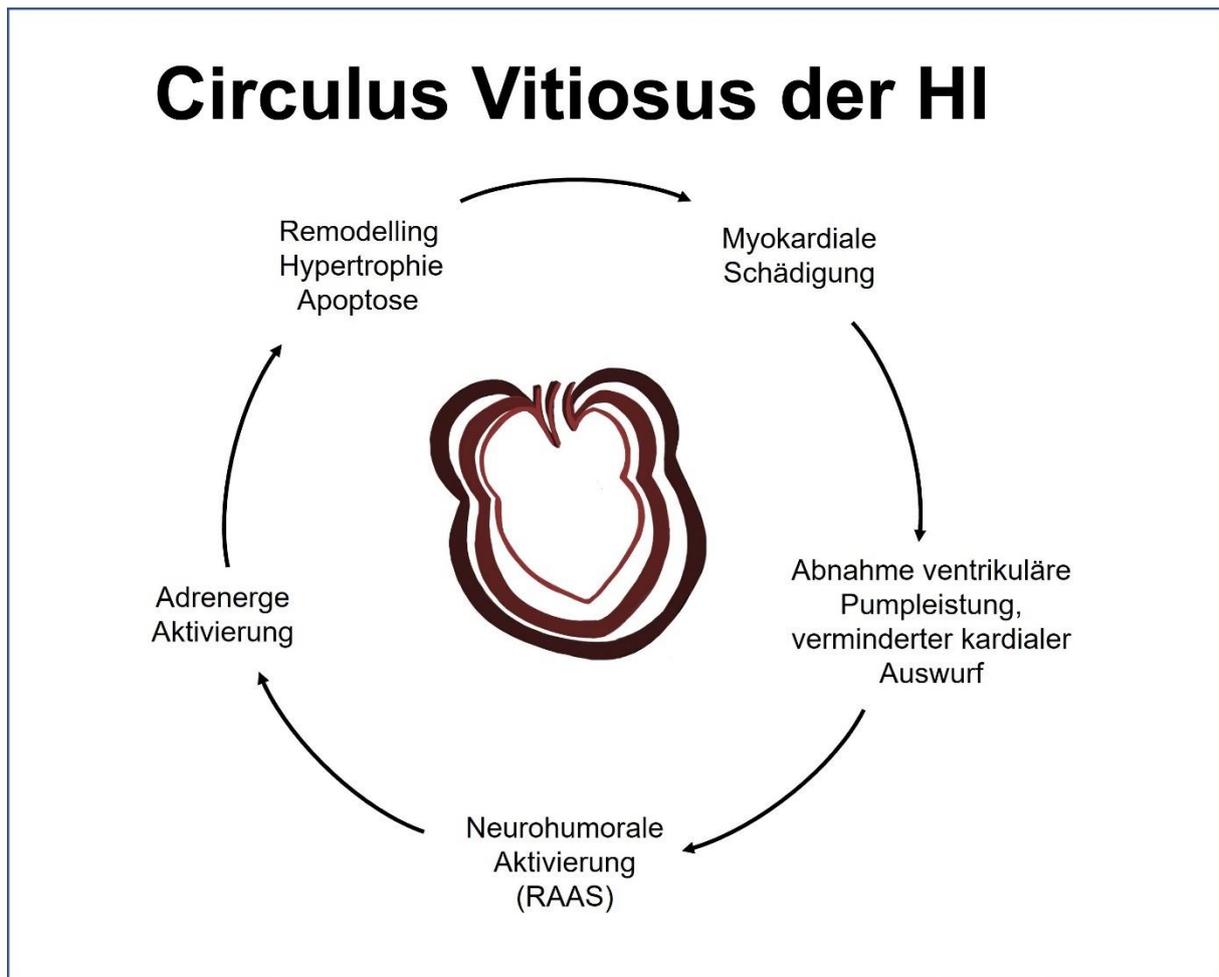
**Tabelle 1 Stadien der HI nach NYHA**

NYHA	Symptome
I	Keine körperliche Limitation Objektiver Nachweis einer kardialen Dysfunktion Herzminutenvolumen unter Belastung normal
II	Beschwerden bei mittelschwerer körperlicher Belastung (Treppensteigen) Herzminutenvolumen: ausreichend bis zu einer leichten Belastung
III	Beschwerden bereits bei leichter körperlicher Belastung Herzminutenvolumen bei Belastung reduziert
IV	Beschwerden in Ruhe Herzminutenvolumen in Ruhe reduziert

Die mangelhafte Pumpleistung des Herzens führt zu einer Reihe kompensatorischer Mechanismen des Körpers, die langfristig zu einem die HI aggravierenden Circulus Vitiosus führen (6). Aufgrund der Verringerung des Herzzeitvolumens kommt es zu

einer Verkürzung der Diastole, was dazu führt, dass die Koronarien, die in der Diastole gefüllt werden und so das Herz mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen schlechter durchblutet werden. Infolge dieser Minderversorgung kommt es zu einer weiteren Abnahme des Schlagvolumens. Durch die verringerte Pumpleistung des Herzes und daraus resultierender Minderperfusion der Nieren, wird das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System aktiviert (4). Dies führt zu Vasokonstriktion und zur Rückresorption von Wasser. Die Vasokonstriktion erhöht jedoch die Nachlast, also der Druck, gegen den der linke Ventrikel anpumpen muss. Dies führt zu einer weiteren Abnahme des Schlagvolumens und infolgedessen zu einer Aktivierung des adrenergen Systems. Als Folge dieser chronischen Aktivierung von maladaptiven Mechanismen kommt es zum kardialen Remodeling, also zu strukturellen und funktionellen Veränderungen, die zur Verschlechterung und Progress der HI beitragen (7).

Das Repertoire an Medikamenten, die derzeit zur Behandlung einer HI (HFrEF) zugelassen sind, umfasst die Inhibition der neuroendokrinen Aktivierung durch ACE-Hemmer und Aldosteronantagonisten. Die Senkung des myokardialen Sauerstoffverbrauchs kann medikamentös durch Substanzen wie Betablocker, die Kontraktilität des Herzens steigern und die Herzfrequenz senken erreicht werden. Medikamente zur Senkung der Vorlast, beispielsweise Schleifendiuretika, kommen ebenfalls zum Einsatz (8). Ziel der HI-Therapie ist es neben der Beseitigung der Ursache – sofern beherrschbar – eine Kontrolle der Symptome zu erreichen und durch Unterbrechung des Circulus Vitiosus und geeignete Pharmakotherapie die Prognose der Patienten zu verbessern (8).



**Abbildung 2** **Circulus Vitiosus der HI.** Durch die HI kommt es zu einer chronischen Aktivierung der im physiologischen Zustand protektiven Mechanismen, wie der Aktivierung der neurohumoralen Achse und des adrenergen Systems. Diese führen zu einer weiteren Schädigung des Myokards und zum Progress der HI. Schema adaptiert von Booth et al. (6). Zeichnung Herz: Sci vis to.

### 5.1.2 HI als Folge mitochondrialer Dysfunktion

Die Ursachen für eine HI sind vielfältig. Jedoch konnte in den vergangenen Jahren gezeigt werden, dass Mitochondrien eine wesentliche Rolle bei ihrer Entwicklung und im Krankheitsprogress spielen (7,9). Bei Patienten mit HI zeigt sich neben einem energetischen Defizit in Kardiomyozyten (10), eine Dysregulation in der Verwertung von energieliefernden Substraten und Metaboliten (11). Zudem ist das Niveau von oxidativem Stress erhöht (12). Weiterhin gibt es Hinweise auf Veränderungen im Kalziummetabolismus des Mitochondriums (13). Aus dieser Kombination an Veränderungen im Mitochondrium, die in direkter Wechselwirkung mit dem Metabolismus der Kardiomyozyten stehen, folgt ein Umbau des Myokards und eine voranschreitende kardiale Dysfunktion (7).

Derzeit gibt es weder für die Therapie der HI noch für eine der anderen Erkrankungen zugelassene Substanzen, die explizit in den mitochondrialen Metabolismus eingreifen. Die Identifikation pharmakologischer Targets im Mitochondrium ist daher in den Fokus der Forschung gerückt. Erste Ansätze sind die Verminderung vom Anfall reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) oder das Abfangen dieser, aber auch einzelne zentral im Mitochondrium stehende Moleküle, wie Cardiolipine sind Gegenstand aktueller Forschung (13). Wie zentral die Erforschung von Mitochondrien als pharmakologischem Angriffspunkt ist, zeigt auch, dass neben der HI nach derzeitigem Kenntnisstand auch neurodegenerative Erkrankungen mit Veränderungen im Stoffwechsel der Mitochondrien einherzugehen. Auch bei Typ 2 Diabetes mellitus, einer weiteren Volkskrankheit in unserer westlichen Welt, scheinen Mitochondrien in der Genese involviert zu sein (13).

## 5.2 Mitochondrien

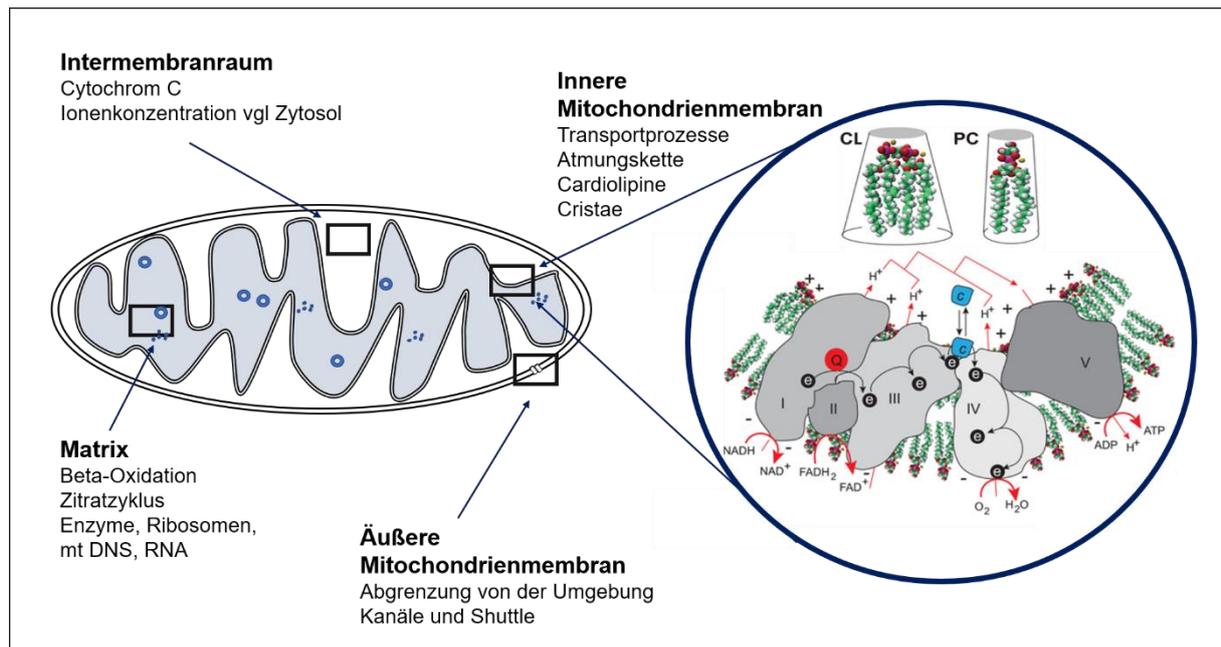
Die 0,5-1 µm großen Zellorganellen wurden 1886 vom Pathologen Richard Altmann erstmals beschrieben. Mitochondrien kommen in allen eukaryontischen Zellen mit Ausnahme von Erythrozyten vor (14). Primär werden Mitochondrien maternal vererbt. Mittels eigener DNS kann das Mitochondrium einen Teil, der für seine Funktion notwendigen Proteine selbst synthetisieren. Innerhalb der Zelle können die Mitochondrien einzeln oder netzwerkartig angeordnet sein, ihre Vermehrung erfolgt durch Sprossung oder Teilung (15). Mittels einer Membran bestehend aus einer Doppellipidschicht, grenzen sie sich vom Zytosol ab. Mitochondrien gelten im Volksmund als Kraftwerke der Zelle, da sie in zahlreichen Prozessen der Energiegewinnung involviert sind. Heute ist bekannt, dass Mitochondrien in der Zelle außerdem bei der Induktion von Apoptose, in der Kalziumhomöostase, beim Abbau von Fettsäuren, bei der Synthese von Ketonkörpern und in der Häm Synthese eine wichtige Funktion einnehmen (16).

Über zahlreiche Poren, Kanäle und Transportproteine befinden sich Mitochondrien im ständigen Austausch mit dem Zytosol (16). Durch die mitochondrienassoziierte Endoplasmatische-Retikulum-Membran, steht das Mitochondrium zudem in engem Kontakt mit dem Endoplasmatischen Retikulum. Hierüber findet der Austausch von Lipiden sowie Signaltransduktion statt. Der Abbau von defekten Mitochondrien erfolgt über das Endoplasmatische Retikulum (ER), Lysosomen oder den Golgi-Apparat

Der Aufbau des Mitos hat eine Unterteilung in vier Kompartimente zur Folge, die verschiedene Funktionen erfüllen (17). Die äußere Mitochondrienmembran dient zur Ab-

grenzung vom Zytosol. Sie besteht vorwiegend aus Phospholipiden (PL) und ist durchsetzt von Proteinen, die als Kanäle und Porine fungieren. Ionen und kleine Moleküle können so in den Intermembranraum gelangen. Weiterhin befindet sich im Intermembranraum Cytochrom c. In der Atmungskette fungiert es als Elektronentransporter. Kommt es zur Schädigung des Mitochondriums, gelangt Cytochrom c ins Zytosol. Dadurch wird die Apoptose der betreffenden Zelle induziert. In der Matrix, die von der inneren Mitochondrienmembran (IMM) umschlossen wird, befindet sich die mitochondriale DNS, mitochondriale Ribosomen, tRNA und zahlreiche Enzyme. Mit der Beta-Oxidation und dem Citratzyklus finden hier wichtige Schritte der zellulären Energiegewinnung statt. In der IMM befinden sich die Komplexe der Atmungskette sowie zahlreiche Translokasen, die dem Proteintransport dienen (18).

Eine wichtige Besonderheit in der IMM, die cristaeförmig aufgebaut ist, ist das exklusive Vorkommen des Phospholipids Cardiolipin (CL). CL unterscheidet sich von den meisten PL darin, dass es vier ungesättigte Fettsäuren aufweist und so insgesamt trapezartig geformt ist (Abbildung 3). Aus dieser speziellen räumlichen Konfiguration der CL, ergeben sich die Einstülpungen der IMM, die eine enorme Oberflächenvergrößerung bewirken und so beispielsweise ausreichend Platz für die Komplexe der Atmungskette schaffen und gleichzeitig räumlichen Abstand dieser zueinander ermöglichen (13). Aktuelle Forschung zeigt, dass Cardiolipine weitaus mehr als die Strukturgeber der IMM sind (s. Kapitel 5.3).



**Abbildung 3 Das Mitochondrium und seine Kompartimente.** Kompartimente und Schlüsselfunktionen des Mitochondriums. Im Kreis abgebildet ist Assoziation der cristae-bildenden trapezförmigen CL und den Komplexen der Atmungskette zu sehen. (19), Teile der Abbildung adaptiert von Saric et al. (20)

Die Energiegewinnung im Mitochondrium erfolgt in einem mehrschrittigen Prozess. Nach dem Abbau von energieliefernden Substraten, beispielsweise Fettsäuren, Glucose oder Ketonkörpern, im Zytosol erfolgt der Transport dieser Zwischenprodukte in das Mitochondrium. Hier wird Pyruvat aus der Glykolyse zu Acetyl-CoA umgewandelt (21). Aus den im Zytosol abgebauten Fettsäuren wird ebenfalls Acetyl-Co A. Dies wird in die Matrix des Mitochondriums transportiert und in den Citratzyklus eingespeist (21). Durch eine Reihe chemischer Reaktionen, wird das Acetyl Co A zu den Redoxäquivalenten  $\text{NADH} + \text{H}^+$  und  $\text{FADH} + \text{H}^+$  konvertiert (21). Zudem entsteht ein Molekül Adenosintriphosphat (ATP) sowie  $\text{CO}_2$ . Die Elektronengeber  $\text{NADH}_2$  und  $\text{FADH}_2$  werden weiter an die IMM transportiert, wo die Enzyme der Atmungskette lokalisiert sind (21). Die Atmungskette besteht aus fünf Komplexen (I-V), den elektronentransportierenden Coenzym Q (Ubiquinon) sowie Cytochrom c als Elektronenfänger und Protonenpumper (21). Hier erfolgt die Übertragung der Elektronen von Komplex I auf Komplex II, die Succinat-Dehydrogenase. Die von Komplex II übertragenen Elektronen werden durch Komplex III, Cytochrom c und anschließend zu Komplex IV, die Cytochrom c-Oxidase übertragen. Komplex IV nimmt ein Elektron nach dem anderen auf und gibt immer vier davon an ein Sauerstoffmolekül ab, wodurch Wasser, der finale Akzeptor der Elektronen entsteht. Die Atmungskette generiert einen Fluss an Elektronen, der wiederum

den Transport von Protonen ( $H^+$ ) über die IMM in den Intermembranraum ermöglicht (21). So entsteht ein elektrochemischer Protonengradient. Die ATP-Synthase, auch als Komplex V bezeichnet, nutzt diesen Gradienten, um daraus ATP herzustellen. Damit die ATP-Synthase effizient arbeiten kann, ist eine ausreichende Versorgung der Zelle mit Sauerstoff notwendig (22). Das im Rahmen der Atmungskette generierte ATP kann nun von anderen Organellen oder Enzymen der Zelle als Energiesubstrat genutzt werden. Lokal kann somit unter Abspaltung eines Phosphatrestes von ATP Energie freigesetzt werden. Diese wiederum wird für die Kontraktion und Relaxation von Herzmuskelzellen sowie für zahlreiche aktive Transportvorgänge in der Zelle, für Syntheseprozesse und für Bewegung im Zytoskelett benötigt.

Das Mitochondrium steht mit seiner Funktion, Energie bereitzustellen im Zentrum zellulärer Aktivität. Eng mit der Energiegewinnung verwoben sind als essenzieller Bestandteil mitochondrialer Membranen die CL, auf die im Folgenden näher eingegangen wird (19).

### 5.3 Cardiolipine

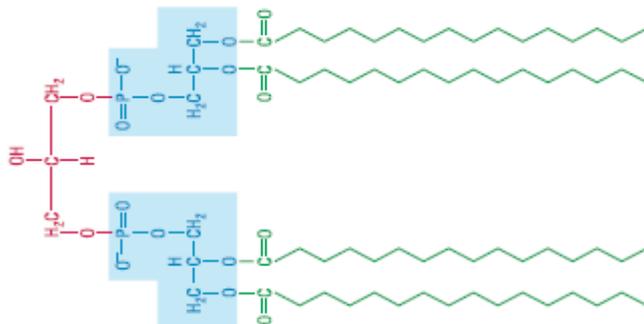
Biomembranen trennen eine Zelle oder ein Zellorganell, wie beispielsweise das Mitochondrium von ihrer Umgebung ab. So können elektrochemische Gradienten aufrechterhalten werden und selektiver Transport von Molekülen wird möglich. Grundbestandteil von Biomembranen sind Lipide, auch Proteine sind in die Membran integriert. In Biomembranen verankert sind verschiedenste Transportproteine, Enzyme und Rezeptoren. Je nach Lokalisation unterscheidet sich die Zusammensetzung der Membran. Ein essenzieller Bestandteil von Biomembranen sind die PL. Im Vergleich zu anderen Biomembranen unterscheiden sich die der Mitochondrien durch ein geringeres Phospholipid-zu-Protein-Verhältnis (23). In der mitochondrialen Biomembran kommen Sterole und Sphingolipide seltener vor, während die Konzentration von Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin deutlich höher ist (23).

Besonders geprägt wird die Biomembran von Mitochondrien durch das Vorkommen eines speziellen Phospholipids – dem CL (24). Erstmals 1942 aus Rinderherzen isoliert (25), machen Cardiolipine 15 bis 20% aller PL (13) in der IMM (26) aus. In geringerer Konzentration finden sie sich in der äußeren Mitochondrienmembran (26). Besonders reichlich kommen CL an den Kontaktstellen zwischen IMM und äußerer

Mitochondrienmembran vor (27). Aufgrund ihres hohen Anteils an ungesättigten Fettsäuren, beeinflussen CL die räumliche Konfiguration der inneren Mitochondrienmembran maßgeblich (s. Abbildung 6).

### 5.3.1 Biosynthese und Remodeling von Cardiolipinen

CL-Moleküle werden auch als Diphosphatidylglycerol bezeichnet denn, sie bestehen aus einem Glycerolrückgrat, an das zwei Phosphatidylreste gebunden sind. An diese sind jeweils zwei Acylketten gebunden. Im Gegensatz zu anderen PL, die vorwiegend im ER synthetisiert und von dort ins Mitochondrium transportiert werden, erfolgt die finale Konfiguration der CL überwiegend in der IMM (s. Abbildung 4).



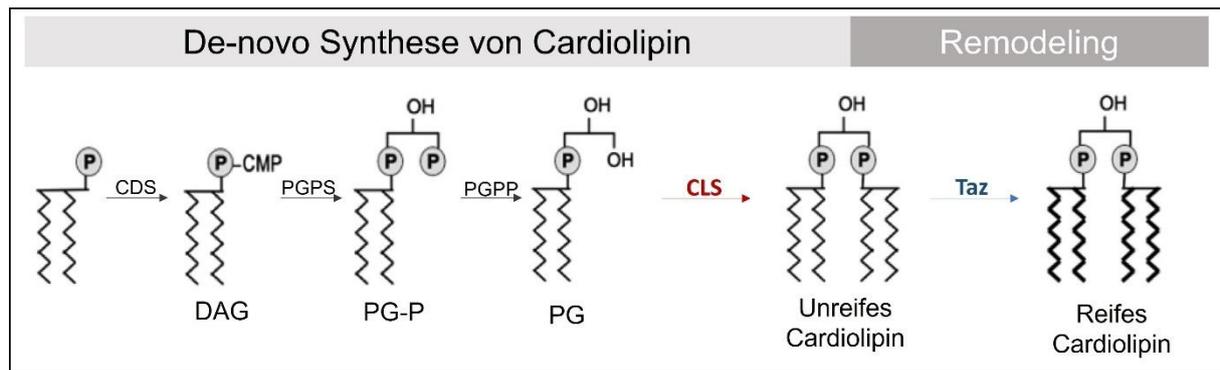
**Abbildung 4 Grundstruktur CL.** Rot: Glycerolrückgrat, Blau Phosphatidyl, Grün Acylketten. Cardiolipine können sich in ihrer Acylkettenkonfiguration voneinander unterscheiden. Sowohl die Kettenlänge als auch die Anzahl der Doppelbindungen sind variabel. Abbildung aus Löffler Biochemie (28)

In der äußeren Mitochondrienmembran und dem ER beginnt die Synthese. Dort wird aus Glycerophosphat durch zwei enzymatische Reaktionen Phosphatidsäure hergestellt (29). Diese wird durch den Intermembranraum an die IMM transportiert. Nun erfolgt die Umwandlung von Phosphatidsäure zu Cytidinphosphat-Diacylglycerol (CDP-DAG) durch die CDP-Diacylglycerolsynthase (29). Die Phosphatidylglycerolphosphat-Synthase verbindet CDP-DAG und Glycerol-3-Phosphat zu Phosphatidyl-glycerol-3-Phosphat (PGP) (29). Nun erfolgt eine Dephosphorylierung durch die PGP-Phosphatase, wodurch Phosphatidylglycerol (PG) entsteht. Durch die Kondensation von CDP-DAG mit PG durch die CLS (29), entsteht unreifes CL (s. Abbildung 5).

Für die Funktionalität des CL, ist das anschließende Remodeling des unreifen CL-Moleküls durch das Enzym Tafazzin (Taz) essenziell (29). In einem Prozess aus Deacetylierung und Reacetylierung werden die gesättigten Fettsäuren ausgetauscht

und durch ungesättigte Fettsäuren ersetzt. Zudem werden die ungesättigten Fettsäuren so angeordnet, dass sie symmetrisch und mit möglichst geringen Wechselwirkungen zueinander im Raum stehen (30). Am Ende des Modifikationsprozesses steht ein CL-Molekül, welches ein charakteristisches Muster an Fettsäuren enthält. Im Herzen von Säugetieren sind Tetralinolen-Cardiolipine, also Cardiolipine mit vier Linol-Resten und insgesamt acht Doppelbindungen, die vorherrschende Form (23). Dies variiert jedoch von Gewebe zu Gewebe (23). Der Abbau von reifem Cardiolipinen erfolgt durch schrittweise Deacetylierung über Monolysocardiolipin und Dilyso-Cardiolipin, katalysiert durch Phospholipase A2 (29) Beeinflusst wird die Syntheserate von CL durch PGS1. Dieses Enzym spielt auch eine wichtige Rolle in der Regulation der Biosynthese von Mitochondrien (31). Außerdem scheint die ATP-Zitrat-Lyase die CL-Syntheserate zu beeinflussen (32). Dieses Enzym wandelt hauptsächlich im Zytsol aus dem Kohlenhydratabbau stammendes Citrat in Acetyl-CoA um (32).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich sowohl mit dem letzten Syntheseschritt von Phosphatidylglycerol zu unreifem CL, durchgeführt vom Enzym CLS, als auch mit dem Remodeling-Enzym Taz. Die CLS transferiert eine Phosphatidylgruppe von Cytidindiphosphat auf ein Phosphatidylglycerol-Molekül. So entsteht unreifes Cardiolipin (23). Die Umsetzung von Phosphatidylglycerol zu unreifem CL durch CLS ist hierbei so effizient, dass in der Mitochondrienmembran nur in geringen Mengen Phosphatidylglycerole vorkommen (33). Wenngleich keine weitere Funktion von Taz neben dem Fettsäureaustausch von PL und Lysophospholipiden bekannt ist (34), so gibt es dennoch keine Evidenz dafür, dass Taz substratspezifisch agiert. Studien deuten darauf hin, dass neben Taz verschiedene Proteinkomplexe am CL-Remodeling beteiligt sind und die Umgebung der IMM das spezifische CL-Remodeling triggert (23). Prohibitine sind Proteine, die in der IMM große Komplexe bilden und dort eine Rolle in der Homöostase der PL spielen. Der Knockdown (KD) des Prohibitin-Gens in Fibroblasen von Mäusen führt zu einer Veränderung der CL-Zusammensetzung (35). MICOS (Mitochondrial Contact Site and Cristae Organizing System) sind große, aus verschiedenen Proteinen bestehende Regionen in der inneren Mitochondrienmembran, die nahe den Verbindungsstellen von IMM und äußerer Mitochondrienmembran vermehrt auftreten (36). MICOS tragen außerdem zur Formation der Cristae bei (37). Studien konnten zeigen, dass die Stabilität der MICOS Komplexe die Aktivität von Taz beeinflusst und somit indirekt Einfluss auf die Komposition der CL hat (37,38).



**Abbildung 5** Syntheseschritte und Remodeling von Cardiolipin in der inneren Mitochondrienmembran. PS – Phosphatidsäure; DAG – Diacylglycerol, PG-P – Phosphatidylglycerophosphat; PG – Phosphatidylglycerol; CDS – CDP DAG-Synthase, PGPS – PG-P-Synthase, PGPP – PG-P-Phosphatase, CLS – Cardiolipinsynthase, TAZ – Tafazzin. Abbildung adaptiert von Chicco und Sparagna (29)

### 5.3.2 Funktionen von CL

Damit das Mitochondrium seiner Hauptaufgabe – der Energiegewinnung durch oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) – nachkommen kann, ist eine konstante Zufuhr an Substraten aus dem Zytosol notwendig. Weitere Stoffwechselfvorgänge im Mitochondrium, wie der Citratzyklus, die Oxidation von Fettsäuren, die Synthese und der Abbau von Aminosäuren, die Häm-Synthese und die Herstellung von Eisen-Schwefelverbindungen sind ebenfalls nur möglich, wenn die Substrate hierfür aus dem Zytosol durch Carrier-Proteine in das Mitochondrium gelangen. Studien legen nahe, dass CL wesentlich zur Funktion dieser Carrier beitragen (39,40).

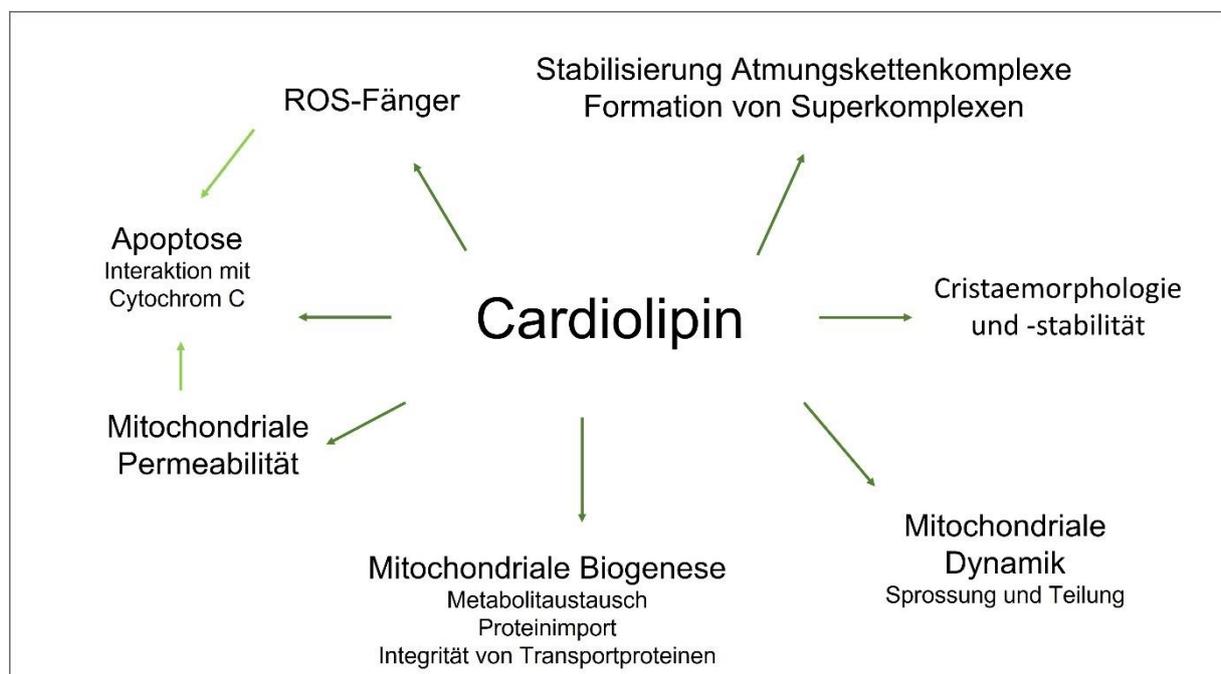
Auf Ebene der Atmungskette interagieren CL mit den einzelnen Komplexen dieser. Hierbei weisen die Komplexe I, III und IV eine unterschiedliche Anzahl an spezifischen CL-Bindungsstellen auf (41,42). Die Bindung der CL ist hierbei essenziell für die Funktionalität und Stabilität der einzelnen Komplexe (43).

Weiterhin sind CL an der Bildung von Superkomplexen, den Respirasomen beteiligt. Hier gewährleisten CL Stabilität und Funktionalität (44,45). Die Respirasomen befinden sich in der IMM und bilden ein Zusammenschluss aus Komplexen der Atmungskette in variierender Anzahl (46,47). Durch die räumliche Nähe wird ein effektiver Elektronentransport möglich und die Entstehung von Sauerstoffradikalen (ROS) verringert.

Durch den Transfer von Elektronen in der Atmungskette sind Mitochondrien Orte, an denen konstant reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen (48). CL fungieren einerseits aufgrund ihrer räumlichen Nähe zum Entstehungsort der ROS, als auch aufgrund

ihrer ungesättigten Fettsäuren als ROS-Fänger. Die Oxidation von CL beeinflusst wiederum zahlreiche Proteine in der Zelle, nicht zuletzt die Komplexe I, III und IV der Atmungskette (49,50). Liegen oxidierte CL in zu großer Menge vor, werden diese in die äußere Mitochondrienmembran transferiert. Dort werden sie zur Bindungsplattform für Caspasen, die an der Induktion des programmierten Zelltods beteiligt sind (51,52). Zudem führt die Oxidation von CL zur Öffnung von mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Poren. Dies ermöglicht die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium ins Zytosol und damit einhergehend die Induktion von Apoptose (53). Aus der Untersuchung isolierter Mitochondrien ist bekannt, dass nahezu alle CL in der Mitochondrienmembran mit Protein(-komplexen) in Verbindung stehen (54,55) und diese so vor verfrühtem Abbau geschützt sind (55)

Nicht zuletzt sind CL entscheidend in die mitochondriale Dynamik involviert. Sie interagieren mit einer Reihe an Proteinen, die die Teilung oder Vernetzung der Mitochondrien bewirken. Die CL-Konfiguration mit der Länge der Acylreste und deren Sättigungsgrad hat direkte Auswirkung auf das Sprossungs- und Teilungsverhalten der Mitochondrien (56,57).



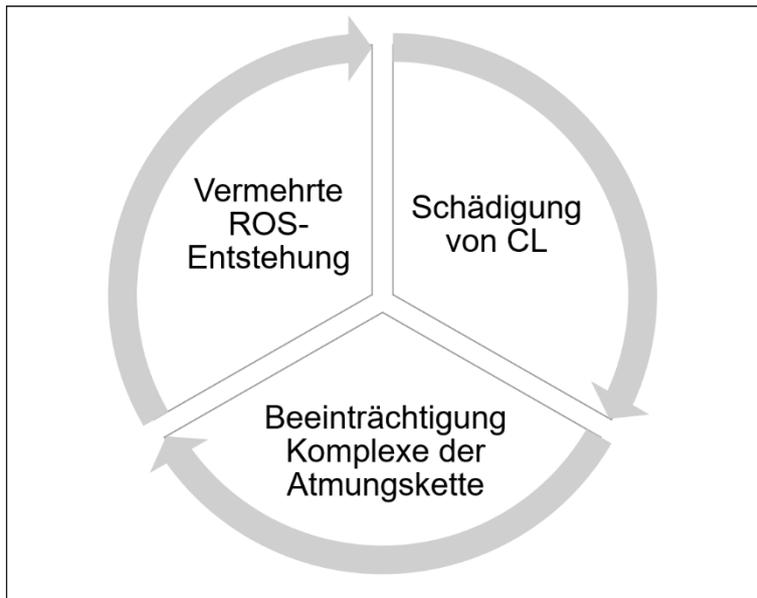
**Abbildung 6 Funktionen von CL.** Cardiolipine sind auf vielgestaltige Weise in die Funktion und Dynamik des Mitochondriums involviert. Abkürzungen: ROS – reaktive Sauerstoffspezies, Adaptiert von Paradies et al.(39)

### 5.3.3 Cardiolipine als Ursache für Erkrankungen

Aufgrund ihrer zahlreichen regulatorischen Funktionen im Mitochondrium sind Abweichungen im CL-Metabolismus eng verknüpft mit mitochondrialer Dysfunktion. Der Veränderung des CL-Metabolismus kann beispielsweise eine verringerte Biosynthese zugrunde liegen, die auf mangelnde Aktivität der an der Synthese beteiligten Enzyme zurückzuführen ist. Dies führt zu einer verringerten Gesamtmenge an CL. Auch Störungen des Remodeling, was eine veränderte Komposition der Acylketten in den reifen CL zur Folge hat, kann zu mitochondrialer Fehlfunktion führen (58). Ein erhöhtes Aufkommen von reaktiven Sauerstoffspezies führt zur Peroxidation der CL und damit vermehrt zu Apoptose (39).

Mit dem Barth Syndrom wurde 1983 (58) erstmals eine Krankheit beschrieben, bei der ein genetisch bedingtes Defizit an reifen CL ursächlich für eine Reihe von Störungen ist. Die Mutation im Taz-Gen, welches sich auf dem X-Chromosom befindet, führt zu einem verringertem Remodeling von CL. So ist im Verhältnis viel Monolysocardiolipin vorhanden, wobei die Konzentration an reifem CL gering bleibt. Durch die X-chromosomale Erkrankung leiden die Betroffenen unter Wachstums- und Gedeihstörungen, dilatativer Kardiomyopathie, Schwäche der Skelettmuskulatur und eine gestörte Immunantwort als Folge eines Mangels an neutrophilen Granulozyten (58). Es wird angenommen, dass ein Großteil der Embryonen, die eine Tafazzin-Mutation aufweisen, nicht lebensfähig sind und bereits intrauterin versterben (59)

Auch der Myokardinfarkt als akutes Ereignis, führt unmittelbar zu lokalen Veränderungen im CL -Haushalt. Studien an Ratten konnten zeigen, dass sowohl die Ischämiephase als auch die Reperfusion zu einem Verlust von CL führen (13). Entscheidend ist hierbei die lokale Anhäufung von ROS und der dadurch entstehende, sich selbst verstärkende Kreislauf (s. Abbildung 7) aus Oxidation der CL und Destabilisierung der Atmungskettenkomplexe der zu weiterem ROS-Anfall und Schließlich zur irreversiblen Schädigung von Kardiomyozyten führt (13).



**Abbildung 7 Circulus Vitiosus:** Die Entstehung von ROS führt zu Schädigung von Cardiolipinen, was sich wiederum auf die Funktionalität der Atmungskette auswirkt. Sind die Komplexe der Atmungskette nicht ausreichend stabilisiert kommt es wiederum zum erhöhten Anfall von ROS (13).

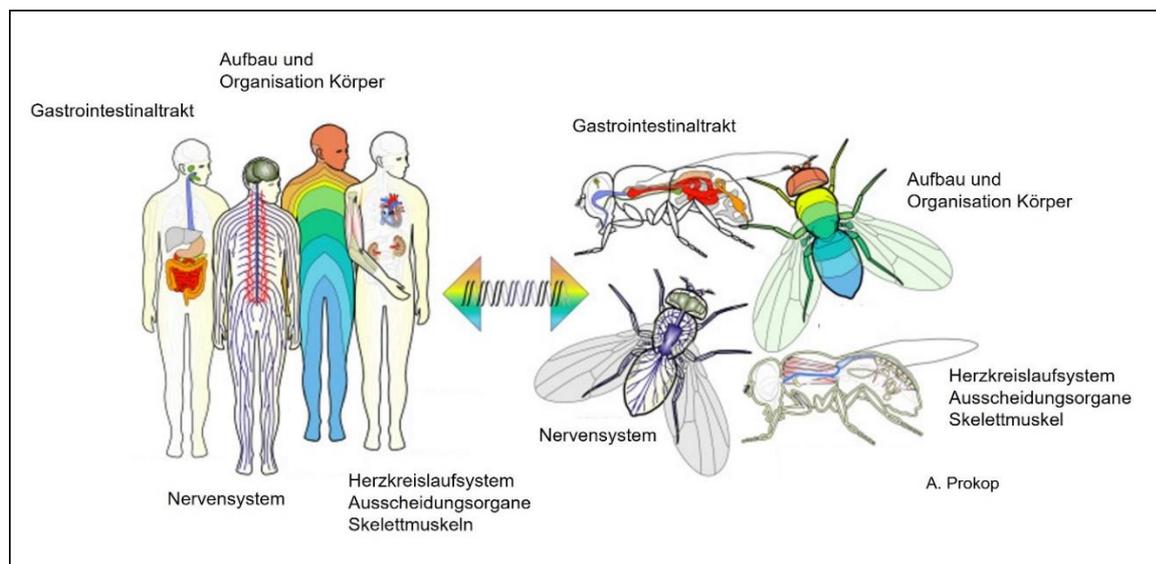
Erkrankungen wie das Barth Syndrom, aber auch Volkskrankheiten wie die HI haben gemein, dass sie bislang nicht kurativ behandelt werden können. So verschieden die Genese beider Erkrankungen auch ist, so sind in beiden Fällen Veränderungen im CL-Haushalt, in der Entstehung der Krankheit und deren Progress involviert. Bislang gibt es keine regulär zugelassenen Therapeutika, die CL direkt adressieren. Mit der steigenden Zahl an Patienten, die an HI erkranken und dem Wissen, dass CL in die Genese von weit mehr als nur kardialen Erkrankungen involviert sind, ergibt sich der Bedarf weiterer Grundlagenforschung in diesem Bereich. *Drosophila melanogaster* hat sich in den vergangenen Jahrzehnten in Ergänzung zu Modellen mit Vertebraten als exzellentes Modell in der Grundlagenforschung, auch insbesondere als Modell für kardiovaskuläre Erkrankungen bewiesen. Überdies ist der Prozess der CL-Synthese und des CL-Remodeling in der Fruchtfliege zum Menschen konserviert (60). Daher eignet sich *Drosophila* hervorragend, um die Auswirkungen eines CL-Defizites auf das Herz zu untersuchen.

#### 5.4 Der Modellorganismus *Drosophila melanogaster*

Im Umgang zeichnen sich Fruchtfliegen für Forschende unter anderem durch eine einfache Haltung und eine kurze Generationendauer aus. Funktionell gibt es im Aufbau des Herzkreislauf-Systems und des Gastrointestinaltraktes große Ähnlichkeit zum Menschen. Auch die Innervation der Fliege erfolgt, wie beim Menschen, ausgehend

von einem Zentralnervensystem (s. Abbildung 8). Trotz ihres lediglich aus vier Chromosomenpaaren bestehenden Chromosomensatzes, weist *Drosophila* große Ähnlichkeit zum Menschen auf: 60% der humanen Gene verfügen über ein Ortholog in *Drosophila*, ebenso wie 75% der Krankheiten verursachenden Gene (61).

In den vergangenen einhundert Jahren hat *Drosophila melanogaster* als Forschungsorganismus große Bedeutung erlangt. Anfänglich diente *Drosophila* zur Untersuchung von Vererbung. Heute ist die Fruchtfliege ein vielfältig eingesetztes Modell, unter anderem in der Erforschung neuer Signalwege und der Embryogenese. Auch als Krankheitsmodell und in der Erforschung von Alterungsprozessen ist *Drosophila* von großer Bedeutung (62). Die Vorteile im Umgang mit *Drosophila* führten dazu, dass es eine Vielzahl spezifischer, für die Fruchtfliegen entwickelte Forschungsmethoden gibt, weshalb *Drosophila* heute zu den besterforschten Organismen zählt. Bereits sechs Nobelpreise für Medizin sind aus der Arbeit mit Fruchtfliegen hervorgegangen (63). Zahlreiche in *Drosophila* entdeckte Mechanismen lassen sich im Menschen wiederfinden. Durch die Grundlagenforschung an Organismen wie *Drosophila* wird ein besseres Verständnis von komplexen Systemen, wie dem menschlichen Organismus erst möglich. Es gibt daher heutzutage kaum einen Forschungsbereich, in dem *Drosophila* keine Verwendung findet.



**Abbildung 8 Parallelen zwischen *Drosophila* und dem menschlichen Körper.** Wenngleich der Mensch und die Fruchtfliege auf den ersten Blick nichts gemein haben, so ergeben sich auf genetischer Ebene, aber auch im Aufbau der Organsysteme, erstaunliche Ähnlichkeiten. 60 % der humanen Gene haben ein Äquivalent in der Fruchtfliege. Beide Organismen verfügen über ein Zentralnervensystem. Im Aufbau von Gastrointestinaltrakt, Nervensystem, des Herz-Kreislaufsystems, der Skelettmuskeln und der Ausscheidungsorgane finden sich zahlreiche Parallelen. Zeichnung: A. Prokop, Abbildung adaptiert von Manchester Fly Facility 2015 (64)

## 5.5 *Drosophila* Herz und Zirkulationssystem

Das Herz von *Drosophila* besteht aus 84 Kardiomyozyten (65). Wie auch im Menschen sind die Kardiomyozyten als funktionelles Synzytium über Zell-Zell-Verbindungen miteinander in engem Kontakt (66). Für die Kontraktion und Relaxation des Fliegenherzens sind wie auch beim Menschen die Myofilamente Aktin, Myosin und Tropomyosin von zentraler Bedeutung (66).

Optisch ähnelt das Fliegenherz eher einem Schlauch als dem Herzen eines Vertebraten. Jedoch gibt es, sowohl in der embryonalen Entwicklung des Zirkulationssystems, als auch bei den Genen, die zur Spezifikation und Differenzierung des Herzens beitragen, zahlreiche Parallelen und konservierte Prozesse zum menschlichen Herzen (67,68).

Der Herzschlauch wird von einem Fettkörper im dorsalen Abdomen umgeben (69). Nach kranial geht er in die thorakale Aorta über (Abbildung 9). Am Übergang von Abdomen zu Thorax befindet sich mit der konischen Kammer der Teil des Herzschlauchs mit dem größten Durchmesser. Von den insgesamt 84 Kardiomyozyten des *Drosophila*-Herzens sind 58 kontraktile Kardiomyozyten (Abbildung 9). Je zwei sich gegenüberliegende, halbmondförmige Kardiomyozyten formen das Lumen (69). Die charakteristische Form der Kardiomyozyten ist auf die zirkulär angeordneten Myofilamente (66) in ihrem Inneren zurückzuführen. Durch fünf Paar einander gegenüberliegender Ostienzellen, die wie Ventile funktionieren, gelangt die Hämolymphe in den Herzschlauch, von wo aus sie weiter in die Aorta transportiert wird (66). Drei Paare einander gegenüberliegende rundlichen Kardiomyozyten ragen in das Lumen des Herzschlauches und fungieren so als Klappen. Durch sie kann der Fluss der Hämolymphe gerichtet erfolgen. Anhand der Klappen kann der Herzschlauch zudem in vier Segmente unterteilt werden (70,71).

Eine extrazelluläre Matrix umgibt das Herz netzartig (69) und dient seiner Integration in die Umgebung, sowie der Kommunikation und dem Nährstoffaustausch mit umliegenden Zellen. Sie besteht aus dem kollagenähnlichen Perikardin, Kollagen IV und Laminin B1 (72). In direkter Nähe des Herzens finden sich die Perikardialzellen. Auch sie sind durch die Extrazellulärmatrix mit dem Herzen in Verbindung. Perikardialzellen dienen der Filtration von Giftstoffen aus der Hämolymphe (73) vor Eintritt in den Herzschlauch. Für die Funktion und Lage des Fliegenherzens sind zwei Muskeln für *Drosophila* essenziell: Die Alarmuskeln verbinden das Herz über Fasern extrazellulärer

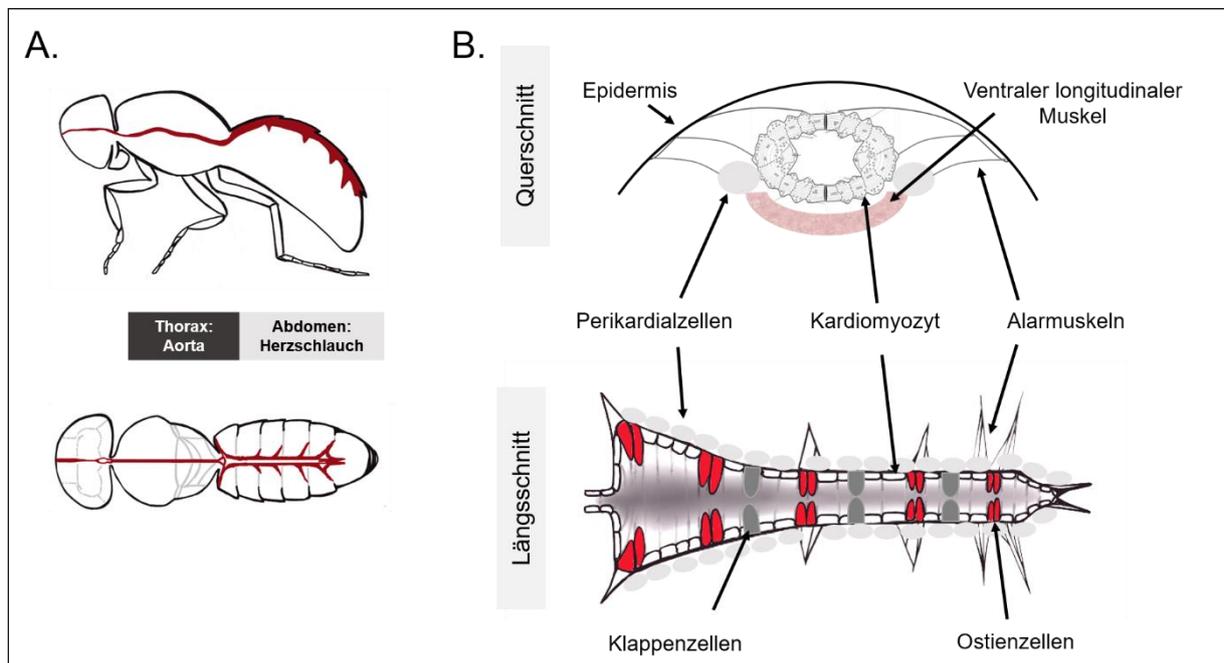
Matrix (69) mit der Kutikel der Fliege. Dadurch wird der Herzschlauch aufgespannt und in Position gehalten. Dies ermöglicht insgesamt eine flexible und elastische Verbindung zwischen dem sich bewegenden Herzschlauch und seiner muskulären Aufhängung (66). Dem Herzschlauch liegt ventral der ventrale longitudinale Muskel (69) auf. Bislang ist lediglich bekannt, dass der ventrale longitudinale Muskel den Herzschlauch stützt. Weitere Funktionen sind Gegenstand aktueller Forschung (69).

Die Innervation des Fliegenherzens und der Alarmmuskeln erfolgt segmental von den thorakalen Ganglien ausgehend (74). Weiterhin gibt es zwei Schrittmacherzentren, die die Herzaktion beeinflussen können. Eines befindet sich kranial, nahe der konischen Kammer und eines am kaudalen Ende des Herzschlauches (74). Die Aktionspotentiale im Fliegenherz werden durch Kalzium, statt durch Natrium wie beim Menschen, generiert (75). Die Kalium-Kanäle, die der Repolarisation dienen, sind vergleichbar mit denen im Menschen (76,77). Die für die kardiale Kalziumhomöostase essenzielle Sarkoendoplasmatische-Retikulum-Kalzium-ATPase (SERKA) zeigt signifikante Ähnlichkeit zur SERKA des Menschen (78).

Der Transport der Hämolymphe erfolgt überwiegend von posterior (79), durch den kontraktile Herzschlauch nach anterior in die nicht kontraktile Aorta. In der Relaxationsphase öffnen die Ostien und die Hämolymphe strömt in den Herzschlauch (80). Im Verlauf der Kontraktion schließen die Ostienzellen passiv, einem Ventil ähnelnd. Die Hämolymphe wird durch die Klappenzellen gerichtet kopfwärts transportiert. Nachdem sie durch die Aorta gepumpt wird, fließt sie frei durch die Körperhöhle der Fliege und versorgt so die Organe der Fliege. Eine Reihe von Strukturen unterstützen die Versorgung des Körpers mittels Hämolymphe: Dazu gehören die Muskeln der Körperwand, sowie die Flügel-, Bein- und Antennenmuskulatur. Sie gewährleisten durch ihre pulsatile Aktivität für lange Organstrukturen wie Flügel und Extremitäten die ausreichende Versorgung mit Hämolymphe (81). Ein wesentlicher Unterschied in der Rolle des Herzens von *Drosophila*, verglichen zum Menschen ist, dass der Sauerstofftransport herz-unabhängig über die malphigischen Schläuche. Sie durchziehen den Fliegenkörper als feines Netzwerk und versorgen den Organismus über Diffusion mit Sauerstoff (82).

*Drosophila* verfügt über ein offenes Zirkulationssystem (69). Deshalb verlaufen Transportprozesse langsamer und der Druck im gesamten System ist geringer als in Organismen mit geschlossenem System (69). Dies führt dazu, dass sowohl die Stoffwechselforgänge, Nährstoffversorgung, die Elimination von Giftstoffen, aber auch der

Energieaufwand des gesamten Systems geringer sind, als bei Spezies mit geschlossenen Zirkulationssystemen, beispielsweise Säugetiere (69).



**Abbildung 9** *Drosophila* Herz und umgebende Strukturen. (A) Lage des Fliegenherzens im Körper von *Drosophila* mit Unterteilung in Aorta und kontraktilem Herzschlauch. (B) Insgesamt besteht das Fliegenherz aus 84 Zellen. Hiervon sind 58 kontraktile Kardiomyozyten. Hinzu kommen fünf Paar sich gegenüberliegende Ostienzellen (rot). Durch sechs Klappenzellen (dunkelgrau), wovon sich je zwei gegenüberliegen, kann der Fluss der Hämolymphe gerichtet erfolgen (66). Zeichnung Fliegenkörper und -herz Sci vis to.

### 5.5.1 Methoden der Herzfunktionsanalyse in *Drosophila*

In den vergangenen Jahren haben sich zahlreiche Forschende mit der Rolle und Messbarkeit der Herzaktion von Fruchtfliegen beschäftigt. Aus diesen Arbeiten sind verschiedene Methoden hervorgegangen, um diese aufzuzeichnen.

Einerseits etablierten mehrere Gruppen elektrophysiologische Techniken, um intrazelluläre Potentiale von Larvenherzen abzuleiten (83). Auch extrazellulär ist die Ableitung von Potentialen (76,84) aus dem Fliegenherzen möglich. Mittels Atomkraftmikroskop wurde die mechanische Arbeit der Herzmuskeln erfasst. So konnten Kaushik und Kollegen zeigen, dass die Kardiomyozyten von *Drosophila* – wie auch beim Menschen – mit zunehmendem Alter steifer werden (85).

Andererseits wurden verschiedene Methoden entwickelt, um den Herzschlag makroskopisch sichtbar zu machen. Ocorr und Kollegen entwickelten die semiautomatische Herzfunktionsanalyse, kurz SOHA (86). Bei dieser Methode wird nach Eröffnung des

Abdomens und Freipräparation des Herzschlauches mittels Hochgeschwindigkeitsvideomikroskopie die Herzaktionen aufgezeichnet. Der Untersucher markiert in den Videoaufnahmen die Herzwände in Systole und Diastole. Die Auswertung erfolgt dann mit einer frei verfügbaren Software. Die durch SOHA erzeugten Videosequenzen sind von hoher Auflösung und ermöglichen dadurch eine sehr genaue Herzfunktionsanalyse.

Eine weitere Methode, die von Wolf und Kollegen entwickelt wurde, nutzt optische Kohärenztomographie (OCT) um das Fliegenherz nichtinvasiv zu untersuchen (62). Das Prinzip des Verfahrens ist vergleichbar mit der Sonografie. Anstelle von Ultraschallwellen wird jedoch Infrarotlicht verwendet. Das Herz wird hier sowohl in Längs- als auch Querrichtung erfasst. Die Stärke dieses Verfahrens liegt darin, dass das Herz am wachen, intakten Organismus untersucht wird, allerdings bei geringerer Bildqualität.

Die jüngste Methode zur Herzfunktionsanalyse wurde von Klassen und Kollegen 2018 publiziert (87). Sie basiert darauf, dass die zu untersuchenden Fliegen ein grünes Fluoreszenzprotein (GFP) in ihren Kardiomyozyten und Muskelzellen exprimieren, welches durch Licht angeregt und unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden kann. Die Bewegungen des fluoreszierenden Herzens werden mittels Hochgeschwindigkeitsvideomikroskopie aufgezeichnet. Die Besonderheit dieser Methodik liegt in der vollautomatischen Auswertung der erfassten Daten und der nichtinvasiven Art der Untersuchung. Diese, auch in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode, zeichnet sich zudem durch ihre hohe Bildqualität aus. Eine genaue Beschreibung der Methode findet sich in Kapitel 7.3.

## 5.6 Zielsetzung der Arbeit

Für die letzten beiden Schritte der Konfiguration von reifem CL wird einerseits die Grundstruktur durch die CLS zusammengesetzt und anschließend durch Deacetylierung und Reacetylierung – durchgeführt durch das Enzym Taz- für die effizienteste Zusammensetzung der Fettsäuren gesorgt. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, ein *Drosophila*-Modell zur Analyse von CL-Defekten und deren Auswirkungen auf die kardiale Funktion der Fruchtfliege zu generieren. Neben Taz, als bereits bekannter Ursache für ein genetisch bedingtes CL-Defizit, sollte zudem die Auswirkung eines CLS-Defizites auf die kardiale Funktion von *Drosophila* untersucht werden. Im Detail sollten im Rahmen dieser Arbeit folgende Fragen adressiert werden:

**A. Welche Auswirkungen hat eine Reduktion von Tafazzin durch genetische Manipulation auf die kardiale Funktion von *Drosophila*?**

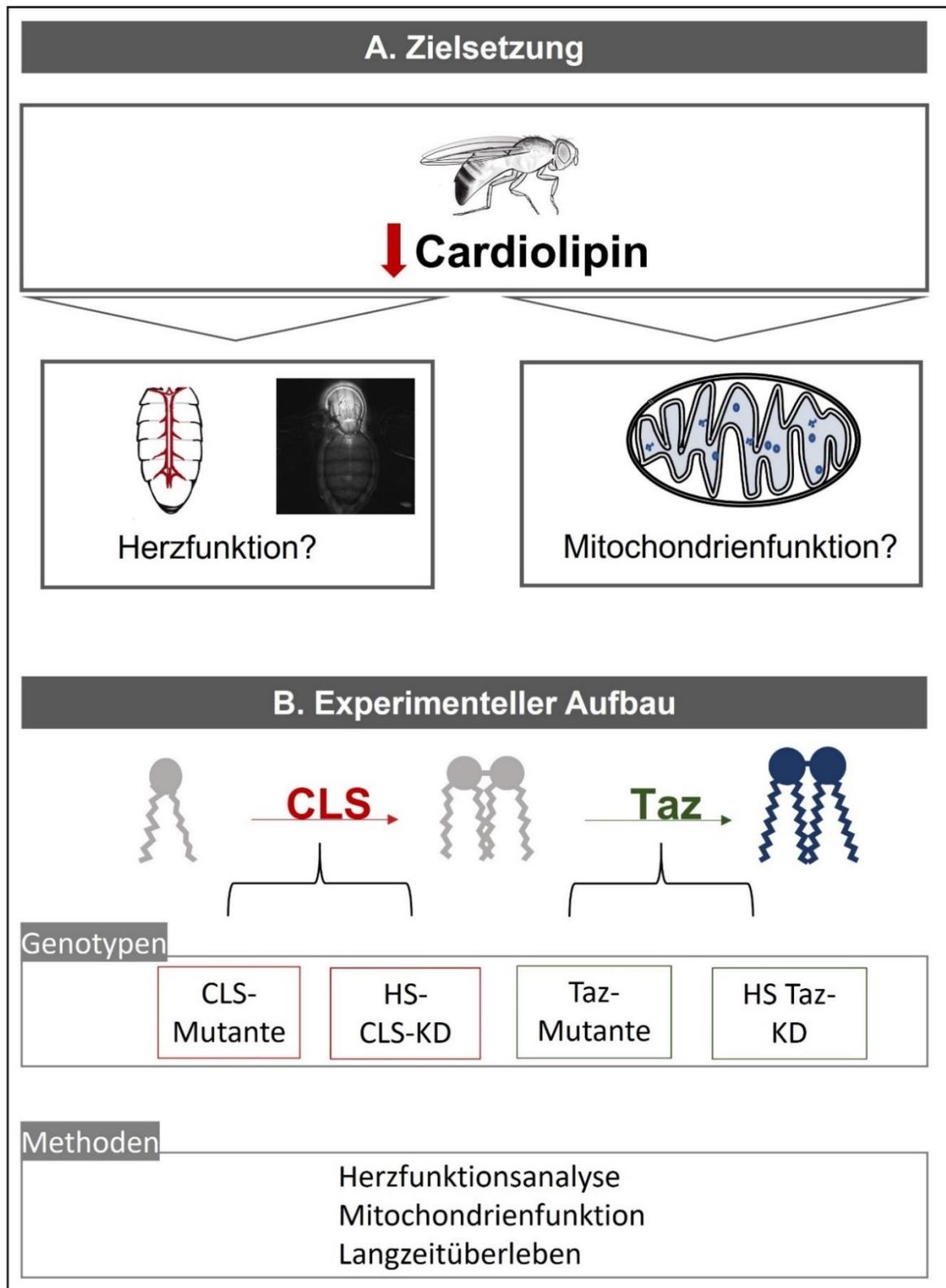
Hierfür wird einerseits ein herzspezifischer Taz-KD generiert und hinsichtlich der Herzfunktion analysiert. Zum anderen erfolgt die Herzfunktionsanalyse einer Taz-Mutante.

**B. Welche Auswirkung hat eine Reduktion von CLS durch genetische Manipulation auf die kardiale Funktion von *Drosophila*?**

Auch hier wird einerseits ein herzspezifischer CLS-KD hinsichtlich seiner Herzfunktion untersucht und andererseits eine CLS-Mutante.

**C. Welche weiterführenden Charakteristiken weisen CLS-Defizitäre *Drosophila* auf? Welche Rolle hat CLS insgesamt im CL-Metabolismus?**

Da im Vergleich zu Taz wesentlich weniger über die Rolle von CLS für Mitochondrien und Kardiomyozyten bekannt ist, sollte im Rahmen dieser Arbeit eine weitere Charakterisierung CLS-defizitärer Fliegen stattfinden. Hierbei lag der Fokus auf funktionellen Versuchen, wie der Untersuchung der mitochondrialen Funktion. Weiterhin sollen CLS-defizitäre Fliegen hinsichtlich ihres Langzeitüberlebens und ihrer Herzfunktion im Alter untersucht werden.



**Abbildung 10 Experimenteller Aufbau** Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von CL auf die Herzfunktion der Fruchtfliege zu untersuchen. Hierfür wurden mit CLS und TAZ die beiden zentralen Schritte in der CL-Synthese durch eine Mutation oder einen KD in *Drosophila* manipuliert. Anschließend erfolgte die Herzfunktionsanalyse dieser Fliegen. Weitergehende Untersuchungen wie Langzeitüberleben, massenspektrometrische Bestimmung der CL-Spezies, sowie Untersuchungen der mitochondrialen Funktion und Messung der Lipidperoxidation wurde an CLS-Mutanten durchgeführt. Abk: CL – Cardiolipinsynthase; CLS – Cardiolipinsynthase; HS – herzspezifisch; Taz - Tafazzin. Zeichnung Fliege und Fliegenherz Sci vis to.

## 6 Material

### 6.1 Allgemeine und *Drosophila* spezifische Laborgeräte

#### 6.1.1 *Drosophila*aufzucht und -experimente

Arbeitsmaterial	Hersteller
Cannas Spring Schere gebogen, 3mm Schneide	Fine Science Tools (Heidelberg, Deutschland)
Cannas Spring Schere gerade, 3mm Schneide	Fine Science Tools (Heidelberg, Deutschland)
<i>Drosophila</i> Arbeitsplatz (CO <sub>2</sub> -Station, Fliegenpad, Steuerungspedal)	GT-Labortechnik (Arnstein, Deutschland)
<i>Drosophila</i> Röhrchen	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Extra Fine Graefe Forceps	Fine Science Tools (Heidelberg, Deutschland)
Fleischmanns Active Dry Yeast	Fleischmann's ACH Food Companies Inc. (Oakbrook Terrance, USA)
Fly Nap	Carolina Biological Supply Company (Burlington, USA)
Formula 4-24	Carolina Biological Supply Company (Burlington, USA)
Micropipetten, intraMARK, Blaubrand 100µl	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Micropipetten, intraMARK, Blaubrand 5µl	VWR (Darmstadt, Deutschland)
neoTape Beschriftungsklebeband	neoLab Migge GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Parafilm M Barrier Film	SPI supplies (Glasgow, Großbritannien)
Pinzette Dumont #2	Fine Science Tools (Heidelberg, Deutschland)
Pinzette Dumont #5	Fine Science Tools (Heidelberg, Deutschland)
Vaseline	Fagron GmbH & Co. KG (Barsbüttel, Deutschland)
Wattestopfen	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Deckgläser Stärke 1, 24x60mm	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Eppendorfgefäße 0,2-5ml	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Sterile Petrischlalen	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Mörserkeulen	Kimble, (Meiningen, Deutschland)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Seahorse XFe96 Flux Pack mini	Agilent Technologies (Hamburg, Deutschland)

#### 6.1.2 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
-80 °C Gefrierschrank	Electrolux (Stockholm, Schweden)
Acc-Jet Pipettierhelfer	BrandTech Scientific (Essex, USA)
Agilent Seahorse XFe96 Analyzer	Agilent, (Hamburg, Deutschland)
CSH-C18 Säule (2.1 mm × 75 mm × 1.7 µm)	Waters Corporation (Milford, USA)
Elektrischer Stößel (Pellet Pestle)	Kimble (Meiningen, Deutschland)
Feinwaage, Analytical Balance	Sartorius (Göttingen, Deutschland)

Gerät	Hersteller
Fluorescence Microscope Bioevo BZ-9000	Keyence (Osaka, Japan)
Inkubator HettCube 400R	Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen, Deutschland)
LED Lichtquelle KL 2500	Schott AG (Mainz, Deutschland)
Leica DM6B	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Leica M125 C	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Micropipetten Puller P-97	Sutter Instruments (Novato, USA)
Motic SMZ-171 BP	Motic (Hong Kong, China)
MP38 UV-Lampe	Breuer (Ulm, Deutschland)
Multikanalpipette (8x 1-10µl)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Objektiv W N_Achroplan 20x	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Orca-Flash 4.0 V2 Kamera	Hamamatsu (Herrsching, Deutschland)
pH-Meter 211	Hanna Instruments (Woonsocket, USA)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Triple TOF 6600 Massenspektrometer	Sciex LLC (Framingham, USA)
UHPLC System (Hochleistungsflüssigkeitschromatograph)	Agilent Technologies (Hamburg, Deutschland)
Vakuumpzentrifuge	Christ (Osterode, Deutschland)
Vortex Genie2	Scientific Industries (Bohemia, USA)

## 6.2 Chemikalien und Kits

Chemikalie, Kit	Hersteller
Acetonitril	Merck (Darmstadt, Deutschland)
AlbuMAX™ I	Thermo Fischer Scientific (Essex, USA)
Ammoniumformiat	Thermo Fischer Scientific (Essex, USA)
Antimycin	Sigma Aldrich GmbH (Steinheim, Deutschland)
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Carbonyl Cyanide 4-Phenylhydrazon (FCCP)	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Descosept	Dr. Schumacher (Malsfeld, Deutschland)
DMEM 5030	Sigma Aldrich GmbH (Steinheim, Deutschland)
ESI(+) Tune Mix	Sigma Aldrich GmbH (Steinheim, Deutschland)
Ethanol 96%	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Flüssigstickstoff	Linde GmbH (Pullach, Deutschland)
FlyNap®	Carolina Biological
Glucose	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
HEPES	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Isopropanolol	Thermo Fischer Scientific (Essex, USA)
KCl	Merck (Darmstadt, Deutschland)

Chemikalie, Kit	Hersteller
L-Glutamin	Sigma Aldrich GmbH (Stinheim, Deutschland)
Methanol (75%)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Methansäure	Thermo Fischer Scientific (Essex, USA)
Methyl-Tert-Buthyl-Ether	Thermo Fischer Scientific (Essex, USA)
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
NaCl	Merck (Darmstadt, Deutschland)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	Merck (Darmstadt, Deutschland)
NaHCO <sub>3</sub>	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Norland Optical Adhesive 61	Norland Products INC. (Cranbury, NJ 08512, USA)
Oligomycin	Sigma Aldrich GmbH (Steinheim, Deutschland)
Rotenon	Sigma Aldrich GmbH (Steinheim, Deutschland)
Sucrose	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
TBARS Assay Kit	Cayman Chemical, Company (Ann Arbor, USA)
Trehalosedihydrat	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Trockeneis	Linde GmbH (Pullach, Deutschland)
Ultra pure water, sterile	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
XF Calibrant	Agilent Technologies (Hamburg, Deutschland)

### 6.3 *Drosophila* Genotypen

Genotyp	Herkunft und Kennung
CLS RNAi (GD, Chr.1)	VDRC; ID #6742
CLS RNAi (KK, Chr 2)	Vienna <i>Drosophila</i> Resource Center, Wien ID #108392
Hand4.2-Gal4/(CyO); tdTomatoe attP2	Zur Verfügung gestellt von AG Bodmer, Sanford-Burnham Prebys Medical Discovery Institute, La Jolla, USA
KG02529	Zur Verfügung gestellt von AG Schlame, Department of Cell Biology NYU Grossmann Medical School, New York, USA
tdTomatoe attP2	Zur Verfügung gestellt von AG Bodmer, Sanford-Burnham Prebys Medical Discovery Institute, La Jolla, USA
UAS Taz RNAI III (GD)	Vienna <i>Drosophila</i> Resource Center, Wien ID #4658
UAS-Taz RNAI II (KK)	Vienna <i>Drosophila</i> Resource Center, Wien, ID #103785
w <sup>1118</sup>	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center, Indiana USA, ID #5905
W <sup>1118</sup> KKcontrol	Vienna <i>Drosophila</i> Resource Center, Wien, ID #60101

Genotyp	Herkunft und Kennung
W <sup>1118GDcontrol</sup>	Vienna <i>Drosophila</i> Resource Center, Wien; ID #60000
w; ( $\Delta$ TAZ)/(CyO; GFP)	Zur Verfügung gestellt von AG Schlame, Department of Cell Biology NYU Grossmann Medical School, New York, USA
w <sup>1118</sup> ;PBac{w[+mC]=PB}CLS[c01874]/TM6B, Tb]	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center, Indiana USA ID#10741

## 6.4 Software

Software	Anwendungsbereich
Graphpad Prism 5	Graphische Darstellung, Statistische Analyse
HC Image	Datenerhebung (Herzfunktionsanalyse)
Image J	Bildverarbeitung der Videomikroskopie
MS Office (Word, Power Point, Excel)	Datenanalyse und -aufbereitung
Primer-BLAST	Primerdesign
PubMed	Literaturrecherche
R	Herzfunktionsanalyse
Wave	Software zur Bearbeitung und Auswertung der Seahorse-Analyse (Agilent, USA)
Zotero	Zitation, Literaturverwaltung

## 7 Methoden

Da die Forschung an *Drosophila melanogaster* nicht unter das deutsche Tierschutzgesetz fällt, unterliegen Versuche mit *Drosophila* diesem nicht. Daher entfällt das Stellen eines Tier- und Ethikantrags und dessen Genehmigung durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin.

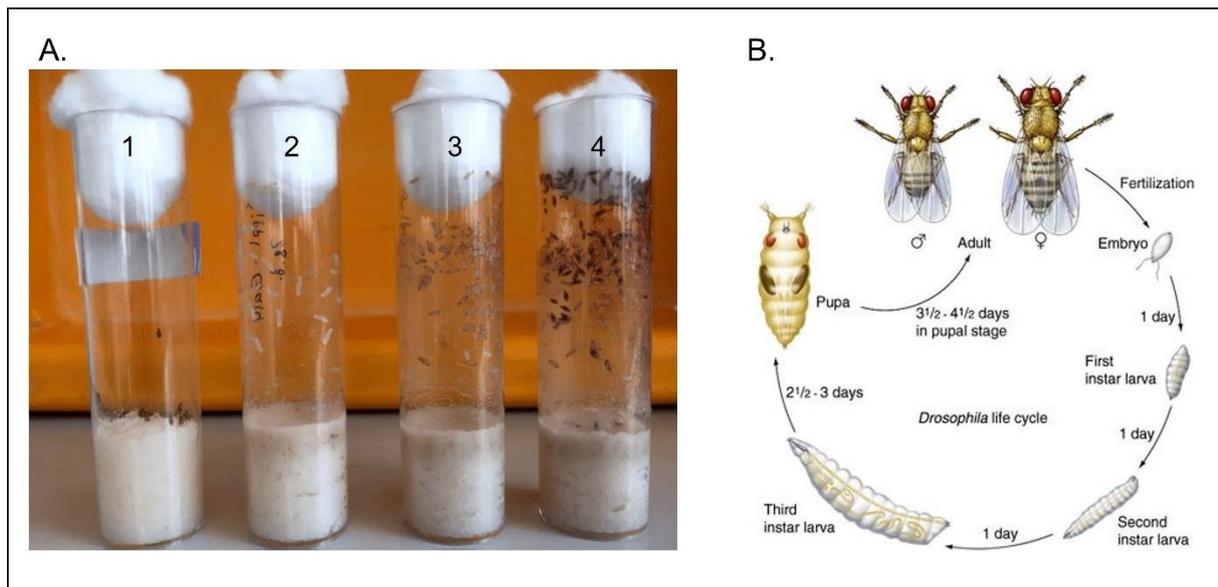
### 7.1 Haltung und Zucht von *Drosophila*

Die Haltung der für Experimente verwendeten *D. melanogaster* erfolgte bei 21°C Raumtemperatur und einem 12 Stunden Licht- Dunkelheitszyklus. Die verschiedenen Genotypen wurden in zylinderförmigen Hartplastikröhrchen gehalten, welche zugleich das Futter für die Tiere enthielten. Zweimal wöchentlich wurden die Zuchtfliegen in neue Röhrchen versetzt und die Eltern generation gegebenenfalls durch jüngere Nachkommen ersetzt. So waren stets mehrere Generationen eines Genotyps verfügbar (Abbildung 11).

Pro Fliegenröhrchen wurde als Futter ein Teelöffel Formula 4-24® mit 7,5ml, sowie fünf Körner Trockenhefe (Fleischmanns® Active Dry Yeast) verwendet. Alle benutzten Röhrchen wurden für 24 Stunden bei -20 °C eingefroren und anschließend autoklaviert und entsorgt.

**Tabelle 2: Inhaltsstoffe Formula 4-24® Instant *Drosophila* Medium**

Inhaltsstoffe [Anteil in %]	Nahrungsergänzungsmittel
Kohlenhydrate [88,62]	Vitamin A
Eiweiß [9,16]	Vitamin B1, B2, B6
Methylparaben zur Konservierung [2,4]	Vitamin C
Kalium [1,07]	Niacin
Fett [0,68]	Kalzium
Natrium [0,07]	Eisen
	Magnesium
	Phosphor
	Buthylhydroxyanisol [Antioxidans]



**Abbildung 11 Generationen *Drosophila*.** (A) Futterröhrchen mit verschiedenen Entwicklungsstadien von *Drosophila*. Die adulten Weibchen legen Eier auf das Futter ab, aus denen sich Embryos und später die verschiedenen Larvenstadien (vgl. B) entwickeln. Wenn Weibchen und Männchen nach drei Tagen in ein neues Futterröhrchen versetzt werden, verbleiben Embryos (Röhrchen 1). Diese entwickeln sich zu Larven (Röhrchen 2). Nach ihrer Verpuppung (Röhrchen 3) dauert es noch einige Tage bis die ersten Fliegen (F1-Generation) schlüpfen (Röhrchen 4) (B): Entwicklungsstadien von *Drosophila* und Generationendauer: Nach der Fertilisation der Eier entwickelt sich aus dem Embryo innerhalb eines Tages das erste der insgesamt drei larvalen Stadien. Nach fünfeinhalb bis sechs Tagen verpuppen sich die Larven. Innerhalb von dreieinhalb bis viereinhalb Tagen schlüpfen die Jungfliegen. (Abbildung übernommen von Farzana Khan Perveen „Introduction to *Drosophila*“ (88)).

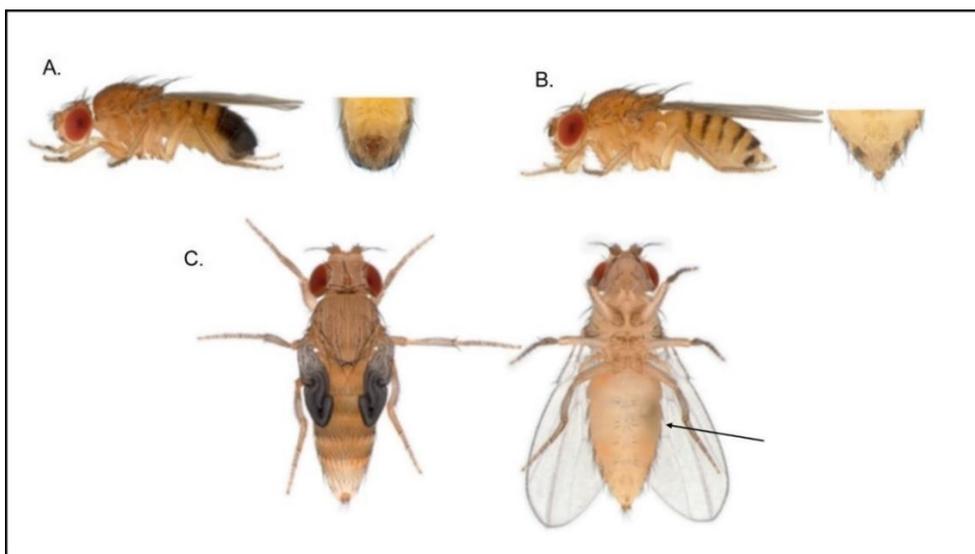
## 7.2 Zucht von *Drosophila*

Für die geplanten Experimente waren mehrere Kreuzungen notwendig. Zum einen wurde mittels Einkreuzen eines Fluoreszenzkonstrukts (*tdtK attp40*) in das Genom der Fliegen die Voraussetzung zur Herzfunktionsanalyse geschaffen. Zum anderen konnte gleichzeitig der KD eines Zielgens erreicht werden. Für die Kreuzungen wurden Jungfrauen des einen Genotypes mit männlichen Fliegen des anderen Genotyps verpaart. Für die Kreuzungen wurden weibliche Jungfrauen des einen Genotypes mit männlichen Fliegen des anderen Genotyps verpaart. Für die Identifikation der Jungfrauen wurden frisch geschlüpfte Fliegen unter CO<sub>2</sub>-Narkose am Mikroskop nach Geschlecht sortiert. Anschließend wurden unter den weiblichen Fliegen die Jungfrauen herausselektiert. Erkennbar waren diese am Mekonium, welches sich als dunkler Fleck linksseitig im Abdomen darstellte. Individuen, bei denen seit dem Zeitpunkt des Schlüpfens unter 30 Minuten vergangen sind, wiesen zudem eine deutlich hellere Färbung sowie noch gefaltete Flügel auf (Abbildung 12).

Je zehn Jungfrauen und fünf junge Männchen wurden in einem Futterröhrchen miteinander verpaart. Nach circa zehn Tagen schlüpfte die F1-Generation, welche bis zu 24 Stunden nach dem Schlüpfen gesammelt wird. Für alle phänotypischen Messungen wurden ausschließlich männliche Fliegen verwendet. Wenn nicht anders beschrieben, waren die verwendeten Fliegen zum Zeitpunkt des Experiments 21 Tage alt, was einer adulten Fliege entspricht. Die im Folgenden dargestellten Kreuzungsschemata bilden lediglich die Individuen der F1-Generation ab, welche für die Experimente verwendet wurden, nicht alle möglichen Nachkommen.

*Drosophila* verfügt über vier Chromosomenpaare. Das erste Chromosomenpaar entspricht den Geschlechtschromosomen (88). Für Manipulationen am Genom werden fast ausschließlich die Chromosomen eins bis drei verwendet, daher sind im Folgenden auch nur diese dargestellt. In den folgenden Abbildungen der Kreuzungsschemata sind die einzelnen Chromosomenpaare jeweils durch ein Semikolon getrennt.

Alle in den Experimenten verwendete Fliegen enthielten den von Klassen et al. in *Drosophila* eingebrachte transgene Tandem Dimer Tomatoe-Konstrukt an der attp 40-Bindungsstelle im Genom, welches im Herzen exprimiert wird. Dies stellte die Grundlage für die in vivo Herzfunktionsanalyse dar, da dieser sowohl in Kardiomyozyten exprimiert und durch Licht angeregt wird, wodurch Aufnahmen des fluoreszierenden Fliegenherzen möglich sind (87).



**Abbildung 12 Unterscheidung von *Drosophila* aufgrund optischer Merkmale.** (A.) Männliche Fliegen sind kleiner und von weiblichen Fliegen leicht aufgrund ihres Genitals zu unterscheiden. (B.) Weibliche Fliege mit spitz zulaufendem Abdomen. (C.) Links: Frisch geschlüpfte weibliche Fliege mit noch gefalteten Flügeln. Rechtsseitig eine wenig ältere weibliche Jungfrau, zu erkennen am dunklen Fleck ventral im linken Abdomen (Pfeil). Fotografien übernommen und modifiziert aus Atlas of *Drosophila* Morphology (89)

### 7.2.1 *Drosophila* mit Mutation

Für die Experimente wurden zwei verschiedene Mutanten verwendet. Zum einen eine *Drosophila melanogaster* Spezies, die eine Insertion im Bereich Cardiolipinsynthese (Bestandsnummer BL #10741) enthielt. Diese Mutante entstand im Rahmen einer Arbeit, bei der genomweit Insertionen in verschiedenen Genabschnitten vorgenommen wurden (90). Da die Mutation homozygot letal ist, wurde die Mutante heterozygot und über Balancer Chromosomen überlebensfähig gemacht. Das Bloomington *Drosophila* Stockcenter in Indiana (USA) erhält diese Spezies und stellt sie Wissenschaftlern zur Verfügung.

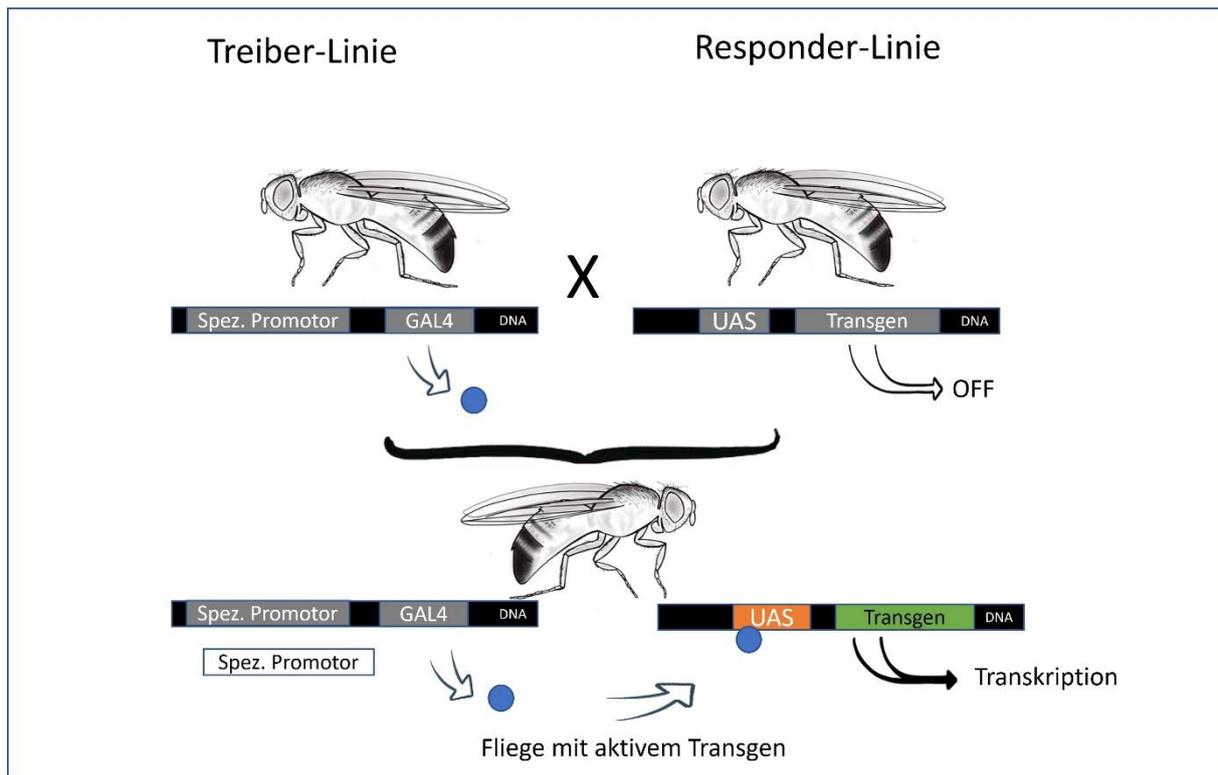
Durch das Labor von Prof. Michael Schlame (Grossmann School of Medicine, NY USA) stand uns eine dort generierte (60) *Drosophila* mit Mutation des Tafazzin-Gens für Experimente zur Verfügung. Da homozygote männliche Fliegen steril sind, war es auch hier notwendig, die Spezies heterozygot mittels Balancer Chromosom zu erhalten.

### 7.2.2 *Drosophila* mit herzspezifischem Knockdown

Die Zuhilfenahme des UAS-Gal4 Systems (91) ermöglichte, RNAi in das *Drosophila*-Genom einzubringen (92) und so einen KD, also die Reduktion der RNA-Menge eines spezifischen Proteins oder Zielgens zu erreichen.

Zur Erzeugung eines KD werden zwei verschiedene Spezies benötigt. Die Treiber-Linie enthält Gal4, ein Transkriptionsaktivator, der ursprünglich aus Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) isoliert wurde. Dieser kann einerseits gewebsspezifisch exprimiert werden, andererseits kann Gal4 auch substanz-, temperatur-oder lichtinduziert aktiviert werden (93). Die Responder-Linie enthält in ihrem Genom eine Upstream Activating Sequenz (UAS), und darauffolgend ein inaktives Transgen. Erst durch die Kreuzung einer Treiber- und einer Responder- Fliege wird durch Gal4 UAS aktiviert und ermöglicht so eine Transkription und Translation des Transgens (Abbildung 13)

Im Rahmen der hier durchgeführten Experimente, wurde mit Hand<sup>4.2</sup>-Gal4 (94) ein Herz- und Skelettmuskelspezifischer Treiber verwendet. Als Responder-Linie dienten verschiedene UAS-RNAi, deren Ziel-mRNA Taz oder CLS sind.



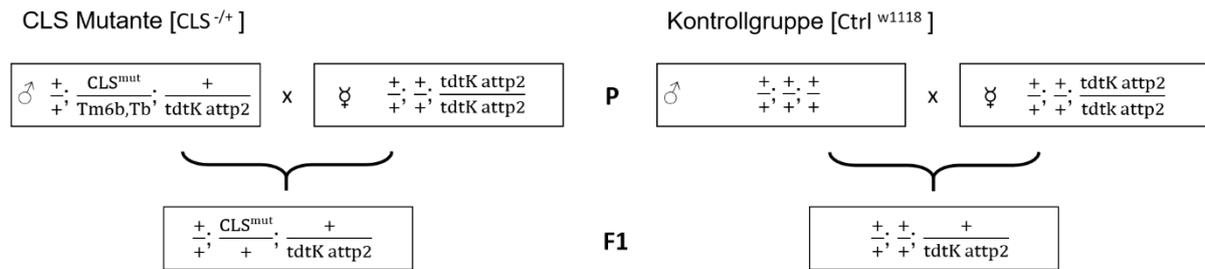
**Abbildung 13 Schematischer Ablauf eines KD mit dem UAS-Gal4-System.** Eine Fliegenspezies mit Gal4, welches an einen Promotor gekoppelt ist wird mit einer, das gewünschte Transgen enthaltenden Fliege gekreuzt. Im ungekreuzten Zustand ist das Transgen inaktiv, da das Genom der Elternfliege zwar eine Aktivierungsregion (UAS = upstream activating sequence) enthält, aber diese nicht aktiviert wird und somit keine Translation des Transgens erfolgt. Kreuzt man beide Fliegen enthält das Genom der F1-Generation sowohl das Promotor gebundene Gal4, welches nun an die Aktivierungsregion bindet und so die Transkription und Translation des Transgenes ermöglicht. Der Treiber kann gewebespezifisch exprimiert werden, oder beispielsweise durch Licht induziert exprimiert werden. Die Responder-Fliege trägt häufig eine RNAi, kann alternativ nach Aktivierung beispielsweise GFP exprimieren. Zeichnung Fruchfliege sci vis to

### 7.2.3 Kreuzungsschemata

Ziel der im Folgenden dargestellten Kreuzungsprozesse war es Fliegen zu generieren, deren Genom, aufgrund von Mutationen oder durch RNAi, ein Defizit von CLS oder Taz aufwies und gleichzeitig den transgenen Herzmarker *tdtK* trug. So konnten Taz und CLS-defiziente Fliegen mittels in-vivo Herzfunktionsanalyse untersucht werden.

#### 7.2.3.1 Cardiolipinsynthese Mutante

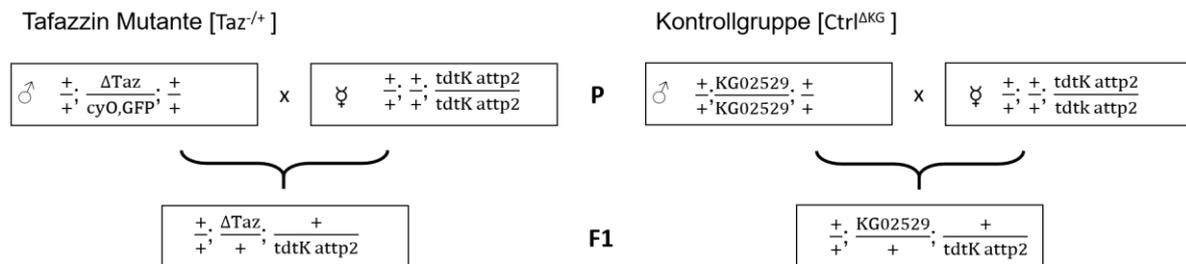
Um sicherzustellen, dass die F1-Generation im Kreuzungsröhrchen der CLS-Mutante ausschließlich Fliegen enthielt, die die CLS-Mutation tragen wurden, die verpuppten Spezies in diesem Stadium selektiert. Puppen, die das in diesem Stadium sichtbare Merkmal Tabby (*Tb*), zu erkennen an einer kugelig rundlichen Form der Puppe trugen, wurden aus dem Kreuzungsröhrchen entfernt.



**Abbildung 14 Kreuzungsschema CLS Mutante und Kontrolle.** Es wurden ausschließlich die für Experimente verwendeten Individuen der F1-Generation dargestellt. P – Eltern-Generation; F1 – erste Folgegeneration, CLS<sup>mut</sup> – Mutation des Cardiolipinsynthase-Gens, + - Wildtyp, es liegt keine Veränderung des Chromosoms vor, tdtK attp2 – Fluoreszenzkonstrukt, Tm6b – Balancer, sichtbar ist durch verminderte Anzahl Haare am Humerus, Tb – Balancer, sichtbar durch kleinere, verdickte Larven und Puppen.

### 7.2.3.2 Tafazzin Mutante

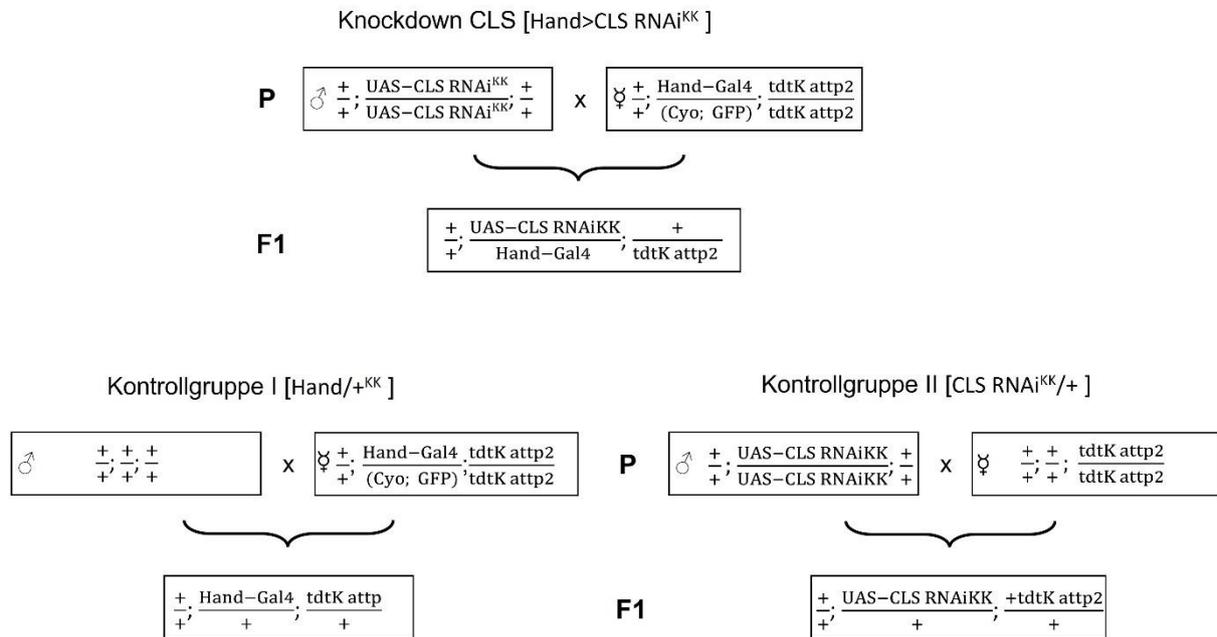
Die F1-Generation der Tafazzin-Kreuzung wurde nach dem Merkmal CurlyO (CyO), was sich in geschwungenen Flügeln zeigte, selektiert. Für Experimente wurden ausschließlich Fliegen mit geraden Flügeln verwendet, da diese das veränderte Tafazzin-Gen trugen.



**Abbildung 15 Kreuzungsschema Tafazzin Mutante und Kontrolle.** Es wurden ausschließlich die für die Experimente verwendeten Individuen der F1-Generation dargestellt. P – Eltern-Generation; F1 – erste Generation Nachkommen. ΔTaz – Mutation des Tafazzin-Gens, + - keine Veränderung des Chromosoms, tdtK attp2 – Fluoreszenzkonstrukt, CyO – Balancer-Chromosom, sichtbar ist durch geschwungene Flügel, GFP – grünes Fluoreszenzprotein, sichtbar in Larven.

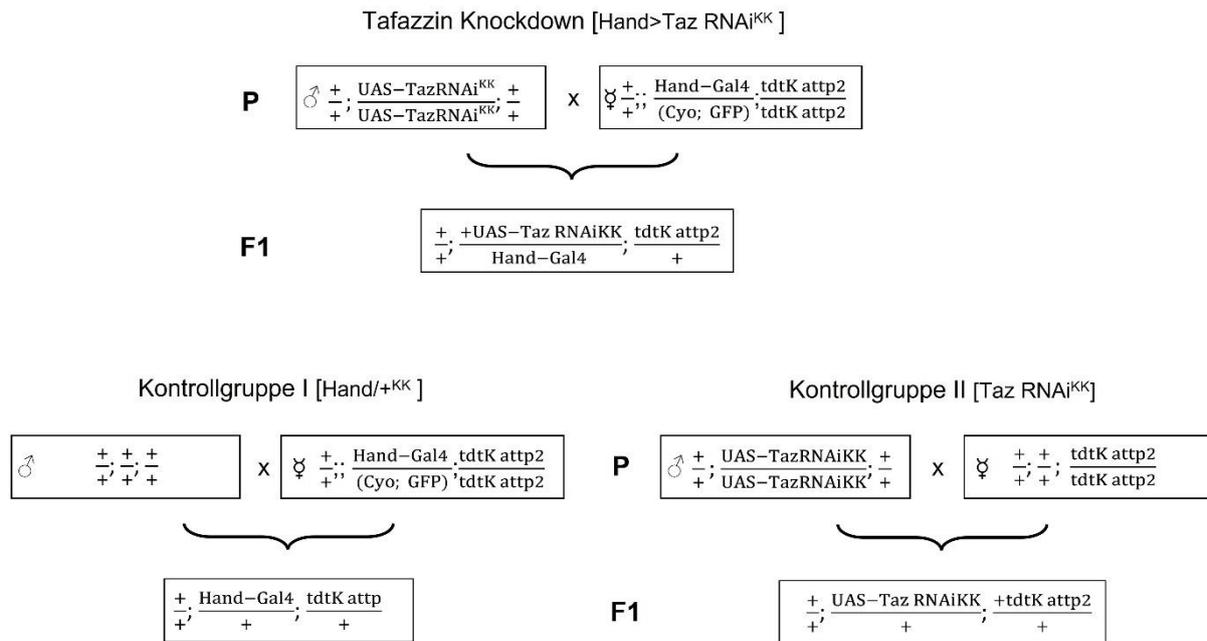
### 7.2.3.3 Herzspezifischer CLS KD

Für den herzspezifischen KD der CLS wurde eine CLS-RNAi aus der KK-Familie verwendet. Bei Fliegen mit KK-Hintergrund ist die RNAi stets auf Chromosom 2 lokalisiert. (95)



**Abbildung 16 Kreuzungsschema CLS RNAi<sup>KK</sup> und Kontrollen.** Es wurden ausschließlich die für Experimente verwendeten Individuen der F1-Generation dargestellt. P – Elterngeneration; F1 – erste Generation Nachkommen. CLS RNAi<sup>KK</sup> – CLS RNAi-Konstrukt, Hand-gal4 – Herz- und muskelspezifischer Treiber für den Knockdown, + - keine Veränderung des Chromosoms, tdtK attp2 – Fluoreszenzkonstrukt, CyO – Balancer-Chromosom, sichtbar durch geschwungene Flügel, GFP – grünes Fluoreszenzprotein, sichtbar in Larven. Kontrollgruppe I dient der Kontrolle der Treiberlinie, Kontrollgruppe II der Kontrolle der RNAi.





**Abbildung 18 Kreuzungsschema Tafazzin RNAi<sup>KK</sup> und Kontrollen.** Es wurden ausschließlich die für Experimente verwendeten Individuen der F1-Generation dargestellt. P – Elterngeneration; F1 – erste Generation Nachkommen. Taz RNAi<sup>KK</sup> – Tafazzin RNAi-Konstrukt, Hand-gal4 – Herz- und muskelspezifischer Treiber für den Knockdown, + - keine Veränderung des Chromosoms, tdtK attp2 – Fluoreszenzkonstrukt, CyO – Balancer, sichtbar ist durch geschwungene Flügel, GFP – grünes Fluoreszenzprotein, sichtbar in Larven. Kontrollgruppe I dient der Kontrolle der Treiberlinie, Kontrollgruppe II der Kontrolle der RNAi.

### 7.3 Herzfunktionsanalyse

Klassen et al. veröffentlichten 2018 eine neue, fluoreszenzbasierte Methode zur in vivo Herzfunktionsanalyse (87). Die videomikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem R-Skript (96) von Georg Vogler (AG Bodmer, Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute, USA) standardisiert ausgewertet. Für die hier vorliegenden Daten wurde die Version 0.2 des Skriptes verwendet. Für die Anwendung der im folgenden beschriebenen Methode ist es notwendig, dass die zu untersuchenden Fliegen das tdtK-Fluoreszenzkonstrukt exprimieren.

#### Versuchsablauf:

Zur Aufrechterhaltung einer konstanten Temperatur unter dem Mikroskoplicht wurde dieses 20 Minuten vor den Messungen gestartet. Mittels Fly Nap<sup>®</sup> wurden die zu untersuchenden Fliegen anästhesiert. Anschließend wurden diese in zwei Reihen, zu je 10 Fliegen, mittels NOR61, einem UV-Kleber an der dorsalen abdominalen Kutikel auf einem Deckgläschen (24x60mm) fixiert. Kopf und Beine blieben hierbei frei beweglich. Die Aushärtung des Klebstoffes erfolgte für 50 Sekunden unter einer UV-Lampe (Typ MP38, Breuer GmbH, Ulm). Anschließend ruhten die fixierten Fliegen für 15 Minuten.

Für die Aufnahme des Fliegenherzens wurde nacheinander jede Fliege so unter dem Mikroskop positioniert, dass die ersten dunklen Streifen der Kutikel links im Bild der Kamera erschienen. Der Punkt der höchsten Schärfe wurde auf dem ersten Ostienpaar eingestellt. Der aufzunehmende Bereich wurde insgesamt so eingestellt, dass der Herzschlauch möglichst waagrecht im Bild liegt (vgl. Abbildung 19 Herzfunktionsanalyse nach Klassen C).

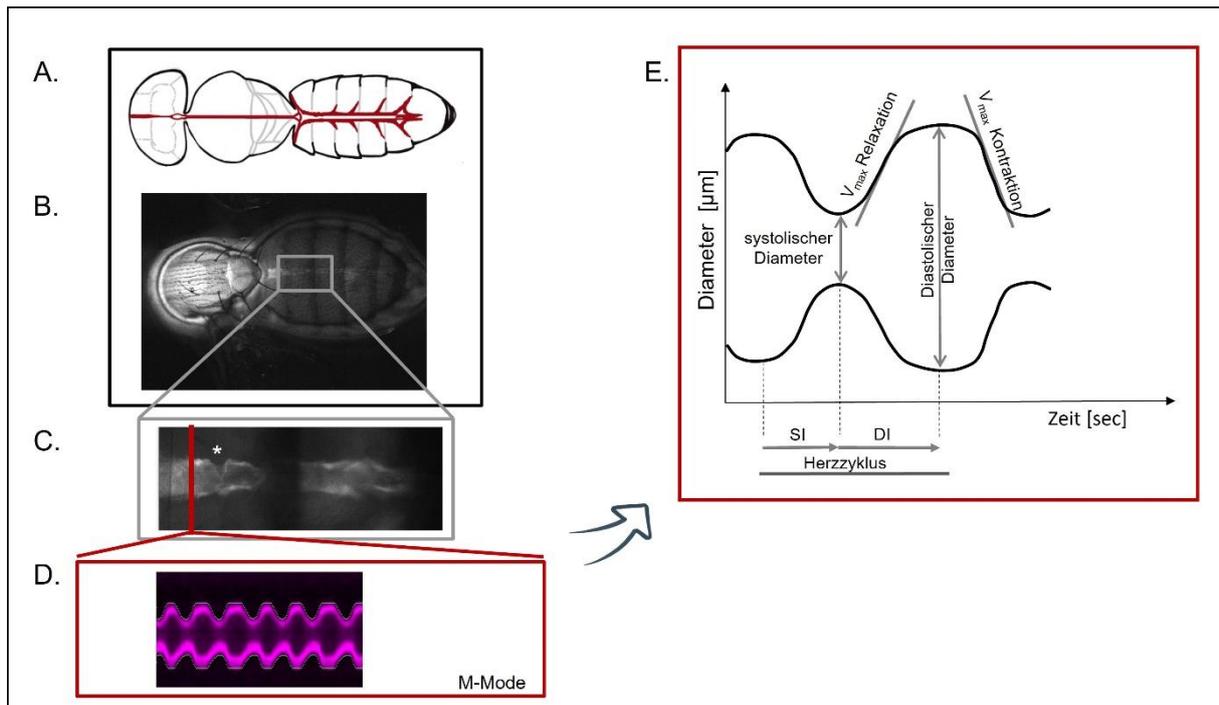
Pro Fliege wurde ein Film von ca. 5 Sekunden Dauer mit insgesamt 1500 Bildern aufgenommen, was einer Hochgeschwindigkeits-Videomikroskopie entspricht. Hierfür wurde mit dem Leica DM6B ein aufrechtes Lichtmikroskop mit einem 20x Objektiv verwendet. Das Mikroskop wurde an eine CMOS- (complementary metaloxide semiconductor) Kamera der Firma Hamamatsu angeschlossen. Mithilfe der Software HC Image (Hamamatsu), konnten die Kamera und die technischen Details des aufzunehmenden Filmes gesteuert werden (Tabelle 3). Die Filme wurden im cxd-Format abgespeichert.

**Tabelle 3** Verwendete Mikroskop- und HCImage Einstellungen

Einstellungen HCImage Software:	
Gruppierung der Pixel (Binning)	2x
Geschwindigkeit der Kamera	2
Tiefe	16 bit
Belichtungszeit	3ms
Bildfrequenz	280 Bilder/Sekunde
Endbild	1500 Bilder
Bildabmessungen	Weite=1024, Höhe=300, X0=0; Y0=380
Einstellung Mikroskop	
Kontrast Methode	FLUO
Filter	Y3 FIM 10%, Feld 5°
Objektiv	2x/0,5 Dry

Die Digitalisierung der Hochgeschwindigkeitsaufnahmen der Fliegenherzen erfolgte R Skript-basiert (96). An den Messstellen wurde die Bewegung der Herzwände sowohl in zeitlichem als auch räumlichen Kontext erfasst. So wurde ein M-Mode, welcher die Bewegung der Herzwände über die Zeit darstellt, generiert. Einzelne Herzschläge wurden von der Software detektiert und automatisch in Kontraktions- und Relaxationsergebnisse unterteilt. Daraus folgend konnten diverse morphologische und funktionelle

raumzeitliche Parameter errechnet werden: Es wurden systolische und diastolische Diameter der Herzen, zeitliche Dauer von Systole und Diastole, maximale Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit, Herzfrequenz und Dauer des Herzzyklus und fraktionelle Verkürzung erfasst (Abbildung 19). Außerdem berechnete das Skript einen Arrhythmie-Index für den Herzzyklus. Aus den Diametern und Herzfrequenz wurde zudem das Schlagvolumen, sowie kardiale Auswurfleistung berechnet (Tabelle 4).



**Abbildung 19 Herzfunktionsanalyse nach Klassen.** (A.) Schematische Abbildung von Kopf, Thorax und Abdomen von *Drosophila* (links nach rechts). In Rot ist schematisch der Herzschlauch dargestellt. (B.) Mikroskopaufnahme (x10) von Thorax und Abdomen einer für die Herzfunktionsanalyse fixierten Fliege. Der im Folgenden für die Messungen vergrößerte relevante Bereich des Herzschlauches wurde mit einem grauen Kasten eingeraht. (C.) 20x-Vergrößerung des Herzschlauches mit Fokussierung auf das erste Ostienpaar (gekennzeichnet durch \*). Der Rote Strich vor den Ostien stellt einen Messbereich dar. (D.) Aus Pixelveränderungen, die sich aus den Bewegungen der Herzwand über die Zeit am Ort der roten Markierung wird ein M-Mode generiert. (E.) Aus dem M-Mode wurden verschiedene Parameter der Herzfunktion errechnet. SI – Systolisches Intervall, DI – Diastolisches Intervall,  $V_{\max}$  Kontraktion – maximale Kontraktionsgeschwindigkeit,  $V_{\max}$  Relaxation – maximale Relaxationsgeschwindigkeit. Zeichnung Fliegenherz von Sci vis to

**Tabelle 4 Berechnung von Herzzeitvolumen und Schlagvolumen**

Parameter	Einheit	Berechnung
Schlagvolumen (SV)	$\mu\text{m}^3$	$\text{SV} = \text{Enddiastolisches Volumen } [\mu\text{m}^3] - \text{Endsystolisches Volumen } [\mu\text{m}^3]$ $\text{Enddiastolisches Volumen} = \pi \cdot (\text{diastol. Diameter}/2)^2 \cdot 1$ $\text{Endsystolisches Volumen} = \pi \cdot (\text{systol. Diameter}/2)^2 \cdot 1$ Näherung: Fliegenherz als Zylinder
Herzzeitvolumen (HZV)	$\mu\text{m}^3/\text{sec}$	$\text{HZV} = \text{SV} \cdot \text{Herzfrequenz}$
Verkürzungsfraktion	%	$[(\text{Enddiastolischer Diameter} - \text{Endsystolischer Diameter}) / \text{Enddiastolischer Diameter}] \cdot 100$
Arrhythmie-Index	Index	Standardverteilung (Herzzyklus)/Mittelwert (Herzzyklus)

Das R-Skript unternahm automatisch eine Unterteilung der Bilder nach guter und schlechter Qualität vor. Hierbei war die durchgehende Erfassung der Herzwand durch das Programm das Hauptkriterium. Lediglich die Filme von ausreichender Qualität wurden in die Gesamtauswertung aufgenommen. Bei mehreren Messpunkten von guter Qualität, wurde Mittelwert der Messwerte gebildet.

#### 7.4 Massenspektrometrische Lipidomanalyse

Zur Untersuchung möglicher Lipidomveränderungen durch die im CLS-Gen induzierte Mutation, wurde in Zusammenarbeit mit Carsten Jaeger (BAM, Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung) mittels Massenspektrometrie CL-Spezies bestimmt und quantifiziert. Bei dem im Folgenden beschriebenen Protokoll handelt es sich um ein, in Zusammenarbeit mit Carsten Jaeger modifiziertes Protokoll, nach Chen et al. (97).

Für das Experiment wurden drei Wochen alte männliche CLS Mutanten und deren Kontrollen verwendet (Abbildung 14). Die Fliegen wurden in Flüssigstickstoff schockgefroren und so bis zur weiteren Aufarbeitung bei  $-80^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Um ausreichend Material für die Lipidomanalyse zur Verfügung zu haben, bildeten je 3 Fliegen eine Versuchsgruppe. Auf Trockeneis wurden diese in einem Proberöhrchen (1,5ml) mit 300 $\mu\text{l}$  eiskaltem 75%-Methanol versetzt und anschließend mit einem elektrischen Stößel für eine Minute homogenisiert. Pro Probe wurden 0,75ml Methyl-Tert-Buthyl-Ether in das Proberöhrchen gegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur gevortext. Anschließend ruhte die Probe für 10 Minuten, bevor sie erneut gevortext wurde. Nun wurde die Probe für fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert (14000xg). Im Proberöhrchen wurden so zwei Phasen sichtbar, wovon die obere Phase Lipide enthielt,

die bodennahe Phase hingegen semipolare und amphiphile Metabolite. Von der oberen Phase wurden je 2x 300µl abpipettiert und in zwei neue 1,5ml Proberöhrchen gegeben. Diese Proben wurden in einer Vakuumzentrifuge für zwei Stunden bei 1mbar und Raumtemperatur getrocknet. Die bodennahe Phase verblieb für eventuelle weitere Experimente im Originalgefäß und wurde bei -80°C verwahrt. Eine Leerprobe durchlief die vorher beschriebenen Schritte ebenfalls.

**Folgende Schritte wurden durch Carsten Jaeger durchgeführt:**

Die Lipidextrakte wurden anschließend mit 100µl Isopropanol/Acetonitril/Wasser (Verhältnis 2:1:1) versetzt. Zur Bestimmung und Quantifizierung der Cardiolipinspezies wurden Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie (LC-MS) durchgeführt. Mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatografen, gekoppelt an ein Massenspektrometer wurden Proben zu je 5 µl analysiert. Die chromatografische Auftrennung der Lipide erfolgte anhand einer Gradientenelution (0 min, 60 %; 1.2 min, 57 %; 1.26 min, 50 %; 7.2min, 46 %; 7.26 min, 30 %; 10.8 min, 0 %; 12.96 min, 0 %; 13.02 min, 60 %; 14.4 min, 60 %). Die verwendeten Lösungsmittel sind (a) im Verhältnis 60:40 Acetonitrile:Wasser und (b) im Verhältnis 90:10 Isopropanol: Wasser. Beide Lösungsmittel enthalten je 10 mM Ammoniumformiat und 0,1% Methansäure. Als Säule wurde eine 2.1 mm × 75 mm × 1.7 µm CSH-C18 Säule, ausgestattet mit einem 0,2µm Einlassfilter, verwendet. Die Temperatur in der Säule betrug konstant 55°C. Die Flussrate lag bei 0,5 ml/min. Die Elektrospray-Ionisierung erfolgte im positiven Modus (ESI+). Die Temperatur der Ionenquelle betrug 320°C, die kapillare Spannung 5500V. Die MS-Daten wurden für einen Masse/Ladung-Messbereich (m/z) von 100-1600 bei einer Scanrate von 4s<sup>-1</sup> erfasst.

Die Aufnahme der MS-Spektren erfolgte im datenabhängigen Modus. Pro Maximum wurden automatisch die vier Bestandteile mit dem höchsten m/z-Wert verarbeitet (DDA Top4-Mode). Massenkalisierung erfolgte am Beginn der Messsequenz mithilfe eines Kalibrants (ESI(+))Tune Mix).

Zur Datenanalyse wurden die MS Dateien mittels ProteoWizard in Centroid mzML-Formate konvertiert und in MS-DIAL importiert (98). Ein Lipidomics-Projekt wurde erstellt ("Soft Ionization", "Data independent MS/MS", "Centroid data", "Positive ion mode", "Lipidomics"). Im Anschluss an die Prozessierung der Daten wurden die Ergebnisse in eine Text-Datei exportiert und weiter mittels R-Skript analysiert: Zuerst wur-

den alle Metabolite, welche in unter 20% der Proben auftraten, verworfen. Anschließend wurden durch Abgleich mit Match Score Ranks widersprüchliche Zuordnung von Maxima behoben. Zuletzt wurden die Intensitäten der Maxima normalisiert und für Batch-Effekte korrigiert (99).

## 7.5 Mitochondrienfunktionsanalyse mittels Seahorse

Um einen genaueren Einblick zu erhalten, inwiefern die bei *Drosophila* induzierten genetischen Veränderungen Einfluss auf die Funktion der kardialen Mitochondrien haben wurde das „Mito Stress Assay“ von Agilent verwendet. Hier konnten die Schlüsselparameter der mitochondrialen Funktion messbar gemacht werden und

Neben der mitochondrialen Atmung – gemessen an der Sauerstoffverbrauchsrate ist es möglich, mit dem Agilent Seahorse XFe Analyzer, Rückschlüsse über den zweiten zentralen Weg der Energiegewinnung in Mitochondrien, die Glykolyse zu ziehen. Hierfür wird die extrazelluläre Ansäuerungsrate, also der pH über die Zeit gemessen, welche wiederum mit dem Anfall von Lactat und damit mit dem Verbrauch von Glucose zur Energiegewinnung korreliert.

Durch sequenzielle Zugabe von Inhibitoren der atemungskettenkomplexe kann die Funktion der mitochondrialen Respiration ermittelt werden. Dieses Vorgehen ermöglicht die Bestimmung mitochondrialer Parameter, beispielsweise ATP-Produktion, Protonen Leckage, Maximale Respiration, freie respiratorische Kapazität und nicht-mitochondrialer Sauerstoffverbrauch.

Durch Kooperation mit Eva K. Wirth und Kostja Renko (AG Spranger, Charité Universitätsmedizin Berlin) konnten die mitochondrialen Funktionsmessungen an Gewebestücken, in diesem Fall an intakten, schlagenden Fliegenherzen durchgeführt werden.

### Vorbereitungen:

Die mitochondrialen Messungen wurden nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Sensorplatte wurde über Nacht in Kalibrierlösung (200µl/Well) bei 37°C inkubiert. Am Tag des Experimentes erfolgt die Kalibrierung der Sensorplatte im Gerät nach Herstellerangaben.

Die Messungen wurden bei ca. 25°C, der normalen Körpertemperatur von *D. melanogaster* durchgeführt. Dafür wurde die Heizfunktion des Messgerätes abgestellt und der Raum mittels Klimaanlage gekühlt.

Das Versuchsmedium wurde aus DMEM, Glutamin sowie Glucose angesetzt und auf einen pH von 7,4 eingestellt. Da Kardiomyozyten unter anderem auch Fettsäuren als Energiesubstrat verwenden, wurden für einige Versuche als zusätzliches Energiesubstrat 1mg/ml lipidreiches bovines Serumalbumin (ALBUMAX™) verwendet.

**Tabelle 5 Versuchsmedium Mitochondrienfunktion mit DMEM**

Zugegebene Substanzen	Finale Konzentration
Glutamin	2mM
Glucose	10mM
Ggf. ALBUMAX I™	1mg/ml
Ziel pH 7,4	

Im Verlauf der Messungen wurden die Ports mit den Inhibitoren nacheinander in die jeweiligen Wells entleert. Anschließend werden OCR und ECAR gemessen. Die optimale Konzentration der Inhibitoren für diese Experimentkonstellation wurde im Vorfeld im Rahmen von Etablierungsversuchen ermittelt. Die optimale Konzentration zeichnet sich darin aus, dass die Fliegenherzen auf alle nacheinander zugegebenen Inhibitoren reagieren und eine gute Auslenkung der Mitochondrien, durch Hinzugabe der Inhibitoren, im Verlauf der Messungen sichtbar wird.

**Tabelle 6 Im Rahmen der Seahorse-Experimente verwendete Inhibitoren und deren Funktion, finale Konzentration, sowie zeitliche Reihenfolge der Zugabe in die Wells.**

Inhibitor (Port Nr.)	Funktion	Finale Konzentration im Well
Oligomycin (A)	Inhibitor des Komplex V (ATP-Synthase) der Atmungskette	10µM
Carbonyl Cyanid 4-Trifluoromethoxy- Phenylhydrazone/FCCP (B)	Bewirkt an der inneren Mitochondrienmembran eine Entkopplung der Atmungskette, durch Zerstörung des Protonengradienten und damit des mitochondrialen Membranpotentials	5µM
Rotenon (C)	Inhibitor des Komplex I der Atmungskette	2,5µM
Antimycin (C)	Inhibitor des Komplex III der Atmungskette	2,5µM

### **Herzpräparation *Drosophila***

Um sicherzustellen, dass während der mitochondrialen Messungen die Funktion der kardialen Mitochondrien gemessen wird, erfolgte eine semiintakte Herzpräparation nach Fink et al. (86). Hierbei wurden die Fliegen, nachdem sie mittels Fly Nap® anästhesiert wurden, in Gruppen zu je acht Individuen in einer Petrischale auf einer dünnen

Schicht Vaseline vorsichtig am dorsalen Abdomen fixiert. Anschließend wurden Kopf und ventraler Thorax entfernt. Um möglichst physiologische Bedingungen für die Dauer der Präparation zu gewährleisten, wurden alle folgenden Schritte in artifizieller Hämolymphe (100,101) durchgeführt (Tabelle 7). Um die ventrale abdominelle Kutikel zu eröffnen, wurde der distalste Teil des Hinterleibs ebenfalls entfernt. Anschließend wird die Kutikel seitlich eröffnet und die intraabdominellen Organe entfernt. Mit einer Glaspipette wurde, ohne das Herz zu berühren, der umgebende Fettkörper vorsichtig abgesaugt. So verblieb neben dem Herz lediglich der ventrale abdominelle Muskel und die Alarmuskeln in der Kutikel. Nach Abschluss der Präparation und Erneuerung der Hämolymphe ruhten die Präparate unter konstanter Oxygenierung der Hämolymphe für 15 Minuten.

**Tabelle 7 Zusammensetzung artifizielle Hämolymphe (100,101)**

	Komponente	Konzentration
Saline:		
	NaCl	108mM
	KCl	5mM
	CaCl <sub>2</sub>	2mM
	MgCl <sub>2</sub>	8mM
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1mM
	NaHCO <sub>3</sub>	4mM
<b>Direkt vor Verwendung:</b>		
	Sucrose	10mM
	Trehalose	5mM

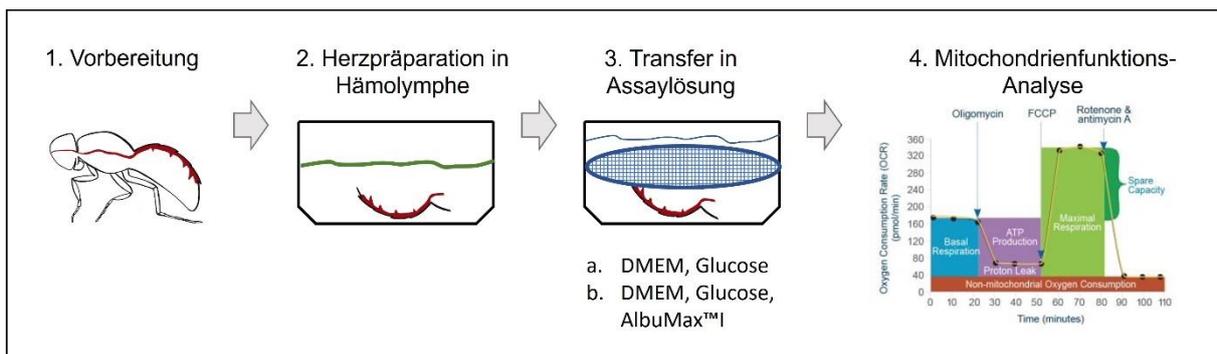
Einstellen des pH auf 7,1, Verwendung der HL bei Raumtemperatur

Im Anschluss an die Ruhephase wurden die präparierten Fliegenherzen in VersuchsmEDIUM gewaschen und auf eine 96-Well-Platte (Agilent) transferiert. Hierfür wurde eine kleine Menge Vaseline auf dem Boden des Wells zur Befestigung verwendet. Bei der Platzierung der Präparate in den Wells wurde besonderes Augenmerk daraufgelegt, dass die Kutikel mit dem schlagenden Herzen nach oben offen ist, um eine optimale Verteilung der Inhibitoren im Verlauf der Messung zu ermöglichen. Nun wurden pro Well 175 µl VersuchsmEDIUM hinzugegeben. Ein kleines Plastiknetz, welches für die Dauer des Experimentes das Präparat in Position hielt, wurde vorsichtig auf der Fliegenkutikel befestigt (102,103). Nun wurden alle, nicht mit Fliegen besetzten Wells

ebenfalls mit 175  $\mu$ l Versuchsmedium befüllt, im Anschluss daran ruhte die Platte für eine Stunde.

In der geräteeigenen Software „Wave“ wurden das Versuchsprotokoll, sowie die einzelnen Messschritte hinterlegt: Nach jeder Zugabe eines Inhibitors erfolgte ein zweiminütiger Mischzyklus auf den anschließend alle zwei Minuten insgesamt sechs Messungen pro Injektion durchgeführt wurden. Vor Beginn der Injektionen wurde zur Erfassung der basalen Respiration drei Messzyklen durchgeführt.

Im Anschluss an die Messungen wurde die Platte mit den Fliegenherzen auf die richtige Ausrichtung der Fliegen und die richtige Position des Plastiknetzes überprüft. Bei starker Dislokation der Kutikel im Well wurden die Ergebnisse eines solchen Wells gegebenenfalls nicht in die Auswertung einbezogen. Der Ausschluss von Präparaten erfolgte nach dem Vier-Augen Prinzip, beispielsweise wenn ein Präparat nicht auf die Inhibitoren reagierte.



**Abbildung 20 Arbeitsablauf Mitochondrienfunktionsanalyse.** Auf die Vorbereitung (1.), die die Zucht der entsprechenden Fliegen beinhaltet folgte am Tag des Experimentes die Präparation des Herzens in Hämolymphe (2.). Hierbei verblieben der Kutikel des Abdomens und darin das schlagende Fliegenherz. Das Präparat wurde in das Versuchsmedium (3) transferiert, welches je nach Experiment neben DMEM, Glutamin und Glucose als Energiesubstrat auch lipidreiches bovines Serum enthielt (AlbuMAX™ I). Anschließend erfolgte die Messung der mitochondrialen Funktion nach dem Profil des „Mito Stress Assay“ (Seahorse, Agilent)

## 7.6 TBARS

Im TBARS-Assay wird Malondialdehyd (MDA), als Produkt von Lipidperoxidation und Indikator für oxidativen Stress in Zellen mittels Farbreaktion sichtbar gemacht. Durch kolorimetrische Messungen können Rückschlüsse über die Menge MDA und damit über das Ausmaß von Lipidperoxidation in einer Probe gezogen werden.

Pro Probe wurden 30, drei Wochen alte, männliche Fliegen gemessen. Diese wurden mittels CO<sub>2</sub> anästhesiert und auf Trockeneis gegeben. Zusammen mit 150µl Ripa-Puffer wurden sie in einem 1,5ml Eppendorfgefäß für zwei Minuten mit einem elektrischen Stößel homogenisiert und bei 4°C für zehn Minuten zentrifugiert (4200 RPM). Vom Überstand werden 130µl abpipettiert und in einem neuen Gefäß abermals bei 4°C für zehn Minuten bei 4200 RPM zentrifugiert.

Alle weiteren Schritte erfolgten nach Herstellerangaben des hier verwendeten TBARS Assay Kit (Cayman Chemical Company):

10 µl Thiobarbituressigsäure und 10 µl Natriumhydroxid Assay Reagenz wurden jeweils mit 40 µl ultrareinem Wasser verdünnt. Zur Vorbereitung des Farbreagenz werden für 24 Proben 106 mg Thiobarbitursäure abgewogen und mit 10 µl der zuvor verdünnten Thiobarbituressigsäure zusammengegeben. Weiter werden 10 µl des ebenfalls zuvor verdünnten Natriumhydroxid hinzugegeben. Das Gemisch wurde gerührt, bis sich die Thiobarbitursäure gelöst hatte.

Die Standardkurve enthält folgende Malondialdehydkonzentrationen: 0 µM, 0.625 µM, 1,25 µM, 2,5 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM.

Zur Durchführung des Assays wurden jeweils 100 µl entweder Probe oder Standardkurve in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß gegeben und entsprechend beschriftet. Nun wurden in jedes Probenröhrchen 100µl TCA Assay Reagenz gegeben und im Anschluss kurz gevortext

Weiter wurden nun sowohl zu den Proben als auch zum Standard 800 µl des zuvor zubereiteten Farbreagenz zugegeben und für 60 Minuten im Thermocycler bei 90°C erwärmt, um so die Reaktion in Gang zu setzen. Anschließend werden die Probengefäße für zehn Minuten direkt aus dem Thermocycler in ein Eisbad gegeben, um so die Reaktion zu stoppen. Nachdem die Proben zehn Minuten lang bei 4°C und 4200 RPM zentrifugiert wurden, wurde aus jeder Probe und jedem Standardtriplikate zu je 200µl in eine 96-Well-Platte überführt und die Platte mit einer durchsichtigen Folie dicht verschlossen. Bei einer Wellenlänge von 535nm wurde direkt im Anschluss die Absorptionskurve der Proben im Vergleich zum Standard bestimmt.

Die Menge an MDA, die in den Proben enthalten ist, lässt sich aus der mitgemessenen Standardkurve berechnen:

Für die Proben ist die Absorption bekannt, die MDA-Konzentration jedoch nicht. Daher wird die Gleichung nach MDA aufgelöst. So kann für jede Probe anhand der gemessenen Absorption die MDA-Konzentration bestimmt werden:

$$\text{MDA} = \frac{\text{Absorption-Y-Achsenschnittpunkt}}{\text{Steigung der Tangente}}$$

## 7.7 Langzeitüberleben

Zum Vergleich der Überlebensdauer verschiedener Genotypen wurde das Langzeitüberleben der CLS Mutanten untersucht (104). Hierzu wurden männliche Fliegen direkt am Tag des Schlüpfens mittels CO<sub>2</sub>-Narkose anästhesiert, gesammelt und in Futterröhrchen zu je zehn Fliegen gegeben. Alle zwei bis drei Tage wurden die Fliegen in neue Röhrchen gesetzt. Die Zahl der verstorbenen Individuen wurde festgehalten. Die Prozedur wurde so lange fortgeführt, bis die letzte Fliege verstarb. Die erhobenen Daten wurden in einer Kaplan-Meier-Kurve aufgetragen.

## 7.8 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen wurden allesamt mit GraphPad Prism 5 durchgeführt. Bei allen Tests wurden p-Werte < 0,05 als signifikant gewertet. Den verschiedenen p-Werten entsprachen: \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 und \*\*\*\*p < 0,0001 und sind entsprechend in den zugehörigen Graphen vermerkt.

Um die Mittelwerte zweier Gruppen zu vergleichen, wurde ein t-Test durchgeführt. Wenn nicht anders vermerkt, wurde bei allen Daten eine Normalverteilung angenommen. Zum Vergleich mehrerer Gruppen wurden Varianzanalysen (ANOVA) durchgeführt. Handelte es sich um mehrere Gruppen mit lediglich einem Faktor, der verglichen werden soll, so wurde eine einfache Varianzanalyse (One-Way ANOVA) durchgeführt, bei zwei zu vergleichenden Faktoren eine zweifache Varianzanalyse (Two-Way-ANOVA), jeweils mit anschließendem Bonferroni-Post-hoc-Test.

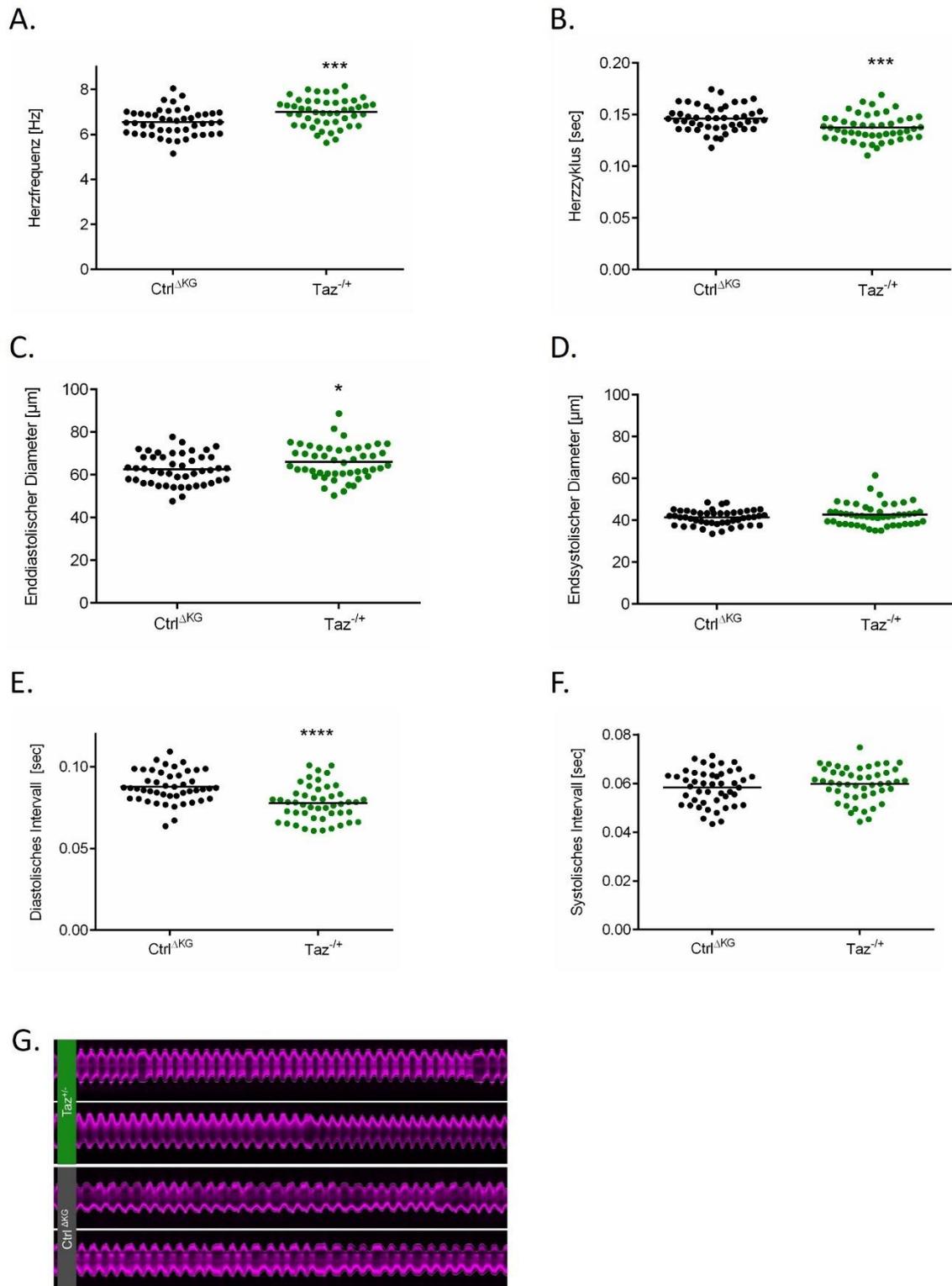
## 8 Ergebnisse

### 8.1 Tafazzin

Taz ist ein Schlüsselenzym des CL-Remodeling. Bei fehlendem Taz kommt es zu einem Mangel an reifen CL. Dies hat weitreichende Folgen für die Funktion der Mitochondrien. Auf Grund der hohen Konzentration von Mitochondrien in Kardiomyozyten, ließen sich hier besonders starke Auswirkungen eines Taz- Mangels vermuten. Zur Überprüfung dieser These untersuchten wir in-vivo die Herzfunktion bei Taz-Mutation anhand eines *Drosophila*-Modells. In Ergänzung dazu wurde die Herzfunktionsanalyse an zwei verschiedenen herzspezifischen Taz-KD-Fliegen durchgeführt. Die in-vivo Herzfunktionsanalyse (s. Kapitel 7.3) (87) wurde, wenn nicht anders beschrieben an drei Wochen alten, männlichen Fliegen durchgeführt, die mit *tdtK* ein fluoreszierendes Transgen in ihren Kardiomyozyten exprimierten.

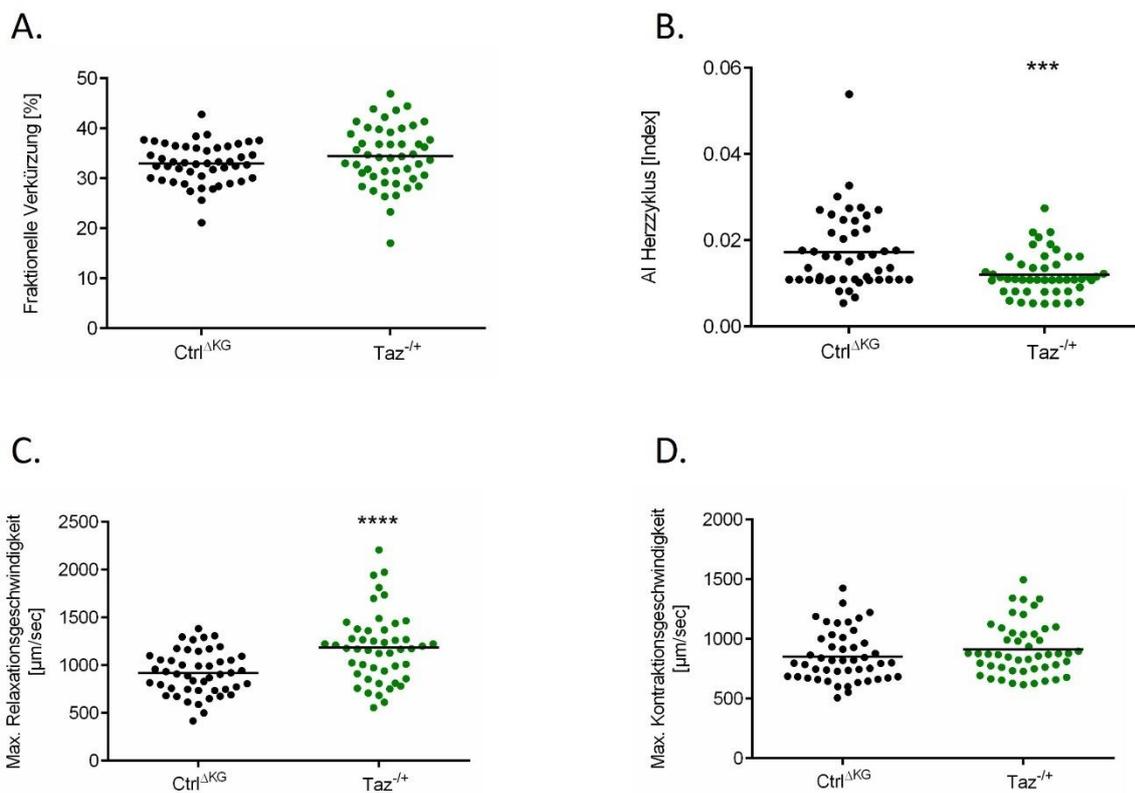
#### 8.1.1 Kardiale Charakterisierung der Taz-Mutante

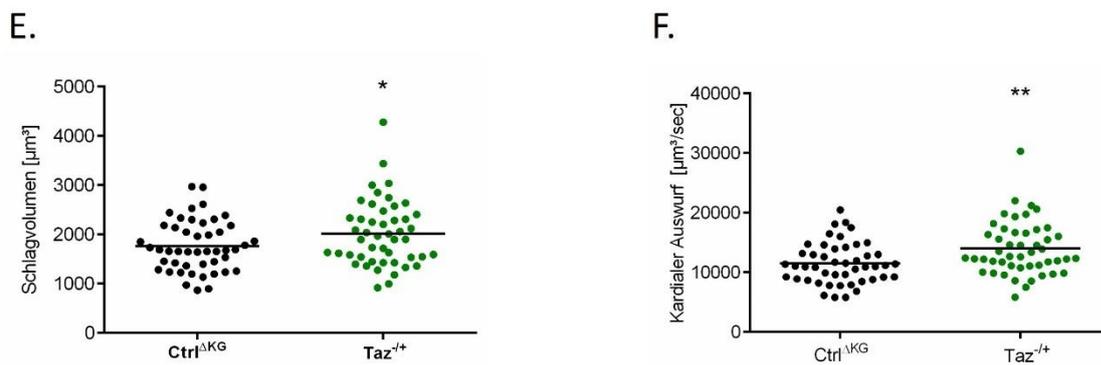
Die hier erhobenen Daten (vgl. Abbildung 21) zeigten bei der Taz-Mutante eine signifikant erhöhte Herzfrequenz bei einem verkürzten Herzzyklus (Abbildung 21, A., B.). Dieser gründete auf einem signifikant erniedrigten diastolischen Intervall der Taz-Mutanten im Vergleich zu ihren Kontrollen (Abbildung 21 E.). Das systolische Intervall hingegen wies keine Veränderung auf (Abbildung 21 F.). Am Ende der Diastole zeigten sich die Herzen der Taz-Mutante leicht vergrößert im Vergleich zu ihren Kontrollen, wohingegen der endsystolische Diameter unverändert blieb (Abbildung 21 C., D.). Die repräsentativen M-Modes (G.) verbildlichen die oben beschriebenen Ergebnisse der Herzfunktionsanalyse.



**Abbildung 21 Herzfunktionsanalyse bei Taz-Mutation.** (A.-F.) Ergebnisse der Herzfunktionsanalyse in drei Wochen alten Männchen. Tafazzin-Mutanten (grün, Taz<sup>-/-</sup>) im Vergleich zur Kontrollgruppe (grau, Ctrl<sup>ΔKG</sup>). Mittelwert, N=3, n=47/ 48, Statistik: ungepaarter t-Test \*\*\*\* p< 0.0001, \*\*\* p< 0.001, \*\* p< 0.01, \* p<0.05 (G.) Repräsentative M-Moden der Herzfunktionsanalyse

Während sich die Taz-Mutanten nicht von den Kontrollen hinsichtlich der fraktionellen Verkürzung des Herzschlauches unterschieden, zeigte sich der Arrhythmie-Index signifikant verringert für die Taz-Mutanten (Abbildung 22, A., B.). Die Diastole zeigte sich in Form einer erhöhten Relaxationsgeschwindigkeit der Taz-Mutanten signifikant abweichend zu ihren Kontrollen (Abbildung 22, C.). Die Kontraktionsgeschwindigkeit blieb unverändert (Abbildung 22, D.). Aufgrund der diastolisch vergrößerten Herzen berechnete sich für die Taz-Mutanten ein erhöhtes Schlagvolumen als für ihre Kontrollen (Abbildung 22, E.). Aus dem erhöhten Schlagvolumen in Kombination mit der erhöhten Herzfrequenz errechnete sich weiterhin eine erhöhte kardiale Auswurfleistung der Taz-Mutanten im Vergleich zu ihren Kontrollen (Abbildung 22, F.).

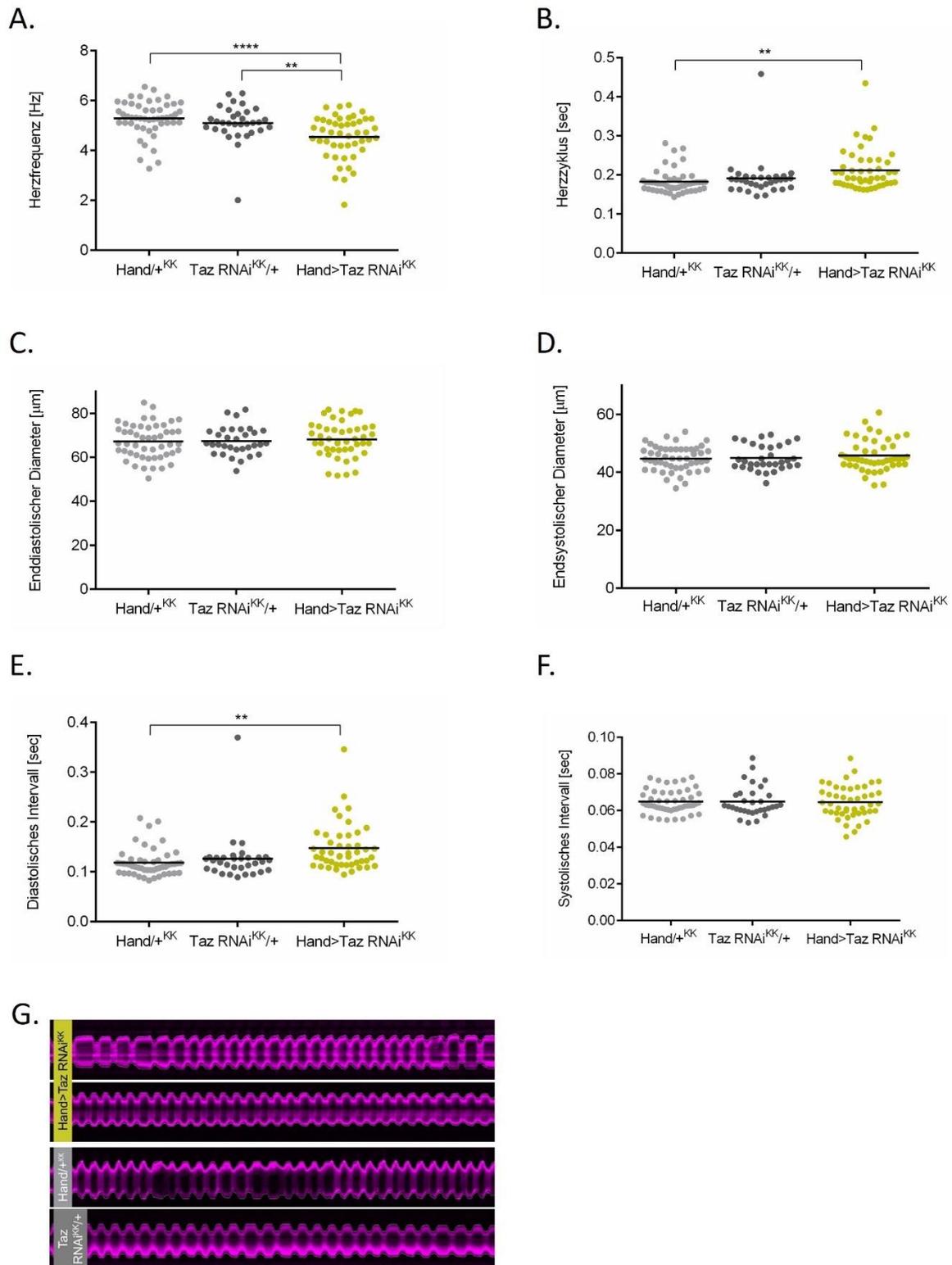




**Abbildung 22 Kalkulierte Parameter aus der Herzfunktionsanalyse bei Taz-Mutation.** (A.-F.) Ergebnisse der Herzfunktionsanalyse in drei Wochen alten Männchen. Tafazzin-Mutanten (grün, Taz<sup>+/+</sup>) im Vergleich zur Kontrollgruppe (grau, Ctrl<sup>ΔKG</sup>). Mittelwert, N=3, n=47/ 48, Statistik: ungepaarter t-Test \*\*\*\* p<0.0001, \*\*\* p< 0.001, \*\* p< 0.01, \* p<0.05; AI – Arrhythmie-Index;

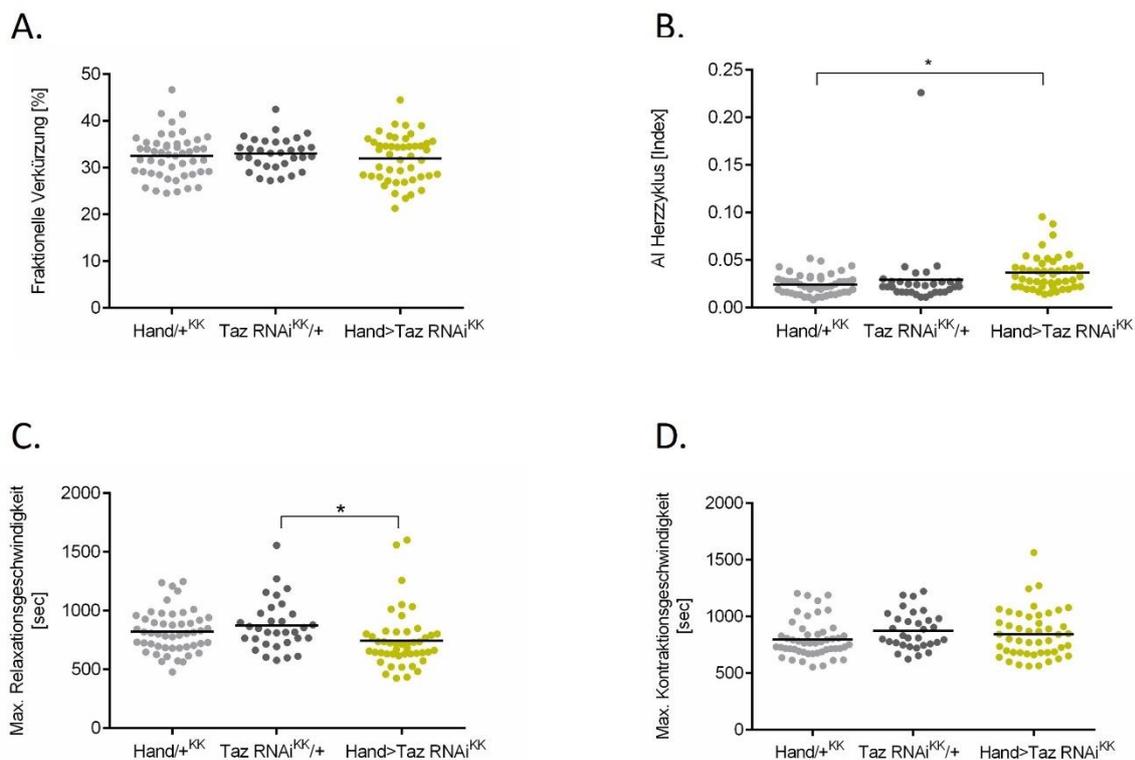
### 8.1.2 Kardiale Charakterisierung der herzspezifischen Taz -KD-Fliege (KK)

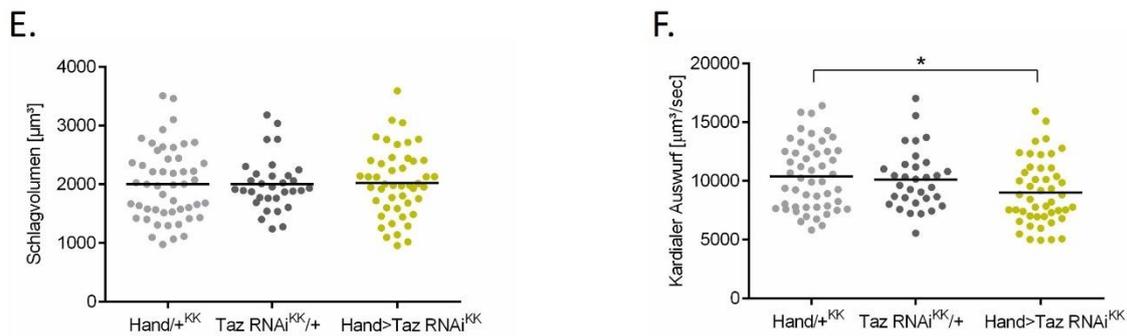
Für die kardiale Charakterisierung der Taz RNAi<sup>KK</sup>-Fliege wurden drei Wochen alte männliche Fliegen verwendet. Die beiden mituntersuchten Kontrollgruppen (Abbildung 23, grau) wurden genutzt, um sicherzustellen, dass weder das RNAi-Konstrukt, noch der Treiber selbst Einfluss auf die Herzfunktion ausübten. Beim KD von Taz mittels KK-RNAi zeigte sich eine erniedrigte Herzfrequenz des KD verglichen mit den beiden Kontrollen (Abbildung 23 A.). Gegen jeweils eine Kontrollgruppe zeigte sich ein leicht verlängertes diastolisches Intervall und ein verlängerter Herzzyklus (Abbildung 23, B., E.). Hinsichtlich der Herzgröße unterscheiden sich der KD und seine beiden Kontrollen weder in der Systole noch in der Diastole (Abbildung 23 C., D.) voneinander. Auch die systolischen Intervalle aller drei Gruppen wiesen eine ähnliche Länge auf (Abbildung 23 F.).



**Abbildung 23 Herzfunktionsanalyse bei KD von Taz (KK).** (A.-F.) Drei Wochen alte Männchen, herzspezifischer Taz-KD (grün, Hand>Taz RNAi<sup>KK</sup>), Kontrollen für RNAi in dunkelgrau und Gal4-Treiber in hellgrau. Mittelwert. N=3, n= 50/32/47, einfache Varianzanalyse (One-Way ANOVA), \*\*\*\* p < 0.0001, \*\* p < 0.01 (G.) Repräsentative M-Modes der Versuchsgruppen

Weder bei der fraktionellen Verkürzung der Herzen noch hinsichtlich der Kontraktionsgeschwindigkeiten der Herzen unterschieden der Taz-KD und seine Kontrollen voneinander (Abbildung 24 A., D.). Die maximale Relaxationsgeschwindigkeit zeigte einen leicht signifikanten Unterschied zwischen dem Taz KD und der Kontrollgruppe der RNAi (Abbildung 24, C.). Der Arrhythmie-Index der Taz KD-Fliegen zeigte sich im Vergleich zur Treiber-Linie leicht signifikant erhöht (Abbildung 24 B.). Die Schlagvolumina wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf. Beim kardialen Auswurf hingegen, zeigte sich der Taz RNAi KK KD leicht verringert im Vergleich zur Kontrollgruppe des Gal-4 Treibers (hellgrau), was auf die größere Abweichung der Herzfrequenz zurückzuführen war (Abbildung 24 E., F.).

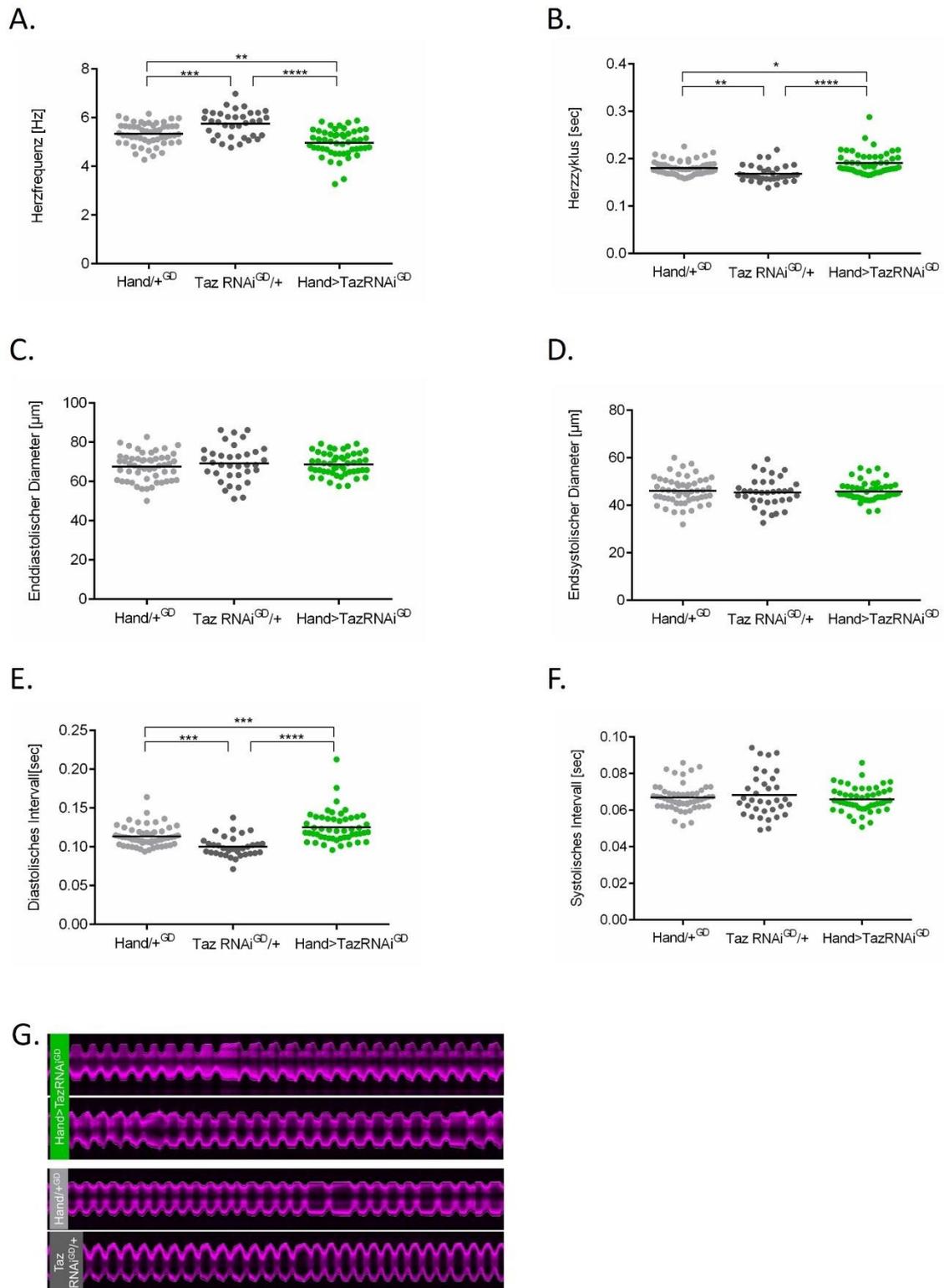




**Abbildung 24 Kalkulierte Parameter aus der Herzfunktionsanalyse bei KD von Taz (KK).** (A-L) Drei Wochen alte Männchen, herzspezifischer Taz-KD (grün, Hand>Taz RNAi<sup>KK</sup>), Kontrollen für RNAi und Treiber in grau. Mittelwert. N=3, n= 50/32/47, einfache Varianzanalyse (One-Way ANOVA), \* p<0.05; AI – Arrhythmie-Index

### 8.1.3 Kardiale Charakterisierung der herzspezifischen Taz -KD-Fliege (GD)

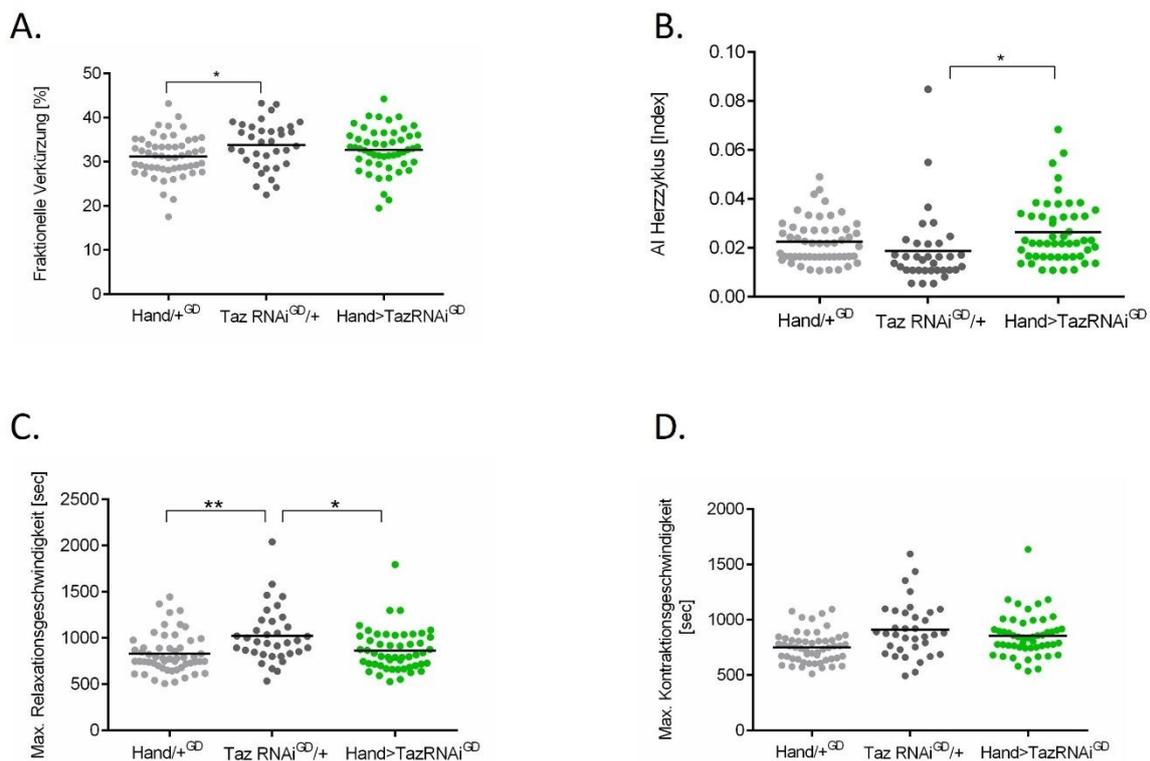
Für die kardiale Charakterisierung der Taz RNAi<sup>GD</sup>-Fliege wurden drei Wochen alte männliche Fliegen verwendet. Die beiden mituntersuchten Kontrollgruppen (Abbildung 25, grau) wurden verwendet, um sicherzustellen, dass weder das RNAi-Konstrukt, noch der Treiber selbst Einfluss auf die Herzfunktion ausübten. Mit Blick auf die hier erhobenen Herzfunktionsparameter zeigt sich, dass sich die beiden Kontrollgruppen nicht immer einheitlich vom Knockdown abhoben: So wiesen die drei Versuchsgruppen hinsichtlich Herzfrequenz, Herzzyklus und diastolischem Intervall alle drei signifikante Unterschiede voneinander auf (Abbildung 25 A., B., E.). Die Diameter der Herzen hingegen wiesen sowohl in der Systole als auch in der Diastole keine Unterschiede voneinander auf. Auch beim Systolischen Intervall gab es keine Abweichungen zwischen den Versuchsgruppen (Abbildung 25 C., D., F.).

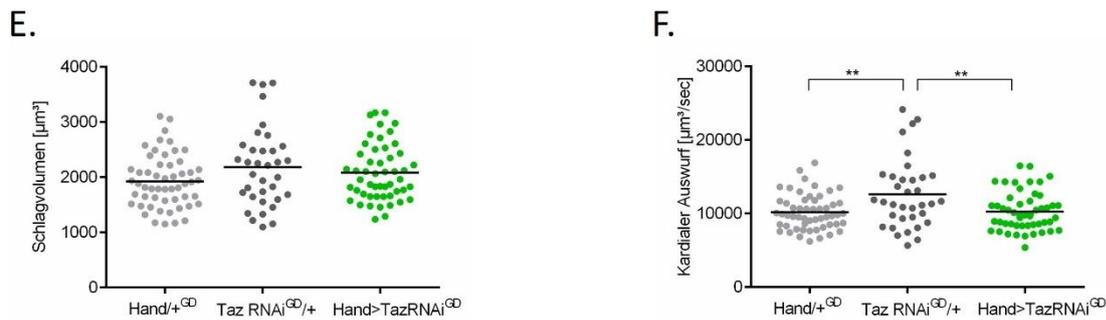


**Abbildung 25 Herzfunktionsanalyse bei KD von Taz (GD).** (A-L) Drei Wochen alte Männchen, Herz- und Muskelspezifischer Tafazzin-Knockdown (grün, Hand>Taz RNAi<sup>GD</sup>), Kontrollen für RNAi in dunkelgrau und Gal-4-Treiber in hellgrau. Mittelwert. N=3, n= 54/35/51, einfache Varianzanalyse (One-Way ANOVA), \*\*\*\* p< 0.0001, \*\*\* p< 0.001, \*\* p< 0.01, \* p<0.05

Die Untersuchung der fraktionellen Verkürzung der Fliegenherzen wies auf signifikante Unterschiede zwischen den beiden Kontrollgruppen hin, wohingegen der KD von den Messwerten zwischen den beiden Gruppen angesiedelt war und sich nicht signifikant von diesen unterschied (Abbildung 26 A.). Hinsichtlich des kardialen Auswurfs und der maximalen Relaxationsgeschwindigkeit zeigte die Kontrollgruppe der RNAi (dunkelgrau) im Vergleich zum KD und zur Treiber-Kontrolle (hellgrau) signifikante Unterschiede (Abbildung 26 C., F.). Der Arrhythmie-Index unterschied sich lediglich zwischen Taz KD und RNAi-Kontrollgruppe, blieb jedoch nicht signifikant im Vergleich zur Treiber-Kontrolle (hellgrau, Abbildung 26 B.).

Zusammengefasst zeigte die Herzfunktionsanalyse des KD von Taz mittels GD RNAi keinen klar abzuhebenden kardialen Phänotyp. Bemerkenswert waren die erfassten Abweichungen innerhalb der Kontrollgruppen.





**Abbildung 26 Kalkulierte Parameter aus der Herzfunktionsanalyse bei Taz-KD (GD).** (A-F) Drei Wochen alte männliche Fliegen mit herzspezifischem Taz-KD (grün, Hand>Taz RNAi<sup>GD</sup>), Kontrollen für RNAi in dunkelgrau und Gal-4-Treiber in hellgrau. Mittelwert. N=3, n= 54/35/51, einfache Varianzanalyse (One-Way ANOVA), \*\* p< 0.01, \* p<0.05; AI - Arrhythmie-Index

Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse der Herzfunktionsanalyse von Fliegen mit Taz-Defizit kein einheitliches Bild hinsichtlich des kardialen Phänotyps. So zeigte beispielsweise die Taz-Mutante eine erhöhte Herzfrequenz, wohingegen der KD von Taz mittels GD RNAi lediglich Unterschiede zwischen den Kontrollen und bei dem KD mittels Taz RNAi KK eine verringerte Herzfrequenz im Vergleich zu beiden Kontrollen detektiert werden konnte. Zur Einordnung der hier zusammengetragenen Ergebnisse der Herzfunktionsanalyse von Fliegen mit Taz-Defizit sind weitere Experimente notwendig.

## 8.2 Cardiolipinsynthese

Den letzten Schritt der CL-Synthese übernimmt die CLS. Um die Rolle der CLS und deren Einfluss auf das Fliegenherz zu verstehen, wurden verschiedene genetisch veränderte *Drosophila* mittels in-vivo Herzfunktionsanalyse untersucht (87). Wie auch in den bereits beschriebenen Versuchen mit Taz-defizienten Fliegen wurden auch hier, einerseits eine CLS-Mutante und andererseits ein herzspezifischer CLS-KD hinsichtlich ihrer Herzfunktion analysiert. Zusätzlich dazu erfolgte die Herzfunktionsanalyse bei gealterten CLS-Mutanten.

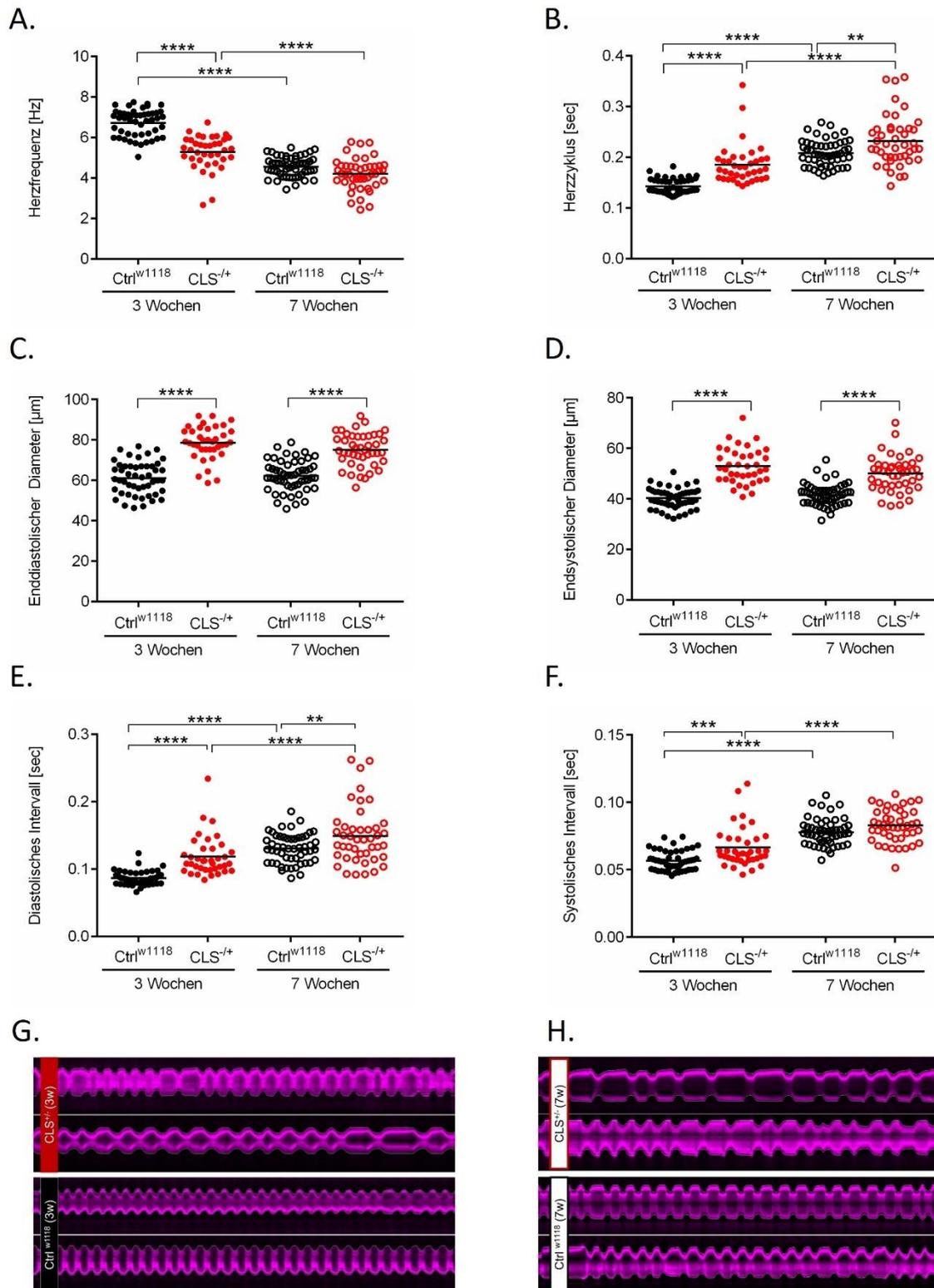
### 8.2.1 Kardiale Charakterisierung der CLS-Mutante

Die Herzfunktionsanalyse von CLS-Mutanten und deren Kontrollen wurde im Alter von drei Wochen durchgeführt. Das entsprach dem adulten Stadium einer Fruchtfliege. Um

zu untersuchen, inwiefern sich der Alterungsprozess auf die Herzfunktion der CLS Mutante und deren Kontrollgruppen auswirkte, erfolgte eine weitere Herzfunktionsanalyse im Alter von sieben Wochen.

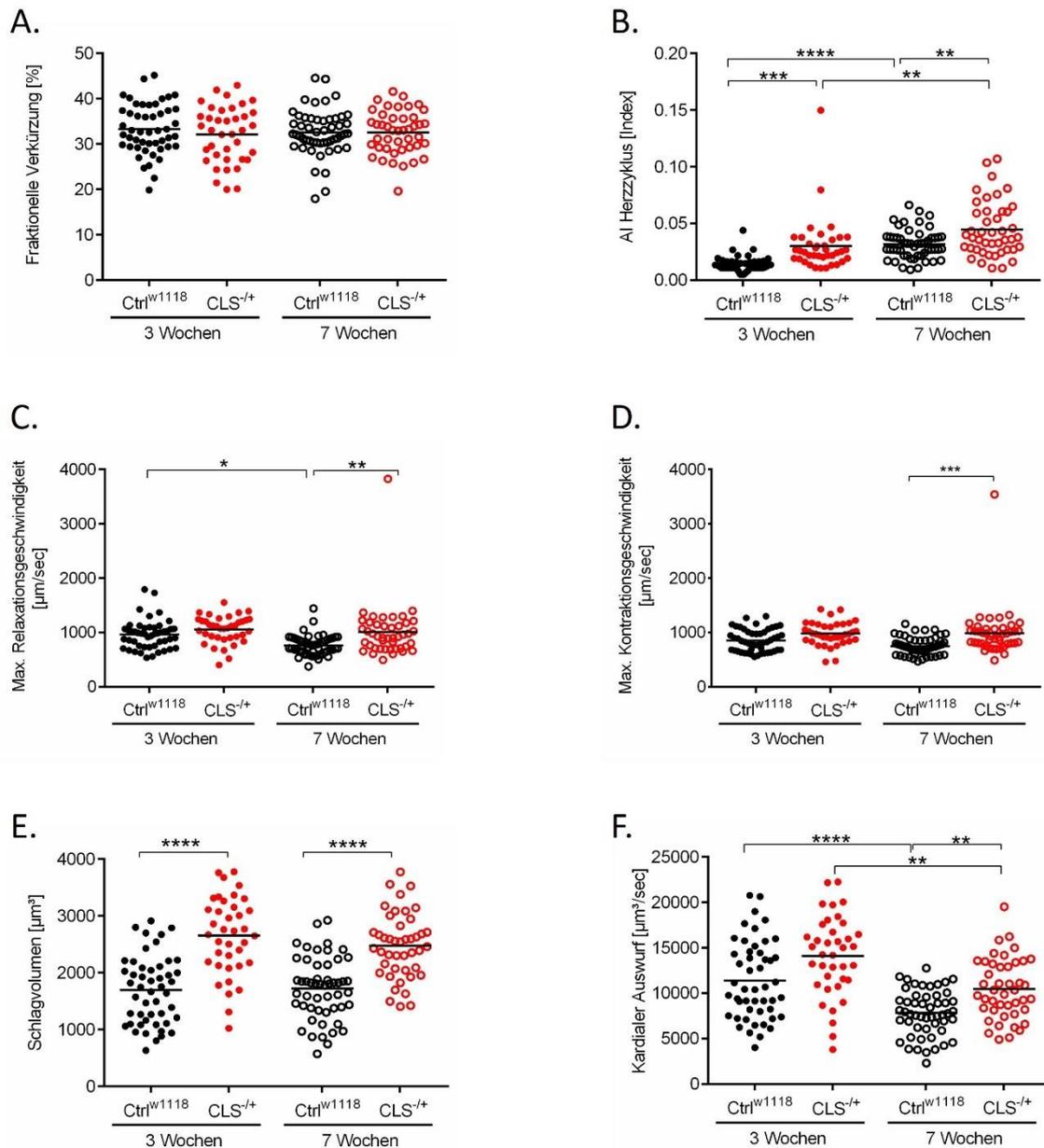
Die drei Wochen alten CLS Mutanten zeigten eine erniedrigte Herzfrequenz bei einem prolongierten Herzzyklus (Abbildung 27 A., B.). Sowohl das verlängerte diastolische Intervall als auch das verlängerte systolische Intervall, trugen zur Verlängerung des Herzzyklus bei (Abbildung 27 E., F.). Weiterhin waren sowohl systolischer, als auch diastolischer Diameter im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (Abbildung 27 C., D.).

Im Vergleich zu den drei Wochen alten Fliegen, zeigten die sieben Wochen alten Fliegen eine weitere Verlangsamung der durchschnittlichen Herzfrequenz, wobei sich hier mit zunehmendem Alter CLS Mutanten und Kontrollen annäherten (Abbildung 27 A.). Die Dauer der Herzzyklen stieg ebenfalls mit dem Alter der Fliegen an und blieb bei den Mutanten auch nach sieben Wochen signifikant langsamer als in der gleichaltrigen Kontrollgruppe (Abbildung 27 B.). Während die Diameter der Herzen im Wesentlichen auch mit zunehmendem Alter gleichblieben, stiegen sowohl die Dauer des systolischen als auch diastolischen Intervalls an (Abbildung 27, C-F.). Die repräsentativen M-Modes verdeutlichen die Verlangsamung der Herzfrequenz und die Verlängerung der Herzzyklen (Abbildung 27 G.).



**Abbildung 27 Herzfunktionsanalyse drei und sieben Wochen alte CLS Mutante. Herzfunktion drei und sieben Wochen alter CLS Mutanten im Vergleich zum Wildtyp.** (A. -F.) Ergebnisse der in-vivo Herzfunktionsanalyse von drei und sieben Wochen alten, männlichen Fliegen mit CLS-Mutation (rot, CLS<sup>-/+</sup>) verglichen zur Kontrollgruppe (schwarz, Ctr<sup>w1118</sup>). N=3, n=49/ 38/ 52/ 44, Mittelwert, zweifache Varianzanalyse (2-way-ANOVA), \*\*\*\* p< 0.0001, \*\*\* p< 0.001, \*\* p< 0.01 (G.) Repräsentative M-Moden drei Wochen alte CLS Mutante und Kontrollen (H.) Repräsentative M-Moden sieben Wochen alte CLS-Mutante und Kontrollen

Die Herzfunktionsanalyse ergab, unabhängig vom Alter, keinen Unterschied zwischen den Gruppen bezüglich der fraktionellen Verkürzung des Herzens (Abbildung 28 A.). Der Arrhythmie-Index der CLS-Mutanten war verglichen zur jeweils gleichaltrigen Kontrollgruppe signifikant erhöht, wobei die sieben Wochen alte CLS-Mutante den höchsten Arrhythmie-Index erreichten (Abbildung 28 B.) Sowohl die Kontraktionsgeschwindigkeit als auch die Relaxationsgeschwindigkeit der sieben Wochen alten CLS Mutanten, unterschieden sich signifikant von ihren Kontrollen. Dies zeigte sich nicht in den drei Wochen alten Versuchsgruppen (Abbildung 28 C., D.). Die Schlagvolumina der CLS-Mutanten zeigten sich sowohl im Alter von drei als auch im Alter von sieben Wochen signifikant höher als die ihrer gleichaltrigen Kontrollgruppe. Da die Diameter der Herzen mit dem Alter nicht zunahmen, blieb auch das Schlagvolumen mit zunehmendem Alter stabil. Durch die Verlangsamung der Herzfrequenz, die in die Berechnung des kardialen Auswurfs miteinflusst, zeigte sich ein signifikanter Abfall des kardialen Auswurfes mit zunehmendem Alter der Fliegen, wobei der kardiale Auswurf der CLS-Mutanten höher war als der der gleichaltrigen Kontrollgruppe.

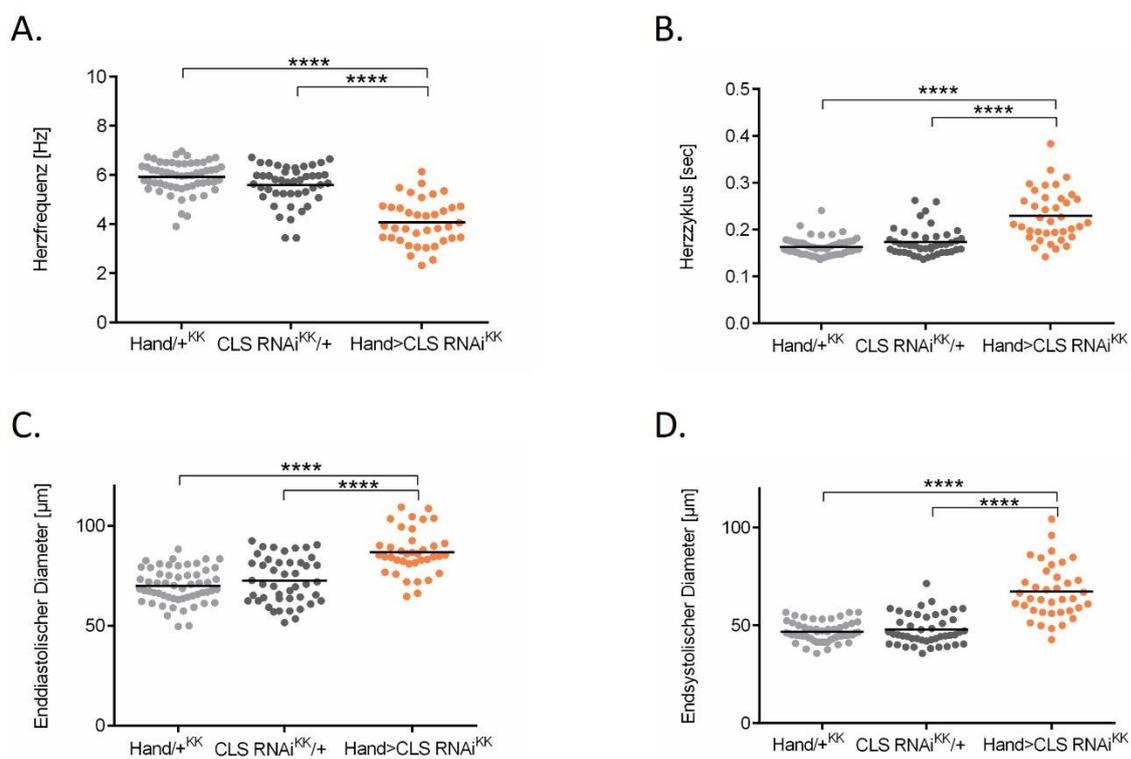


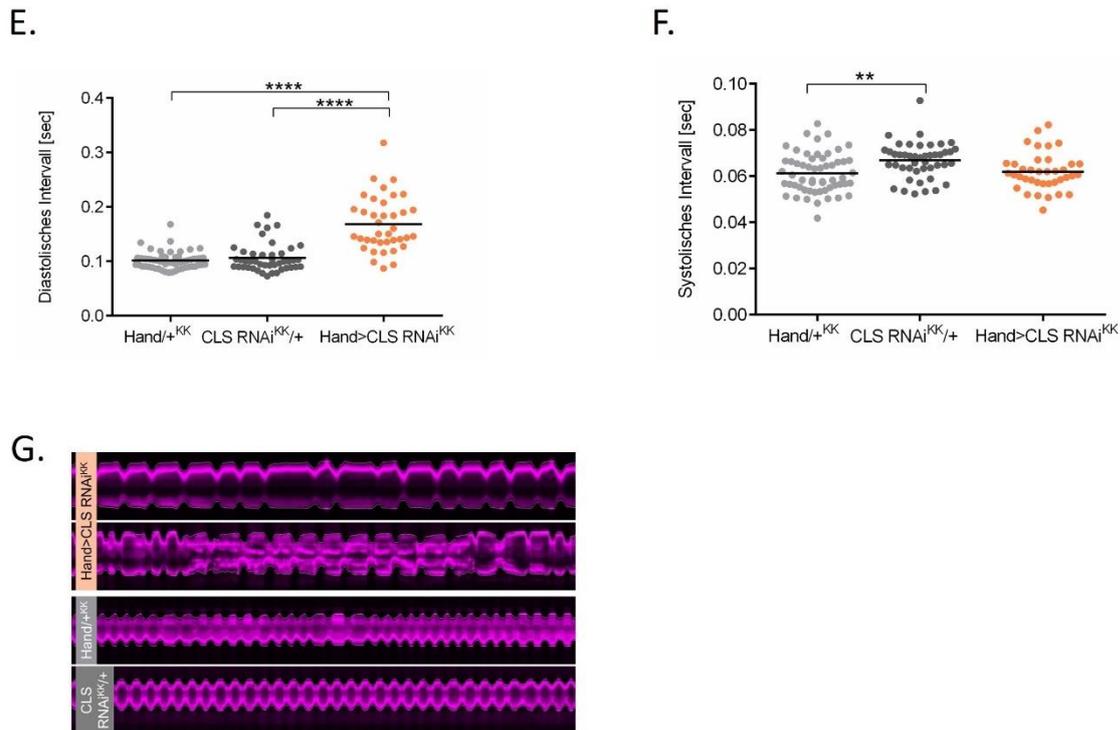
**Abbildung 28** Kalkulierte Parameter aus der Herzfunktionsanalyse von drei und sieben Wochen alten CLS Mutanten. (A. -F.) Ergebnisse der in-vivo Herzfunktionsanalyse von drei und sieben Wochen alten, männlichen Fliegen mit CLS-Mutation (rot, CLS<sup>-/+</sup>) verglichen zur Kontrollgruppe (schwarz, Ctrl<sup>w1118</sup>). N=3, n=49/ 38/ 52/ 44, Mittelwert, zweifache Varianzanalyse (2-way-ANOVA), \*\*\*\* p < 0.0001, \*\*\* p < 0.001, \*\* p < 0.01; AI – Arrhythmie-Index

### 8.2.2 Kardiale Charakterisierung der herzspezifischen CLS-KD-Fliege

In Ergänzung zur Herzfunktionsanalyse der CLS-Mutanten, wurde die Herzfunktionsanalyse ergänzend bei drei Wochen alten *Drosophila* mit herzspezifischem CLS-KD durchgeführt. Die beiden mituntersuchten Kontrollgruppen wurden verwendet, um sicherzustellen, dass weder das RNAi-Konstrukt noch der Treiber selbst, Einfluss auf die Herzfunktion nahmen.

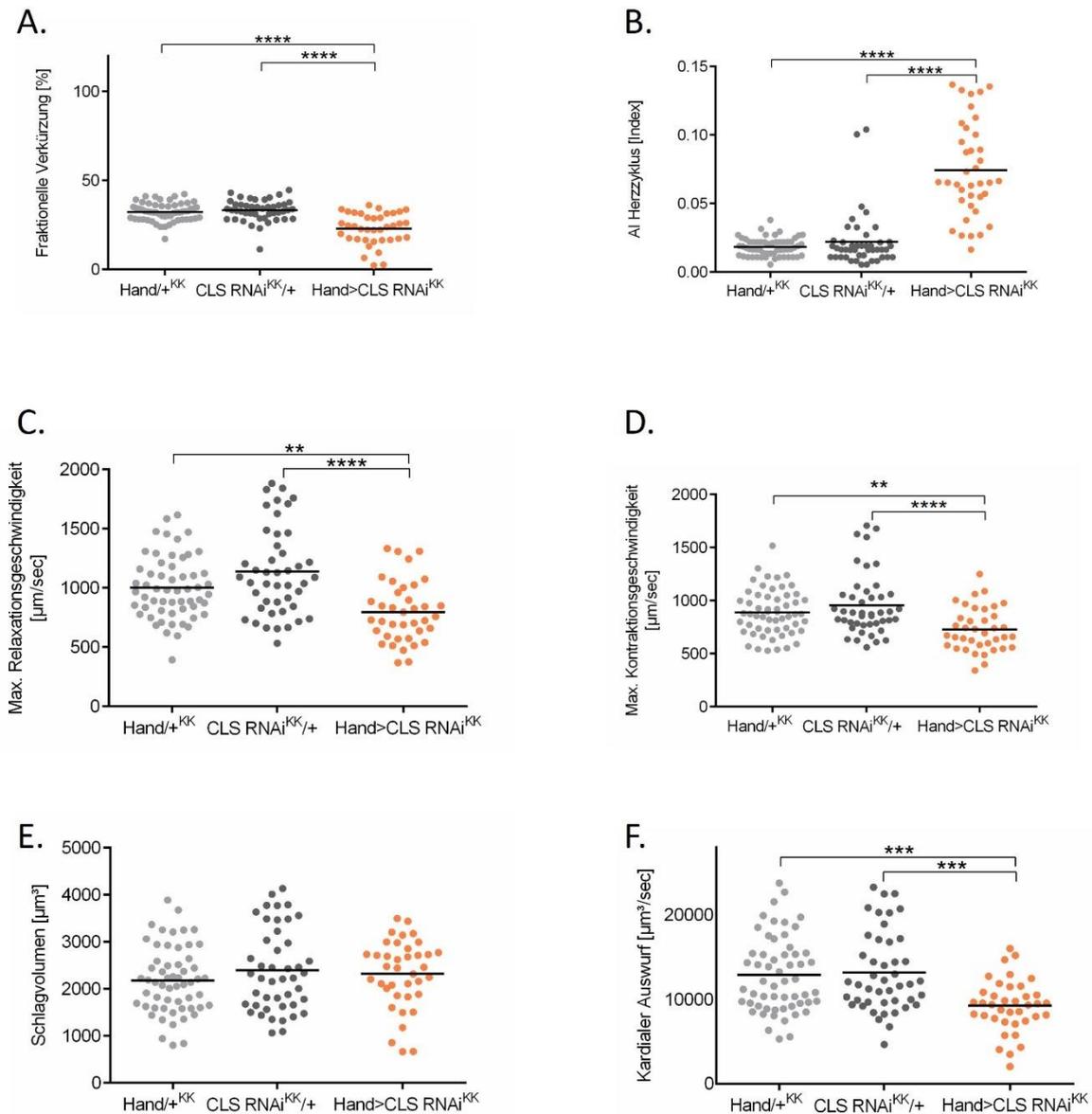
Die Herzfunktionsanalyse der adulten, drei Wochen alten CLS KD-Fliegen (Hand>CLS RNAi<sup>KK</sup>) zeigte eine signifikant verringerte Herzfrequenz (Abbildung 29 A.). Damit einhergehend war ein signifikant verlängerter Herzzyklus der KD-Fliegen im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen messbar (Abbildung 29 B.). Die Daten zeigten, dass die Verlängerung des Herzzyklus auf ein prolongiertes diastolisches Intervall zurückzuführen war. Das systolische Intervall war lediglich zwischen den beiden Kontrollgruppen signifikant verändert (Abbildung 29 E., F.). Sowohl am Ende der Systole als auch am Ende der Diastole wiesen CLS-KD-Fliegen signifikant vergrößerte Herzen auf (Abbildung 29 C., D.). Die in (Abbildung 29 G.) abgebildeten repräsentativen M-Modes verdeutlichen den Unterschied hinsichtlich Größe der Herzen und Dauer des Herzzyklus zwischen den Versuchsgruppen.





**Abbildung 29 Herzfunktionsanalyse CLS Knockdown.** (A-F) Drei Wochen alte männliche Fliegen mit CLS-KD (orange, Hand>CLS RNAi<sup>KK</sup>), Kontrollen für RNAi (dunkelgrau) sowie Treiber für RNAi (hellgrau). Mittelwert. N=4, n= 57/ 45 /38, einfache Varianzanalyse (One-Way ANOVA), \*\*\*\* p< 0.0001, \*\*\* p< 0.001, \*\* p< 0.01 (G.) Repräsentativ ausgewählte M-Modes

Die fraktionelle Verkürzung der CLS-KD-Fliegen zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verringert (Abbildung 30 A.). Der errechnete Arrhythmie-Index zeigte, dass die Knockdown-Fliegen hier einen deutlich erhöhten Index verglichen mit ihren Kontrollgruppen aufwiesen (Abbildung 30 B.). Sowohl die Kinetik von Kontraktion als auch Relaxation, zeigten eine Verlangsamung des CLS-KD im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen (Abbildung 30 C., D.). Die Kalkulation von Schlagvolumen und kardialen Auswurf aus den erhobenen Parametern, ergab ein vergleichbares Schlagvolumen, sowie eine signifikante Reduktion des kardialen Auswurfes für den CLS-KD. Dies war darauf zurückzuführen, dass die Herzen des CLS KD zwar insgesamt größer waren, jedoch die absolute Verkürzung im Rahmen der Kontraktion deutlich geringer ausfiel, was die reduzierten Verkürzungsfraction abbildete (Abbildung 30 A.). Zusätzlich senkt die verringerte Herzfrequenz den kardialen Auswurf pro Zeiteinheit.



**Abbildung 30** Kalkulierte Parameter aus der Herzfunktionsanalyse des CLS KD. (A-F) Drei Wochen alte männliche Fliegen mit CLS-KD (orange, Hand>CLS RNAi<sup>KK</sup>), Kontrollen für RNAi (dunkelgrau) sowie Treiber (hellgrau). Mittelwert. N=4, n= 57/ 45 /38, einfache Varianzanalyse (One-Way ANOVA), \*\*\*\* p< 0.0001, \*\*\* p< 0.001, \*\* p< 0.01; AI – Arrhythmie-Index

Zusammenfassend zeigte sich in der Herzfunktionsanalyse, dass eine CLS-Verringerung, unabhängig ob durch einen KD oder eine Mutation erzeugt, zu einem kardialen Phänotyp führte. Dieser charakterisierte sich primär durch eine Verlangsamung der Herzfrequenz und eine Zunahme der Herzzeitintervalle. Zudem zeigte sich eine Vergrößerung der Herzen mit, systolischer und diastolischer Funktionsstörung und eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Arrhythmien.

### **8.3 Weiterführende Charakterisierung CLS Mutante**

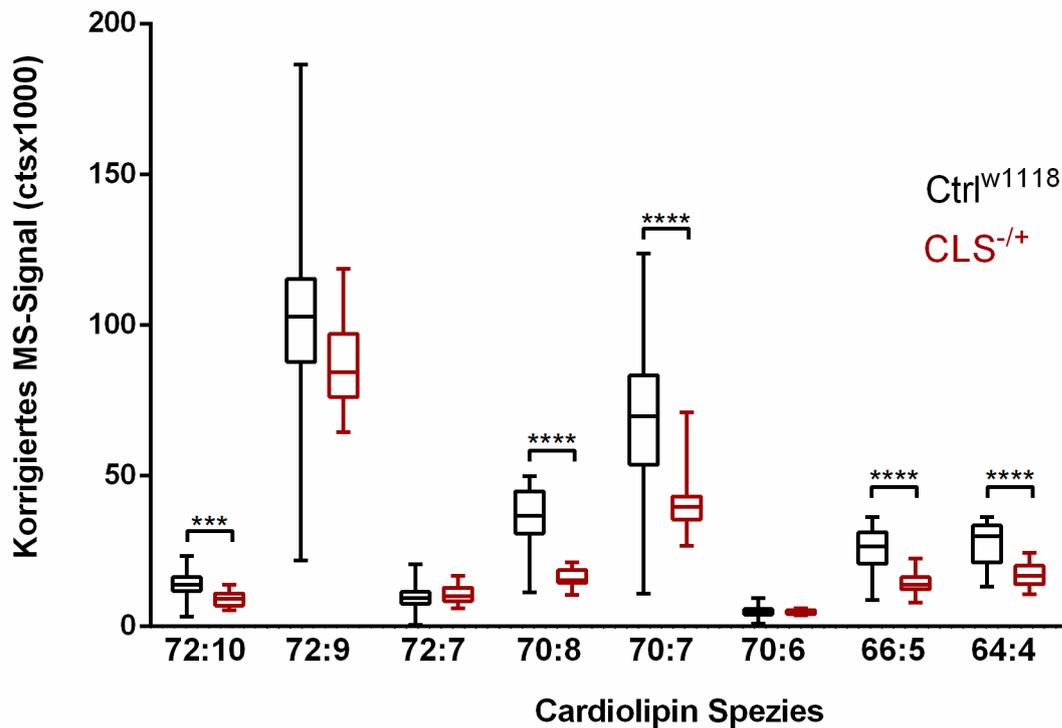
Die Ergebnisse der Herzfunktionsanalyse von Fliegen mit CLS-Defizit ergab einen deutlichen, mit CLS-Defizit assoziierten kardialen Phänotypen. Die Auswirkungen einer CLS Mutation auf die Fliege wurden mit den folgenden Versuchen weiter charakterisiert.

#### **8.3.1 Lipidomanalyse der CLS-Mutante**

Um herauszufinden, ob die in den Experimenten verwendeten heterozygoten CLS-Mutanten signifikant verringerte CL aufweisen und so der Rückschluss möglich ist, dass die Ergebnisse der Herzfunktionsanalyse in Zusammenhang mit reduzierten CL-Spiegeln zu betrachten sind, wurde eine Massenspektrometrie-basierte Lipidomanalyse in der Gesamtflye durchgeführt.

Die massenspektrometrische Lipidomanalyse, welche in Kooperation mit Carsten Jaeger vom Bundesinstitut für Materialforschung erfolgte, zeigte eine teils signifikante Reduktion von CL-Spezies bei CLS-Mutanten im Vergleich zur Kontrollgruppe (s. Abbildung 31). Insbesondere die Subtypen 72:10, 70:8, 70:7, 66:5 und 64:4 zeigten sich signifikant verringert. Die Reduktion betraf fünf der acht gemessenen CL-Spezies signifikant.

Zusammengefasst konnte die Lipidomanalyse bestätigen, dass die Mutation des CLS-Gens auch im heterozygoten Zustand zu einer signifikanten Reduktion verschiedener CLS-Spezies führte.



**Abbildung 31 Massenspektrometrische Bestimmung der CL-Spezies in CLS-Mutanten (rot) und Kontrollfliegen (schwarz).** Die dargestellte Subklassifizierung der CL in beispielsweise CL 72:10, bedeutet, dass dieses CL 72 Kohlenstoffatome und zehn Doppelbindungen in seinen Acylgruppen besitzt. Die Reduktion der CL betrifft mit fünf der acht gemessenen CL-Spezies einen großen Anteil der CL. Pro Gruppe wurden je drei Fliegen zu einer Probe zusammengelegt. Pro Genotyp wurden 18 bzw. 17 Proben analysiert. Statistische Analyse: ungepaarter T-Test. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$

### 8.3.2 Mitochondriale Funktion der CLS-Mutante

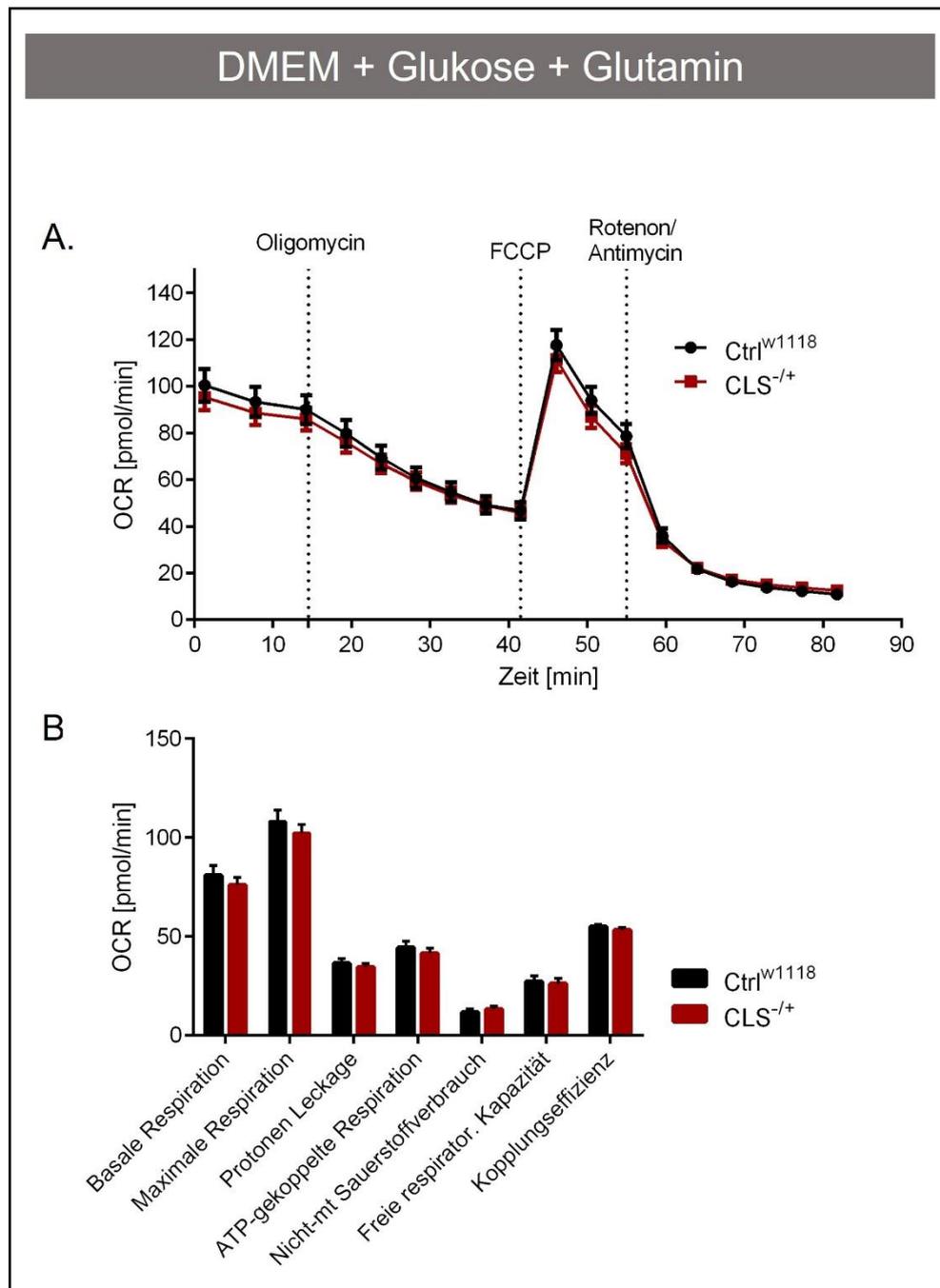
Die mitochondriale Atmung und die daraus resultierende Produktion von ATP stellt den Hauptweg der Energiegewinnung von nahezu allen Zellen dar. CL sind spezifisch in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. Dort stabilisieren sie unter anderem die Komplexe der Atmungskette und verringern den Anfall von ROS (105). Es sollte daher untersucht werden, inwiefern die reduzierten CL den Energiehaushalt der Kardiomyozyten beeinflussen. Eine gängige Methode, um mit der Messung von Sauerstoffverbrauch und extrazellulärer Ansäuerung – welche Rückschlüsse auf Lactatproduktion und damit auf die Glycolyse ermöglicht – die beiden hauptsächlichen Wege der Energiegewinnung von Zellen zu erfassen, ist der Seahorse XFe Analyzer von Agilent. Im Besonderen entwickelten wir dafür eine Präparationstechnik (vgl. Kapitel 4.5.1) von *Drosophila*, um das intakte, schlagende Fliegenherzen zu untersuchen (106).

Im Verlauf des Assays wurden, nach der Erfassung der basalen Respiration, schrittweise die Komplexe der Atmungskette inhibiert (vgl. Kapitel 7.5), womit die maximale

Respiration, Protonen Leakage, ATP-abhängige Atmung, nicht mitochondriale Atmung und die Kopplungseffizienz ermittelt werden konnten.

Das Experiment wurde zunächst in einer Nährlösung aus DMEM, Glucose und Glutamin durchgeführt. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den CLS-Mutanten und ihren Kontrollgruppen (Abbildung 32): Die Messwerte für die basale Respiration waren annähernd identisch. Auch auf Stress reagierten die Mitochondrien der CLS-Mutante und ihre Kontrollen mit einer ähnlichen maximalen Respiration. Hinsichtlich Protonen Leakage, freier respiratorischer Kapazität und ATP-gekoppelter Respiration zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Der nicht-mitochondriale Sauerstoffverbrauch lag bei beiden Gruppen in einem ähnlichen Bereich.

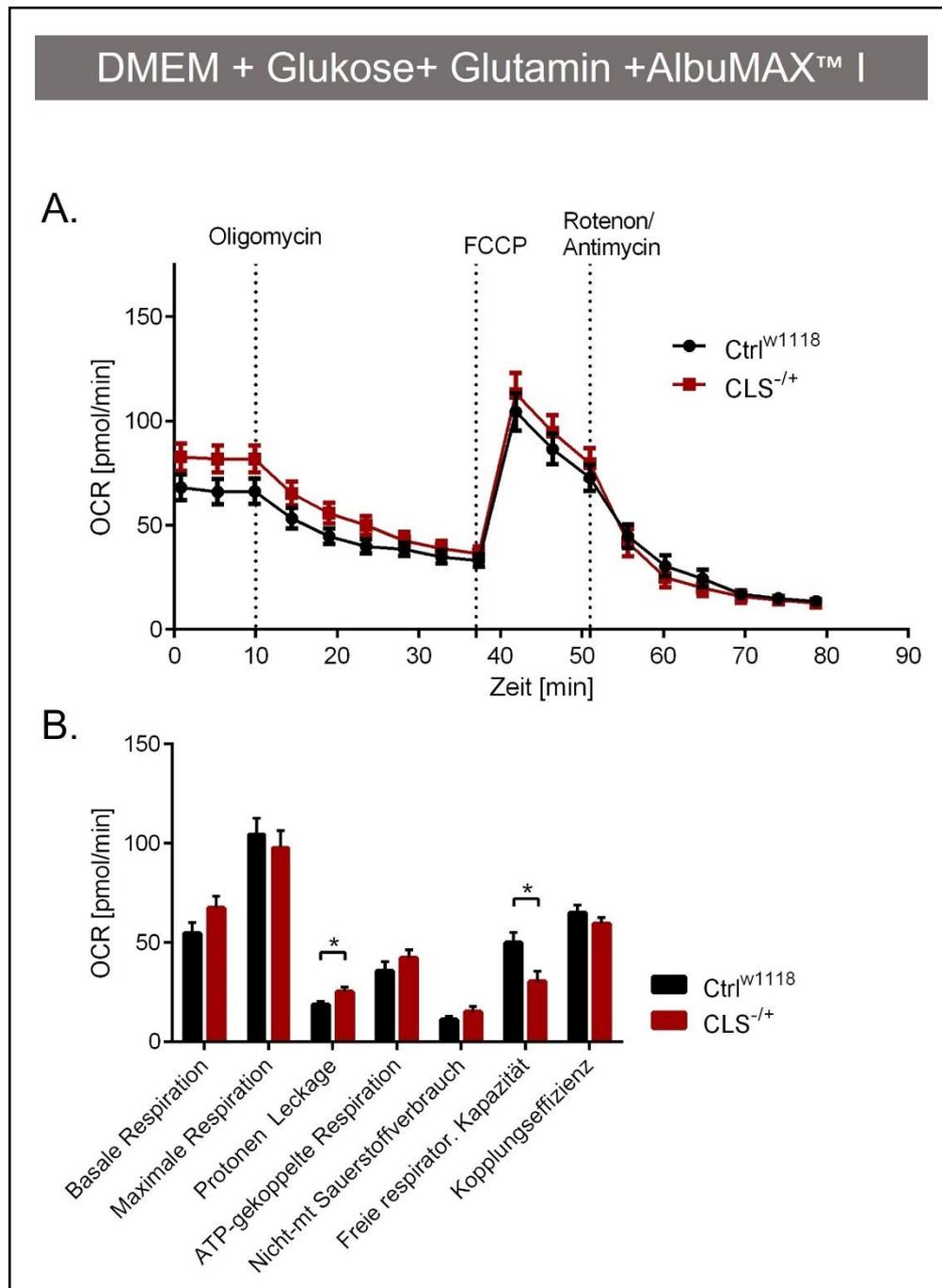
Zusammengefasst zeigten diese Messungen zwar stabile Messwerte, es konnten jedoch keine Unterschiede in der mitochondrialen Funktion zwischen CLS-Mutante und Kontrollfliegen herausgearbeitet werden.



**Abbildung 32 Mitochondriale Funktionsmessung in Herzen der CLS-Mutante und Kontrollfliegen.** Versuchsmedium mit Glucose, DMEM und Glutamin. Konzentration der Inhibitoren: Oligomycin: 10  $\mu$ M; FCCP: 5 $\mu$ M Rotenon/Antimycin: je 2,5  $\mu$ M. N=4 bei n=65 Fliegen Ctrl<sup>w1118</sup> und n=66 Fliegen CLS<sup>-/+</sup>, keine Signifikanzen mit ungepaartem T-Test

Fettsäuren sind in vivo die Hauptenergiequellen des Herzens. Dies wurde in den bisherigen Messungen mit der Wahl des Mediums, welches lediglich Glutamin und Glukose als Energiesubstrate enthält nicht berücksichtigt. Daher ergänzten wir das Medium um 1 mg/ml lipidreiches Bovines Serumalbumin (AlbuMAX™) (107). Hierunter grenzten sich die beiden Versuchsgruppen etwas deutlicher voneinander ab. Während sich der überwiegende Teil der Messungen, wie die basale Respiration, ATP-

gekoppelte Respiration, maximale Respiration und nicht-mitochondrialer Sauerstoffverbrauch nicht signifikant voneinander unterschieden, so zeigte sich bei der Protonen-Leckage und der freien respiratorischen Kapazität eine signifikante Tendenz.

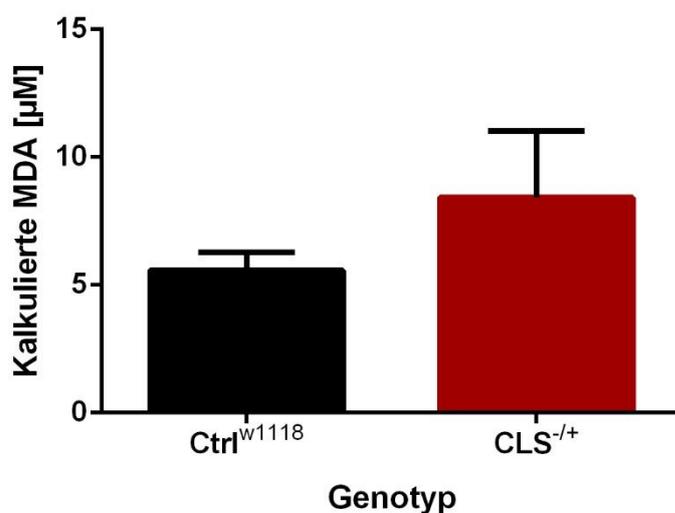


**Abbildung 33 Mitochondriale Funktionsmessung in Herzen der CLS-Mutante und Kontrollfliegen mit Lipidreichem Serum.** Versuchsmedium mit DMEM, Glutamin, Glukose und AlbuMAX™ I, Konzentration der Inhibitoren: Oligomycin: 10  $\mu$ M; FCCP: 5 $\mu$ M; Rotenon/Antimycin: je 2,5 $\mu$ M. N=2 bei n= 30 Fliegen Ctrl<sup>w1118</sup> und n=31 Fliegen CLS-Mutante.  $\pm$ SEM. ungepaarter T-Test, \*p  $\geq$ 0.05

### 8.3.2.1 TBARS

Die Entstehung von ROS in der Zelle aufgrund von oxidativem Stress hat weitreichende Folgen. An der inneren Mitochondrienmembran mit den Komplexen der Atmungskette und dem hohen Aufkommen an Elektronentransport fallen naturgemäß ROS an. CL nehmen hier eine protektive Funktion ein. Sie umgeben die Komplexe der Atmungskette und dienen durch ihren hohen Grad an ungesättigten Fettsäuren als eine Art Puffer, für die lokal anfallenden ROS in Mitochondrien. Reagieren ROS mit ungesättigten Fettsäuren, so spricht man von Lipidperoxidation. Inwiefern sich die Lipidperoxidation zwischen *Drosophila* mit CLS Defizit von ihren Kontrollen unterscheidet, sollte mit dem TBARS Assay ermittelt werden. Durch eine kolorimetrische Messung wird die Menge der Lipidperoxidation bestimmt, welche Rückschlüsse auf die ROS-Konzentration zulässt.

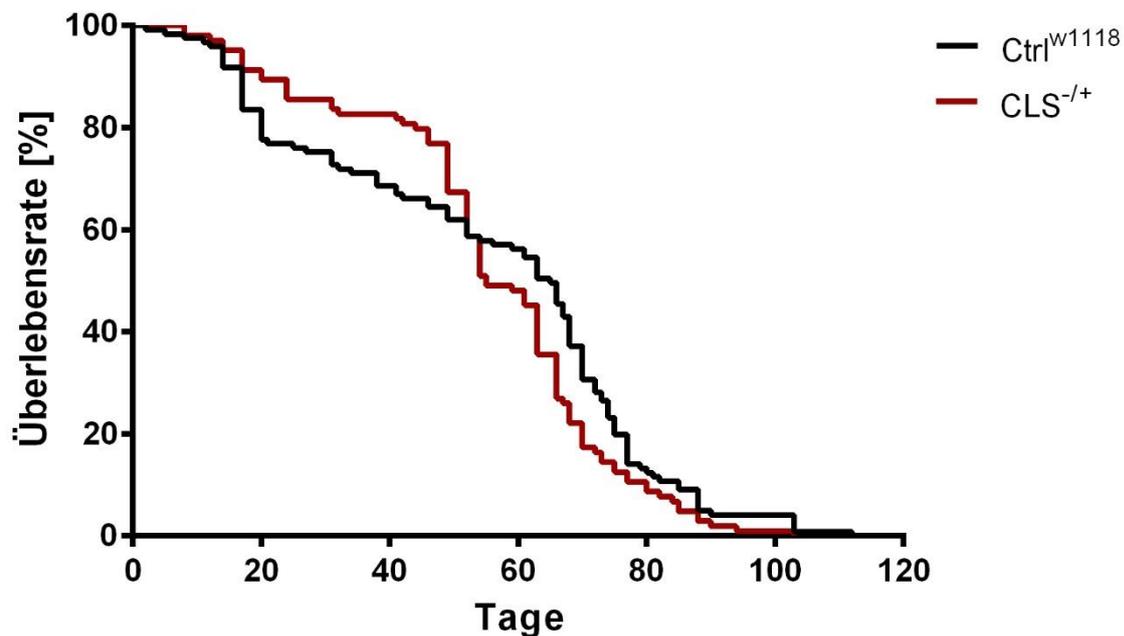
In der hier bislang einmal durchgeführten Messung von CLS-Mutanten ergab sich eine nicht-signifikante Tendenz dahingehend, dass CLS-Mutanten leicht höhere Werte für Malondialdehyd aufwiesen, was im Umkehrschluss auf ein höheres Level Lipidperoxidation hinweisen würde. Um die Tendenz statistisch zu sichern, wäre eine erneute Durchführung des Versuchs notwendig. Während sich die Messung der mitochondrialen Funktion im vorangegangenen Abschnitt ausschließlich auf die Mitochondrien des Fliegenherzens bezog, beziehen sich die im Rahmen dieses Experimentes erfassten Daten auf die gesamte Fliege.



**Abbildung 34 Lipidperoxidation in CLS-Mutanten und Kontrollen.** N=1, n= 4 Gruppen mit je 30 männlichen Fliegen pro Gruppe, der ungepaarte T-Test zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, dargestellt sind Median  $\pm$ SEM. Die Kolorimetrische Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 535nm. MDA - Malondialdehyd

### 8.3.3 Langzeitüberleben der CLS-Mutante

Die Herzfunktionsanalyse der CLS-Mutanten wies darauf hin, dass die CLS-Mutation Auswirkungen auf die Herzfunktion der betroffenen Fliegen hatte. Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, ob nicht nur die Herzfunktion, sondern auch das Langzeitüberleben der Fliegen von der CLS-Mutation betroffen ist. Beim hierfür durchgeführten Experiment zur Überlebensdauer zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Langzeitüberleben der CLS-Mutanten verglichen mit der Kontrollgruppe.



**Abbildung 35** Langzeitüberleben von CLS Mutante und Kontrollgruppe. Die Meier-Kaplankurve zeigt die Überlebensrate von CLS Mutanten (männlich, n=104) im Vergleich zur Kontrollgruppe (männlich, n=122) bei normalen Zuchtbedingungen über die Zeit. Die Anzahl der lebenden Fliegen wurde dreimal wöchentlich dokumentiert. Der Log-Rank-Test ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen.

## 9 Diskussion

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von CL auf die Funktion des Fliegenherzens zu untersuchen. Hierfür wurden zwei zentrale Schritte, einerseits der letzte CL-Syntheseschritt durch die CLS und andererseits das CL-Remodeling durch Taz blockiert. Anschließend wurde die Herzfunktion der jeweiligen Fliegen untersucht. Hierbei zeigte sich im Wesentlichen keine konsistente Veränderung der Herzfunktion unter dem Einfluss von Taz. Die Reduktion von CLS hingegen führte zu einem kardialen Phänotyp, der sich durch eine erniedrigte Herzfrequenz, vergrößerte Herzen, Einschränkung der kardialen Funktion und eine erhöhte Anfälligkeit für Arrhythmien auszeichnet. Die weiterfolgende Charakterisierung der CLS-defizienten Fliegen zeigte einen weiteren Abfall der Herzfunktion mit zunehmendem Alter, jedoch keine Unterschiede im Langzeitüberleben verglichen mit den Kontrollfliegen. Massenspektrometrisch konnte eine signifikante Reduktion von CL in der untersuchten CLS Mutante nachgewiesen werden. Eine mitochondriale Funktionsanalyse des Fliegenherzens durch die Seahorse-Methode zeigte ein vergrößertes Protonen-Leck und eine geringere freie respiratorische Kapazität von CLS Mutanten im Vergleich zu ihren Kontrollen.

Zusammengefasst zeigten die hier vorliegenden Ergebnisse, dass CLS einen Einfluss auf die Herzfunktion von *Drosophila* hat, jedoch sind weitere Untersuchungen notwendig, um den zugrunde liegenden Mechanismus im Detail aufzuklären.

### 9.1 *Drosophila* als Modellorganismus in der kardiovaskulären Forschung

Steht, wie beispielsweise im Rahmen des Barth Syndroms, ein spezifisches Gen im Verdacht, eine Erkrankung auszulösen, ist *Drosophila* ein passender Modellorganismus, um diesen Verdacht zu konkretisieren. Groß angelegte Screenings können mit der Fruchtfliege kostengünstig und schnell durchgeführt werden. Dabei ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass ein Gen, welches zu einer Erkrankung im Menschen beiträgt, einen entsprechenden Phänotyp in der Fliege zufolge hat, denn 75% der humanen krankheitsverursachenden Gene verfügen über ein Ortholog in *Drosophila* (61). Gleichzeitig mangelt es dem *Drosophila*-Genom an genetischer Redundanz. Dies hat zur Folge, dass die Fliege den Ausfall eines Gens oder den Defekt eines Genproduktes, anders als beim Menschen, der über ein redundantes Genom verfügt, nicht kompensieren kann. So tritt ein Phänotyp in der Fliege in der Regel viel stärker zutage, als

im Menschen (108). *Drosophila* eignet sich daher hervorragend, um das Zusammenspiel aus Genetik und Metabolismus zu untersuchen. Das Fliegen-genom verfügt einerseits über zahlreiche Parallelen zum Menschen, andererseits ist es weniger komplex, wodurch sich Mechanismen schneller identifizieren lassen, die sich dann auf ein komplexeres System wie den Menschen übertragen lassen (61). Dennoch muss die Forschung an Fruchtfliegen in dem Wissen erfolgen, dass der Mangel an genetischer Redundanz auch eine Limitation des Modellorganismus *Drosophila* darstellt. Aufgrund der Redundanz verfügen Vertebraten über spezifische Mechanismen der Genregulation, welche an der Fliege nicht untersucht werden können. Das Herz der Fliege ist zwar deutlich weniger komplex als das eines Vertebraten, doch sowohl in der embryonalen Entwicklung als auch funktionell gibt es viele Gemeinsamkeiten (61). Die Transkriptionsfaktoren, die zur Spezifikation von Kardiomyozyten führen, sind ähnlich. Während *tinman* die Differenzierung von Kardiomyozyten von *Drosophila* reguliert, so wurde der *Nkx2.5* als Ortholog für diesen Spezifikationsprozess in Vertebraten identifiziert (109). Fehlt *tinman* in *Drosophila*, so hat dies zur Folge, dass keine Differenzierung des Herzschlauches in der embryonalen Entwicklung von *Drosophila* stattfindet (109). Ein Defekt des orthologen *Nkx2.5*-Gens ist eine Ursache für kongenitale Herzfehler bei Menschen, die beispielsweise zu einem atrialen Septumdefekt führen können (110). Aufgrund dieser genetischen Zusammenhänge hat sich *Drosophila* in der Erforschung von kardialen Erkrankungen etabliert (111,112). Eine Einschränkung hinsichtlich der Verwendung von *Drosophila* als Modell für kardiale Erkrankungen bleibt die koronarienunabhängige Sauerstoffversorgung des Herzens im Kontrast zu Vertebraten (61).

Die hier verwendete fluoreszenzbasierte Videomikroskopie (87) ermöglicht die kardi-ale Untersuchung großer Versuchsgruppen. Ist die Etablierung der Methode erfolgt, nimmt die eigentliche Messung der Herzfunktion nur wenige Sekunden pro Individuum in Anspruch. Die zu untersuchenden Fliegen werden für die Mikroskopie am Rücken fixiert, sind aber ansonsten keiner Manipulation ausgesetzt, die die Untersuchungsergebnisse beeinflussen kann. Bei der Durchführung der Mikroskopie sind die Fliegen wach und nicht anästhesiert. Die Chancen der neuartigen in vivo Herzfunktionsanalyse (87), gegenüber der anderen Formen der Herzfunktionsanalyse (62,86) liegen im einfachen Versuchsaufbau und damit einhergehend der geringen Anfälligkeit für Störungen der Messung durch untersucherbedingte Manipulation. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind sehr gut reproduzierbar und durch ihre hohe Auflösung sind die hier

entstehenden Sequenzen dafür geeignet, auch die dynamische Bewegung des Herzens im Kontraktionszyklus nachzuverfolgen. Es ist zudem denkbar, mit weiteren in die Fliege eingebrachten Fluoreszenzkonstrukten wie beispielsweise mit GFP- $\alpha$ -Aktinin nicht nur das Herz als Gesamtes, sondern weitere Details wie in diesem Fall Sarkomere sichtbar zu machen. Diese könnten in vivo mittels dem hochauflösenden, im Rahmen dieser Methode gewonnenen Bildmaterial im Verlauf des Herzzyklus zu beobachten und analysiert werden (87).

Mit der Möglichkeit der in-vivo Herzfunktionsanalyse, wie sie von Klassen et al. (87) entwickelt wurde, können große Versuchsgruppen im Rahmen eines Screenings gut reproduzierbar und detailliert hinsichtlich ihrer Herzfunktion untersucht werden. So wird der Verwendung von *Drosophila* als Modell zur Identifikation neuer Regulationsmechanismen und genetisch bedingten Erkrankungen in Herzkreislauf-Erkrankungen trotz ihrer Limitationen weitere Bedeutung verliehen.

## 9.2 Tafazzin

Taz nimmt in der Konfiguration von reifem CL die Schlüsselposition des Remodeling ein. Das Remodeling durch Taz ist der am ausführlichsten untersuchte Teilschritt der CL-Synthese. Die Auswirkungen eines Taz-Defizits auf die Herzfunktion von *Drosophila* wurden jedoch bislang nicht im Detail untersucht. Die hier mittels in vivo Fluoreszenzmikroskopie durchgeführte Herzfunktionsanalyse wurde sowohl für eine Taz-Mutante, welche aufgrund einer Exzision im Taz-Gen kein vollständig transkribierte Taz-RNA aufweist (60), als auch für einen herzspezifischen Taz-KD angewandt, der im Rahmen dieser Arbeit generiert wurde.

Die Herzfunktionsanalyse der Taz -Mutante ergab einen signifikanten Anstieg der Herzfrequenz, sowie eine Verkürzung des diastolischen Intervalls und einer erhöhten Relaxationsgeschwindigkeit. Dies führte zu einer Verkürzung des gesamten Herzzyklus. Zudem war der enddiastolische Durchmesser der Herzen von Taz-Mutanten im Vergleich zu ihren Kontrollen erhöht. Daraus resultierend zeigten sich erhöhte Schlagvolumen und ein vergrößerter kardialer Auswurf der Taz-Mutanten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bislang sind keine Studien bekannt, die die Herzfunktion von adulten Taz-mutierten *Drosophila* untersuchten. Xu et al. konnten in von ihnen untersuchten Taz-mutierten *Drosophila* im frühen verpuppten Stadium zeigen, dass kein Unterschied hinsichtlich der Herzfrequenz von Taz-mutierten Puppen im Vergleich zu Kon-

trollgruppen nachweisbar war (60). Da diese Untersuchungen in einem anderen Entwicklungsstadium und mit einer anderen Methode erfolgten, lässt sich keine Verbindung zu den Daten der hier vorliegenden Arbeit herstellen. Die hier erhobenen Messwerte wurden mit der von Xu publizierten, im Rahmen seiner Experimente homozygot verwendeten Taz-Mutante durchgeführt (60). Die Charakterisierung der Fliege zeigte, dass diese im homozygoten Zustand ein massenspektrometrisch gemessenes, signifikantes CL-Defizit aufweist (60). Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode der Herzfunktionsanalyse erforderte das Einkreuzen eines Fluoreszenztreibers in das Fliegen-genom. Dies hatte zur Folge, dass die hier untersuchten Fliegen heterozygot für die Mutation von Taz waren. Im Rahmen ihrer Versuche konnten Xu und Kollegen zeigen, dass heterozygote Taz-Mutanten keine Verringerung der totalen CL-Menge im Vergleich zur Kontrollgruppe aufwiesen (60). Wenngleich im Rahmen dieser Arbeit die CL-Levels der Taz-Mutanten nicht bestimmt wurden, legte die Arbeit von Xu et al. die Vermutung nahe, dass auch die hier generierten heterozygoten Taz-Mutanten unveränderte CL-Levels hatten. Dies könnte erklären, weshalb das Herz kaum funktionelle Verschlechterungen aufwies. Aufschlussreich wäre in diesem Fall die Generierung einer homozygoten Taz-Mutante mit kardialem Fluoreszenzkonstrukt, um die in vivo Herzfunktionsanalyse auch für diese Fliegen durchführen zu können.

Der ausgeprägte, durch homozygote Taz-Mutation bedingte Phänotyp in *Drosophila* zeigte sich durch eine reduzierte Muskelfunktion, die sich in einer signifikant geringeren negativen Geotaxis, der Fähigkeit gegen die Schwerkraft nach oben zu klettern, äußerte (60). Zusätzlich wiesen die elektronenmikroskopisch untersuchten Flugmuskeln in signifikanter Menge pathologisch aussehende Mitochondrien auf, die sich durch verdichtete Cristae in der inneren Mitochondrienmembran darstellten (60). Diese Ergebnisse machen deutlich, welche zentrale Rolle Taz und CL für die Funktion der Muskeln in *Drosophila* einnehmen. Es kann vermutet werden, dass auch die Herzfunktion bei homozygoten Taz-Mutanten eingeschränkt ist. Um die Auswirkung der heterozygoten Taz-Mutation im Vergleich zur homozygoten Fliege zu charakterisieren, wären Untersuchungen zur negativen Geotaxis sowie die Charakterisierung der mitochondrialen Morphologie und Funktion im Fliegenherz sinnvoll.

Um die kardialen Auswirkungen eines Taz-Defizites und damit einhergehend CL-Mangels genauer zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit ergänzend zur Taz-Mutante zwei verschiedene herzspezifische Taz-KDs generiert. Diese wurden ebenfalls mit Fluoreszenzmikroskopie hinsichtlich ihrer Herzfunktion untersucht. Die

beiden KDs unterschieden sich in der Lokalisation der Interferenz-RNA auf dem Genom, gekennzeichnet durch KK und GD (s. Methodenteil). Im Taz RNAi KK-KD zeigten sich mehrere der erhobenen Parameter, darunter Herzfrequenz, Herzzyklus, Diastolisches Intervall, maximale Relaxationsgeschwindigkeit, Arrhythmie-Index, sowie der kardiale Auswurf dahingehend inkonsistent, dass sich jeweils nur eine der beiden Kontrollgruppen signifikant vom Taz RNAi KK-KD unterschied. Im Fall der Herzfrequenz zeigten sich alle drei Gruppen signifikant unterschiedlich voneinander.

Der KD mittels GD-Interferenz RNA (RNAi) zeigte für die Parameter Herzfrequenz, Herzzyklus, Diastolisches Intervall, Arrhythmie-Index und kardialen Auswurf signifikante Unterschiede zwischen allen drei Gruppen. Die Fraktionelle Verkürzung wies lediglich einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Kontrollgruppen auf. Beim kardialen Auswurf und der maximalen Relaxationsgeschwindigkeit hoben sich eine Kontrolle und der KD signifikant von der anderen Kontrolle ab.

Die Kontrollgruppen bei einem KD dienen dazu, zu überprüfen, ob das RNAi-Konstrukt selbst, auch ohne Aktivierung durch das Gal4-Protein Einfluss auf die zu untersuchenden Parameter hat. Im Fall der hier vorliegenden Ergebnisse mit zahlreichen Abweichungen von Messwerten zwischen beiden Kontrollgruppen war dies in Erwägung zu ziehen. Zur weiteren Einordnung der Ergebnisse der Taz-KD Fliegen wäre die Quantifizierung der Taz-mRNA in den Fliegenherzen notwendig, um Rückschlüsse über die Stärke des KD zu ziehen. Darauf aufbauend wäre eine massenspektrometrische Messung der CL sinnvoll, um die direkten Auswirkungen dieser Taz KD auf CL zu ermitteln. Zur Verstärkung des Taz-Defizites wäre zudem denkbar, verschiedene Taz-RNAi-Konstrukte durch Kreuzung entsprechender Fliegen miteinander zu kombinieren. Die Herzfunktionsanalyse der Taz-KD wurde in dieser Arbeit im Rahmen eines Screenings von kardialen Phänotypen aufgrund von CL-Mangel durchgeführt. Da die Taz-KD Fliegen keinen markanten Herzphänotyp aufwiesen, erfolgten keine weiteren Untersuchungen dieser.

Anders als die im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten Taz-defizienten Fliegen, zeigen Mäuse, bei denen durch die Applikation von Doxycyclin ein Taz-Defizit induziert wurde, einen kardialen Phänotyp. Dieser äußerte sich in Form einer milden late-onset Kardiomyopathie, sowie Schwäche der Skelettmuskulatur (113). Im Gegensatz zum Menschen (59), zeigte sich jedoch keine pä- oder perinatal erhöhte Letalität in Assoziation mit einem Taz-KD (113). Powers et al. zeigten, dass auch Mäuse, ähnlich wie

*Drosophila*, eine Skelettmuskelschwäche aufweisen (114). Weiterführende Untersuchungen ergaben eine abnormale Respiration sowie eine veränderte Ultrastruktur der Mitochondrien in Taz-defizienten Mäusen (114). Mit einer höheren Doxycyclin-Dosis konnten Phoon et al. eine linksventrikuläre non-compaction Kardiomyopathie in Mäusen induzieren und folgerten daraus, dass Taz möglicherweise eine Rolle bei der Verdichtung des Myokards im Rahmen der Embryonalentwicklung bei Mäusen spielt (115).

Im Menschen führt die x-chromosomal vererbte Mutation des Taz-Gens führt zu einem als Barth-Syndrom bezeichneten Krankheitsbild, bestehend aus Schwäche der Skelettmuskulatur, Defizit in der Immunabwehr, Kardiomyopathie und Gedeihstörung (58). Bei der meist bereits im kindlichen Alter diagnostizierten Kardiomyopathie kann es sich um eine dilatative, eine hypertrophe oder eine non-compaction-Kardiomyopathie handeln (116). Im Verlauf ist kardiales Versagen eine häufige Ursache für Komorbidität und das verfrühte Versterben dieser Patienten (117). Unabhängig von der Ausprägung der Kardiomyopathie besteht ein stark erhöhtes Risiko für das Auftreten von Arrhythmien (117). Durch die Mutation des Taz-Genes kommt das Remodeling von unreifem CL zu reifem CL zum Erliegen. Wie auch im bereits beschriebenen Mausmodell kommt es in der inneren Mitochondrienmembran zur Verschiebung des Verhältnisses aus Monolysocardiolipin zu reifem CL in Richtung der unreifen Vorstufe (118). Jedoch konnte bislang keine Korrelation zwischen der Art der Mutation und der Ausprägung des Barth Syndroms oder dessen Verlauf gefunden werden (119). Aufgrund der Lokalisation des Tafazzin-Gens auf dem X-Chromosom sind bislang lediglich Fälle männlicher Barth-Syndrom-Patienten bekannt. Dies legt nahe, dass Frauen durch ihr zweites Taz-Gen auf dem anderen X-Chromosom den Ausfall eines Taz-Genes kompensieren können. Für ein tiefergehendes Verständnis wäre eine Untersuchung der Konduktorinnen und die Aktivität ihres gesunden Taz-Genes interessant, da dies möglicherweise kompensatorisch aktiver ist. Infolge wäre zu untersuchen, ob diese Frauen veränderte CL Plasma- oder Gewebespiegel aufweisen, oder sich Hinweise auf eine veränderte mitochondriale Funktion finden. Weiterhin wäre zu beobachten, ob es in der Gruppe der Konduktorinnen Erkrankungen gibt, die gehäuft oder verfrüht auftreten.

Zusammengefasst konnten die hier erhobenen Daten zum Einfluss von Taz auf die Herzfunktion von *Drosophila* keinen klaren Phänotyp zeigen. Daten aus anderen Modellen und dem Menschen zeigen jedoch eine deutliche Auswirkung eines Taz-Defiz-

tes auf die kardiale Funktion. Eine Erweiterung der Herzfunktionsanalyse um eine homozygote Taz-Mutante sowie Messungen zu CL-Levels wären notwendig, um hier Aussagen über die Auswirkungen eines Taz-Defizites auf die kardiale Funktion von *Drosophila* treffen zu können.

### 9.3 CLS-Mutante

Neben den Auswirkungen von Taz auf die Herzfunktion von *Drosophila*, wo keine markanten kardialen Effekte nachgewiesen werden konnten, wurden im Rahmen dieser Arbeit auch die Auswirkungen von CLS auf die kardiale Funktion der Fruchtfliege untersucht. Die CLS übernimmt den letzten Schritt der Synthese von unreifem CL. Eine verminderte Aktivität hat reduzierte Konzentration von reifem CL zur Folge und daher eignet sich eine Fruchtfliege mit CLS-Defizit zur Untersuchung des Einflusses von CL auf die Herzfunktion.

#### 9.3.1 Herzfunktion bei CLS-Defizit

Um den Einfluss von reduziertem CL auf die Herzfunktion von *Drosophila* weiter zu untersuchen, wurde eine Fliege mit CLS-Mutation mittels in vivo Herzfunktionsanalyse analysiert. In Erweiterung hierzu wurden dieselben Analysen in Fliegen mit herzspezifischem KD der CLS durchgeführt. Sowohl der KD von CLS als auch die Mutation führten zu signifikant vergrößerten Herzdiametern in Systole und Diastole. Der CLS KD zeigte eine verringerte fraktionelle Verkürzung des Herzens im Rahmen der Kontraktion, die jedoch in der CLS Mutante nicht zu sehen war.

Sowohl der CLS KD als auch die CLS-Mutante wiesen eine erniedrigte Herzfrequenz bei einer verlängerten Dauer des Herzzyklus auf. Die Ursache hierfür liegt in beiden Fällen im Wesentlichen im prolongierten diastolischen Intervall. Das systolische Intervall zeigte sich lediglich bei den CLS KD verlängert, nicht bei den CLS-Mutanten. Gemein ist KD und Mutante außerdem, dass sie ein erhöhtes Arrhythmie-Risiko verglichen mit ihren Kontrollen aufwiesen.

Schlame und Kollegen konnten in ihrer Untersuchung derselben CLS-Mutante, die auch im Rahmen der hier durchgeführten Experimente verwendet wurde, bereits zeigen, dass diese eine signifikant verringerte Herzfrequenz in einem frühen Stadium der Verpuppung aufweisen (120). Wenngleich die Daten von Schlame et al. in einem früheren Entwicklungsstadium erhoben wurden und sich auch in den verwendeten Methoden unterscheiden, so zeigten auch die hier erhobenen Daten übereinstimmend mit

den Daten von Schlame eine verringerte Herzfrequenz von *Drosophila* mit CLS-Defizit. Weiterführende Daten zur Herzfunktion dieser CLS-Mutante wurden bislang nicht veröffentlicht. Funktionelle Untersuchungen ergaben zudem ein motorisches Defizit, das sich bei untersuchten Larven mit verringerter Fortbewegung und in adulten Fliegen durch reduzierte Kletterfertigkeiten äußerte (120).

Ein Abfall der Herzfrequenz wurde in der Literatur für *Drosophila* außerdem im Kontext des Alterungsprozesses beschrieben (108). Eine weitere Arbeitsgruppe konnte eine signifikante Reduktion im Zusammenhang mit der Inaktivierung der Sarkoendoplasmatischen-Retikulum-Kalzium-ATPase einen Abfall der Herzfrequenz von *Drosophila* nachweisen (121). Diese Daten warfen die Frage auf, ob die reduzierte Herzfrequenz möglicherweise im Kontext eines geringeren ATP-Angebotes in CLS-defizitären Fliegen zu betrachten ist.

Vergleicht man die Ergebnisse der Herzfunktionsanalyse von *Drosophila* mit jener von Mäusen mit CLS-Defizit, so konnten Saini-Chohan et al. in einem Modell mit spontanhypertensiven Ratten zeigen, dass die Entwicklung einer HI mit einer Reduktion der kardialen CLS mRNA Expression und der CLS Aktivität einhergeht (122).

Die hier durchgeführten Experimente untersuchten die Herzfunktion von *Drosophila* unter Ruhebedingungen. Weiterführend hierzu wäre ein Versuchsaufbau interessant, der die Herzfunktion unter Stress analysiert, da das kardiovaskuläre System der Fliege das CL-Defizit möglicherweise in Ruhe kompensieren kann, bei erhöhter Leistung dazu jedoch nicht mehr in der Lage ist. Da alle Lebewesen im Verlauf regelmäßig verschiedensten Arten von Stress ausgesetzt sind und dieser dadurch einen wesentlichen Einfluss auf eine Ausprägung von Erkrankungen haben kann (123), wäre die kardiale Untersuchung von CL-defizitären *Drosophila* unter Stress relevant. In der praktischen Umsetzung könnte akuter Stress durch Oktopamin induziert werden. Oktopamin ist ein Monoamin, was in seiner Funktion dem Adrenalin im Menschen ähnelt. Es ist bekannt, dass dieses Monoamin über G-Protein gekoppelte Rezeptoren agiert (124) und bei *Drosophila* zu einem Anstieg der Herzfrequenz führt (125). Das Oktopamin könnte durch eine Injektion in das Abdomen der Fliege direkt vor der Untersuchung appliziert werden. Möglicherweise treten im Rahmen von akutem Stress noch weitere Unterschiede in der Herzfunktion und der Kompensationsfähigkeit von CLS-defizitären Fliegen im Vergleich zum Wildtyp zutage. Eine Herzfunktionsanalyse mit einem Versuchsaufbau der chronischen Stress für die Fliege verursacht, beispielsweise durch erhöhte

Temperatur oder Fasten, wäre in Ergänzung zu dem Modell des akuten Stresses erstrebenswert.

Zusammenfassend zeigten die hier durchgeführten Versuche, dass sich unabhängig, ob ein gewebsspezifisches oder globales CL-Defizit vorliegt, sich ein kongruenter Phänotyp in der Herzfunktionsanalyse zeigt, der sich in vergrößerten Herzen, einer Verlangsamung der Herzfrequenz, einer Einschränkung der systolischen und diastolischen Herzfunktion und einem erhöhten Risiko für Arrhythmien zusammenfassen lässt. Möglicher Weise ist dieser Phänotyp in Teilen durch eine Veränderte Mitochondriale Funktion zu sehen, die in Kapitel 9.3.3 diskutiert wird.

### **9.3.2 Auswirkung eines CLS-Defizites auf den Alterungsprozess des Fliegenherzens**

Inwiefern ein CL-Defizit die Funktion des alternden Herzens beeinflusst, wurde durch eine Herzfunktionsanalyse in sieben Wochen alten CLS-Mutanten und Kontrollen untersucht. Während sich die Diameter der Herzen über die Zeit nicht veränderten, kam es mit zunehmendem Alter zu einem signifikanten weiteren Abfall der Herzfrequenz, sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der CLS-Mutante. Der Herzzyklus verlängerte sich ebenfalls in beiden Gruppen signifikant mit zunehmendem Alter. Die sieben Wochen alte CLS-Mutante wies hier im Vergleich zu den sieben Wochen alten Kontrollen eine signifikante Verlängerung des Herzzyklus auf. Der verlängerte Herzzyklus gründet primär auf einem signifikant zunehmenden diastolischen Intervall mit dem Alter. Das systolische Intervall zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen drei Wochen und sieben Wochen alten Kontrollfliegen. Zwischen den sieben Wochen alten CLS-Mutanten und deren Kontrolle ergibt sich jedoch kein signifikanter Unterschied mehr. Kardiale Auswurf, aufgrund des Abfalls der Herzfrequenz signifikant. Die Untersuchungen zeigten, dass zunehmendes Alter das Auftreten von Arrhythmien erhöht. Hiervon sind die sieben Wochen alten CLS-Mutanten in signifikant höherem Ausmaß betroffen als ihre Kontrollen.

Zusammenfassend zeigte sich in der Kontrollgruppe eine altersbedingte Veränderung der Herzfunktion. Betrachtet man die Herzfunktion der CLS-Mutanten schien der Abfall verschiedener Parameter mit zunehmendem Alter noch deutlicher zu sein als in den Kontrollen. Da die CLS-Mutation jedoch bereits mit schlechteren Messwerten im jungen Alter einherging, unterschied sich der relative Abfall kaum von dem der Kontrollgruppe.

Studien hinsichtlich der Herzfunktion von *Drosophila* ergaben, dass auch das Herz der Fruchtfliege einem Alterungsprozess unterliegt (126). Ocorr et al. zeigten, dass bei fünf Wochen alten Fliegen die kardiale Rhythmicität im Vergleich zu jüngeren Fliegen abnahm und die Dauer eines Herzzyklus zunehmend war (76). Diese Versuche erfolgten in Kontrast zu den hier durchgeführten Versuchen aufgrund der verwendeten Präparationstechnik am denervierten Herzen (76), weshalb die Ergebnisse nur eingeschränkt vergleichbar sind. Klassen et al. untersuchten mit der hier verwendeten Methode die Herzfunktion von Wildtyp-*Drosophila*. In den ersten dreißig Lebenstagen zeigte sich eine stabile Herzfunktion (87). Ab dem fünfzigsten Lebenstag ließ sich ein Abfall der Herzfrequenz, sowie ein prolongiertes systolisches Intervall (87) nachweisen. Zudem ergaben die Messungen eine Verlängerung des diastolischen Intervalls und infolge der verlängerten Herzzeitintervalle ein verminderter kardialer Auswurf (87). Keine Unterschiede ergaben sich hinsichtlich der fraktionellen Verkürzung, des Schlagvolumens und den Diametern der Herzen (87). Zusammengefasst sehen Klassen und Kollegen in ihren Experimenten eher die zeitliche Komponente der Herzarbeit vom Alterungsprozess betroffen und weniger die mechanischen und räumlichen Komponenten der Herzarbeit (87). Die Messdaten der Herzfunktion, die Klassen und Kollegen im Rahmen ihrer Untersuchung erhoben (87), stimmen mit den im Rahmen dieser Arbeit generierten Daten für sowohl die drei als auch sieben Wochen alten Kontrollfliegen überein. Die CLS-Mutante zeigte im Altersvergleich eine deutliche Verschlechterung der Herzfunktion. Auch hier waren analog zu den Kontrollfliegen zeitliche Parameter der Herzarbeit betroffen, während die räumlichen Komponenten wie Herzdiameter, fraktionelle Verkürzung und Schlagvolumen sich mit zunehmendem Alter nicht verändern.

Zusammengefasst deuteten die hier erhobenen Daten darauf hin, dass die CLS-Mutation die Alterung des Herzens zu beschleunigen schienen. Die von Klassen und Kollegen erhobenen Daten die für die Herzfunktion von zehn und sechzehn Wochen alten Kontrollen, mit zunehmendem Alter einen weiteren Abfall der Herzfrequenz zeigen (87) stützen diese Hypothese in Teilen, denn hinsichtlich der maximalen Relaxationsgeschwindigkeit, die in den Experimenten von Klassen einen deutlichen Abfall mit zunehmendem Alter ergab, zeigten die sieben Wochen alten CLS-Mutanten keinen Abfall der maximalen Relaxationsgeschwindigkeit (87).

Auch im Menschen finden altersbedingte Veränderungen der Struktur und der Physiologie des Herzens statt, die einen großen Einfluss auf den Verlauf von Herz-Kreislaufkrankungen nehmen können (127). Die am häufigsten beobachteten Veränderungen sind neben einem erhöhten arteriellen Druck, die ventrikuläre Hypertrophie und die diastolische Dysfunktion (127–129). Auf molekularer Ebene konnte gezeigt werden, dass im Alterungsprozess des Herzens die Dauer der Aktionspotentiale zunimmt und die Freisetzung von Kalzium verändert ist (130). Auch dies könnte in *Drosophila* im Rahmen der Herzfunktionsanalyse mittels Kalzium-Sensing gemessen werden. Ein Vergleich von Kontrollen und CLS-Mutante wäre insofern aufschlussreich, als dass sich in der Kontrollgruppe der physiologische Alterungsprozess nachzeichnen lässt und in der CLS-Mutante die Auswirkung chronisch erniedrigter CL-Level im Kontext des Alterungsprozesses. Dies zu verstehen könnte dazu beitragen, die wahrscheinlich kumulativen Auswirkungen von Veränderungen im CL-Haushalt, wie sie beispielsweise im Rahmen von HI oder nach Myokardinfarkt in Kombination mit dem natürlichen Alterungsprozess auftreten, zu verstehen (7). Aus diesem Verständnis heraus, ergibt sich die Chance, neue pharmakologische Konzepte zu entwickeln.

Die hier durchgeführte Messung des Langzeitüberlebens ergab keine Unterschiede zwischen CLS-Mutanten und ihren Kontrollen. Im Kontrast zu den hier erhobenen Daten, ergaben die Untersuchungen von Schlame und Kollegen eine drastisch verringerte Überlebensdauer von CLS-Mutanten im Vergleich zu Kontrollfliegen (120). Während die CLS-Mutanten maximal 25 Tage alt wurden, überlebten die Kontrollen bis zu 80 Tage (120). Die Abweichung der Überlebensdauern bei ähnlichem Experimentaufbau ist möglicherweise im Kontext der Ausprägung der Mutation zu sehen. Während die hier untersuchten Fliegen heterozygot für die CLS-Mutation waren, ist für die von Schlame et al. (120) verwendeten CLS-Mutanten nicht genau zu eruieren, ob die CLS-Mutation homozygot oder heterozygot vorlag. Da der Phänotyp deutlich ausgeprägter war, lässt sich eine homozygote Mutation oder die Kreuzung mit einer Defizienzfliege vermuten.

Zusammenfassend zeigte sich der kardiale Phänotyp von *Drosophila* bei CL-Defizit zusätzlich durch den Faktor Alter beeinträchtigt. Das Langzeitüberleben blieb jedoch unbeeinflusst.

### 9.3.3 Auswirkung von CL-Mutation auf zellulärer Ebene

Nachdem sich in der Herzfunktionsanalyse von CLS-defizienten Fliegen ein deutlicher kardialer Phänotyp herausarbeiten ließ, sollten nun weitere, auf Zellebene ansetzende, Versuche erfolgen, um der Ursache für diesen kardialen Phänotyp näherzukommen.

#### CL-Spezies

Um einen Eindruck davon zu bekommen, inwiefern die heterozygot vorliegende Mutation für die CLS die CL-Levels in der Fliege verändert, wurden die CL-Spezies in der gesamten Fliege massenspektroskopisch bestimmt. Hierbei ergab sich eine signifikante Reduktion mehrerer CL-Spezies. Hochsignifikant reduziert waren die CL-Spezies 72:10, 70:8, 70:7, 66:5 und 64:4. Bei drei der gemessenen CL-Spezies ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen CLS-Mutante und Kontrollen. Am häufigsten vertreten waren die CL 72:9 und 70:7. Aus Untersuchungen am Menschen ist bekannt, dass es, je nach Organsystem, in der Regel eine dominante CL-Spezies gibt. Im humanen Herzen handelt es sich beispielsweise um CL 72:8 (131). Untersuchungen an *Drosophila* konnten jedoch zeigen, dass es in der Fliege meist mehrere dominante Subgruppen von CL gibt (132). Die Ergebnisse dieser Analysen ergab, dass die CL 72:8, 68:6 und 64:4 in *Drosophila* dominant sind (132). Weiterhin konnte in einer massenspektrometrischen Untersuchung der CLS-Mutante gezeigt werden, dass ein nahezu kompletter Verlust von CL zu einer kompensatorischen Erhöhung von Phosphatidylglycerol, einer Vorstufe von CL führt, sich ansonsten aber keine Veränderung der PL ergeben (120). Eine erste Vermutung, dass sich je nach Zusammensetzung der Fette in der Fliegennahrung die Dominanz der CL-Spezies beeinflussen, erwies sich als nicht zutreffend (132). Der Grund für die Abweichung der hier gemessenen dominanten CL-Subgruppen im Vergleich zu den in (132) als dominant identifizierten CL-Spezies ist möglicherweise technischer Natur. Sind einige CL-Spezies zwar vorhanden, aber in zu geringer Konzentration, ist es möglich, dass sie in den hier vorliegenden Datensätzen nicht eingegangen sind, da sie aufgrund ihrer zu geringen Konzentration nicht massenspektrometrisch miterfasst wurden. Auch ohne den genauen Grund für die abweichenden CL-Spezies, die hier im Vergleich zur oben zitierten Studie auftreten, zu kennen, zeigen die Daten mit der signifikanten Reduktion von mehreren CL-Spezies, dass auch der Ausfall nur eines CL-Genes nicht vollständig kompensierbar ist und es zu einer Reduktion der CL-Menge in *Drosophila* kommt.

### **Mitochondrienfunktion**

Um aufzuklären, inwiefern sich die reduzierten CL-Spiegel der CLS Mutante auf die Funktion von Mitochondrien auswirken, führten wir eine mitochondriale Funktionsanalyse mittels Seahorse-Technologie durch. Hierbei galt es insbesondere herauszufinden, ob der kardiale Phänotyp der CLS-Mutante, insbesondere die gestörte Herzfunktion, die vergrößerten Herzen sowie die Anfälligkeit für Arrhythmien in Zusammenhang mit veränderter mitochondrialer Funktion stehen könnten. Da lediglich die mitochondriale Funktion in Kardiomyozyten untersucht werden sollte, wurde die Messung mit einer dafür entwickelten Präparation des Fliegenherzens verknüpft. So war es möglich, den Sauerstoffverbrauch von Kardiomyozyten in ihrem natürlichen Verbund im Fliegenherz zu messen. Methodisch betrachtet ist die Untersuchung von Mitochondrien in ihrer physiologischen Umgebung, was durch die Etablierung der Seahorse-Methode für *Drosophila* Herz gelungen ist (106), ein Novum. Bislang wurden isolierte Mitochondrien (133), embryonale Zellen (134), Präparate von Fliegenlarven (135) sowie Gehirne von *Drosophila* (102) untersucht. Da Mitochondrien untereinander kommunizieren und vielschichtig in die Signalwege der Zelle integriert sind (29), bringt die Untersuchung der mitochondrialen Funktion in physiologischer Umgebung integriert in den Zellverband einen großen Mehrwert.

Unsere ersten Untersuchungen zeigten keinen Unterschied zwischen CLS Mutante und Kontrolle hinsichtlich ihrer respiratorischen Aktivität. Auch im nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauch zeigten sich keine Unterschiede. Dies steht in Kontrast zu humanen Daten sowie Daten aus Tierversuchen. Diese zeigen, dass Veränderungen im CL-Profil sich unabhängig davon, ob sie durch CLS-Defizit, ROS-Anfall oder einem gestörten CL-Remodeling zustande kommen, mit mitochondrialer Dysfunktion assoziiert sind (136). Bei dem Versuchsaufbau mit Kombination aus Herzpräparation und anschließender Untersuchung am intakten Fliegenherzen im Seahorse-Gerät handelt es sich um eine junge Methode und es liegt lediglich eine Studie mit vergleichbarem Aufbau vor (106), was die Einordnung der Ergebnisse erschwert. Da die Fliegenherzen in den Messkurven adäquat auf die Inhibitoren reagieren, ist davon auszugehen, dass die hier beschriebene Methode generell für die Messung geeignet ist.

Da das Herz als Energiesubstrat neben Glucose auch Fettsäuren verwendet (11), wurde, um die Physiologie der Versuchsmediums zu optimieren, zusätzlich zum Versuchsmedium lipidreiches Bovines Serum (ALBUMAX™ I) hinzugegeben. Dies diente dazu auszuschließen, dass dieser Mangel an physiologischem Energiesubstrat in den

Kardiomyozyten die Funktion der Mitochondrien beeinträchtigt. Hierunter wiesen die CLS-Mutanten im Vergleich zu ihren Kontrollen eine signifikant höhere Protonenleckage auf sowie eine geringere freie respiratorische Kapazität. Die freie respiratorische Kapazität misst die Differenz zwischen maximaler und basaler Respiration (137). Muss eine Zelle, beispielsweise als Reaktion auf Stress, auf einen erhöhten ATP-Bedarf reagieren, ist entscheidend wie adäquat sie das tut, ob sie die Kapazität dafür hat. Generell ist eine höhere respiratorische Reservekapazität ein Zeichen dafür wie anpassungsfähig und agil eine Zelle ist (137). Weiterhin ist die freie respiratorische Kapazität abhängig von der physiologischen Aufgabe einer Zelle und deren Proliferationsstadium, wobei proliferierende Zellen eine verringerte freie respiratorische Kapazität aufweisen (138). Zudem lag eine erhöhte Protonen Leckage vor. Diese beschreibt den Protonenfluss über die mitochondriale Membran und den Grad der Entkopplung. Im Fall einer mitochondrialen Schädigung kann diese erhöht sein. Unsere bisherigen Daten zur mitochondrialen Funktion weisen also darauf hin, dass die CL Defizienz zu einem Protonen Leckage und eingeschränkter freier respiratorischer Kapazität führt. In Erweiterung dazu erfolgte die Quantifizierung von ROS-Levels in der ganzen Fliege mittels TBARS-Assay. Hier zeigte die CLS-Mutante leicht erhöhte Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies gilt es jedoch in weiteren, herzspezifischen Untersuchungen zu bestätigen.

Die Daten zur mitochondrialen Funktion könnten einen Mechanismus für die kardiale Funktionseinschränkung in CLS-KD-Fliegen darstellen, müssen aber in zukünftigen Studien noch weiter untersucht werden. Zur weiteren Bestätigung der kardialen mitochondrialen Funktionsregulation durch CLS, könnte die bereits in der Herzfunktionsanalyse untersuchte CLS KD-Fliege hinsichtlich der Funktion der kardialen Mitochondrien mittels Seahorse untersucht werden. Dies würde der Tendenz, die die Daten zur mitochondrialen Funktion der CLS-Mutante zeigen möglicherweise unterstreichen.

Vorangegangene Untersuchungen adressierten ebenfalls die mitochondriale Funktion der hier verwendeten CLS-Mutante. Hierfür wurden Mitochondrien aus dem Thorax und aus der gesamten Fliege isoliert und anschließend mittels BD Oxygen Biosensor System, was den Sauerstoffverbrauch über die Zeit hinweg misst, hinsichtlich ihrer respiratorischen Aktivität untersucht (120). Die respiratorische Aktivität der CLS-Mutanten im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe zeigte sich signifikant geringer (120). Im Gegensatz zu den hier vorliegenden Untersuchungen waren die in (120) untersuch-

ten CLS-Mutanten vermutlich anders gekreuzt als die hier verwendeten Fliegen. Zudem lagen die Mitochondrien isoliert vor. Daher ist die Vergleichbarkeit der Ergebnisse nicht vollumfänglich gegeben. Interessant ist jedoch, dass die in (120) untersuchten Mitochondrien der CLS-defizitären Fliegen sich dahingehend morphologisch auffällig zeigten, als dass sie zahlreiche kondensierte Cristae aufwiesen und die Mitochondrien teils stark verformt waren (120). Auch hier wäre ein Folgeversuch die elektronenmikroskopische Untersuchung der hier verwendeten CLS-Mutante, um einordnen zu können, ob und inwiefern sich das hier vorliegende CLS- Defizit auf die mitochondriale Morphologie auswirkt.

Untersuchungen von Kiebish et al. an einem Mausmodell mit einer Überexpression humaner CLS ergaben, dass CLS die Produktion von reifem CL beeinflusst und weiter Einfluss auf die mitochondriale Atmung nimmt (139). Hierbei kommt es im Rahmen der Überproduktion von CLS zu einer verbesserten Kopplung und erhöhter Komplex III-Aktivität, wohingegen die ATP-Produktion gleich bleibt (139).

Zusammengefasst zeigt sich in Abhängigkeit des Versuchsmediums die Tendenz, dass die CLS-Mutanten leichte Defizite hinsichtlich freier respiratorischer Kapazität und Protonen Leckage aufweisen. Mit der Seahorse-Technologie in Kombination mit der Präparation des Fliegenherzens wurde hier eine Methode geschaffen, die ihren Mehrwert darin hat, die Funktion der mitochondrialen Kardiomyozyten in ihrem Zellverband mit einer Methode zu untersuchen, die dadurch manipulationsarm den bioenergetischen Status einer Zelle erfassen kann. Der kardiale Phänotyp von CLS-Mutanten ist möglicherweise im Kontext einer beeinträchtigten mitochondrialen Funktion einzuordnen.

#### **9.4 Cardiolipine ein pharmakologisches Ziel der Zukunft**

Aufgrund ihrer zentralen Rolle für die Funktion von Mitochondrien und der Unabdingbarkeit einer effizienten Energieproduktion in Kardiomyozyten, sind auch CL im Fokus pharmakologischer Forschung. Nachdem im Rahmen dieser Arbeit, wenn auch noch nicht mechanistisch aufgeklärt, gezeigt werden konnte, dass CLS die Herzfunktion von Fruchtfliegen beeinflusst, wäre im Folgenden interessant zu erforschen ob und inwiefern pharmakologische Substanzen, die in den CL-Metabolismus eingreifen, einen Effekt auf CLS-defizitäre *Drosophila* haben.

Mit Elamipretide wurde bereits eine Substanz, deren Wirkmechanismus nach bisherigem Kenntnisstand über eine Interaktion mit der mitochondrialen Membran und eine selektive Bindung an CL erfolgt (140,141) im Rahmen einer klinischen Phase II-Studie untersucht (142). Die Interaktion erfolgt durch elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen (140,141). Dadurch peroxidierten CL in geringerem Ausmaß, was wiederum den Elektronentransfer verbesserte (140,141). Drei verschiedene Studien (140,141,143) beschrieben eine, sich konstant verbessernde mitochondriale und zelluläre Funktion, sowohl in vivo als auch in vitro. Diesen Modellen war gemein, dass allen ein Defizit an CL zugrunde lag. Weitere Studien zeigten einen positiven Effekt hinsichtlich des Ausmaßes kardialer Ischämie-Reperfusionsschäden, welche durch die Gabe von Elamipretide signifikant geringer blieben (144). Proben humaner Herzen von herzinsuffizienten Patienten wurden ex-vivo mit Elamipretide behandelt und zeigten eine Verbesserung mitochondrialer Funktion (145). Im Rahmen einer weiteren Studie wurden Patienten mit einer primär mitochondrialen Myopathie für fünf Tage mit Elamipretide behandelt (146). Hierunter zeigte sich im Rahmen dieser kleinen Studie eine Verbesserung der körperlichen Leistungsfähigkeit. Aktuellsten Untersuchungen zufolge konnte im Rahmen von magnetresonanztomographischen Untersuchungen kein Effekt der Substanz auf die Funktion des linken Ventrikels nachgewiesen werden (142).

Alternativ zur CL als pharmakologisches Ziel in Mitochondrien können insbesondere bei HI auch andere Möglichkeiten in Betracht gezogen werden, um die mitochondriale Funktion zu verbessern. Ein möglicher Ansatz statt der Funktion der Mitochondrien zu stabilisieren ist der Ausgleich des - durch die nicht intakten Mitochondrien - verursachten Energiedefizits (147) durch Zufuhr von beispielsweise ATP in die Zelle. Ein weiterer vielversprechender Ansatz könnte in der Erforschung und daraus folgende Entwicklung von Regulationsmechanismen des Kalzium-Haushaltes liegen, der nachweislich Einfluss auf die Mitochondrienfunktion nimmt (147). Hierbei ist jedoch derzeit noch nicht vollständig verstanden, ob der Overload oder ein Mangel an Kalzium den mitochondrialen Stress verursacht (147).

Trotz einer Vielzahl möglicher pharmakologischer Angriffspunkte ist die medikamentöse Adressierung von CL ein vielversprechender und durch vielseitige Beforschung bereits sehr konkreter Ansatz. Zudem versprechen Substanzen, die CL adressieren, einen weiten Einsatzbereich auch außerhalb der Herzkreislauf-Pharmakologie. Eine Substanz zu finden, die auf Ebene der CL agiert hätte weitreichende Folgen für die

Behandlung verschiedenster, bislang nicht kurativ adressierbarer Erkrankungen wie beispielsweise die HI, M. Parkinson (148), Demenz oder Diabetes (13) und ist daher von zentralem Stellenwert.

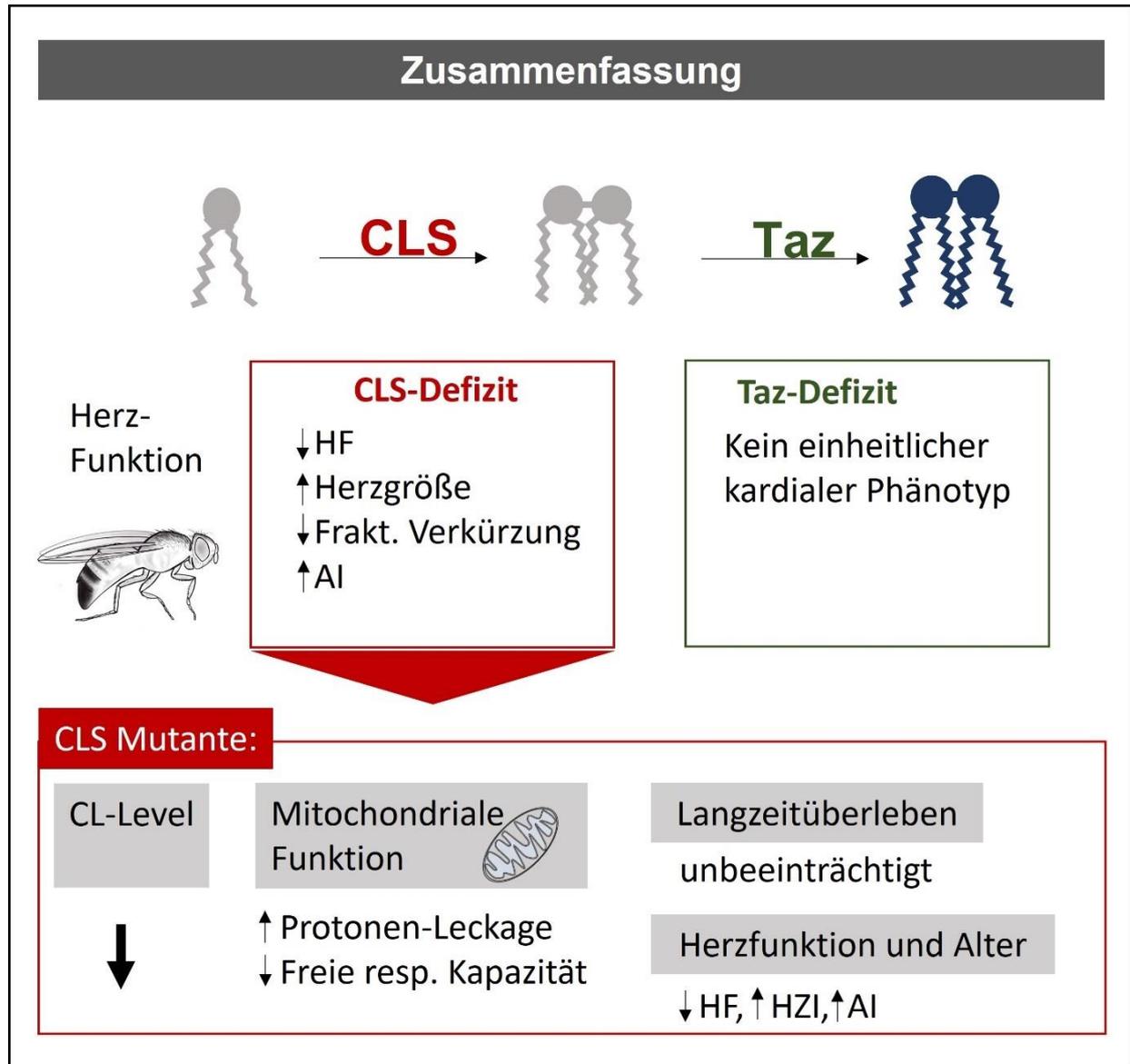
## 9.5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir CLS als ein Schlüsselenzym für die kardiale Funktion in *Drosophila* identifizieren. Die hier durchgeführte Herzfunktionsanalyse eines herzspezifischen KD von CLS ergab eine Dilatation des Herzens und eine veränderte systolische und diastolische Funktion. Dies legt nahe, dass CLS über die CL-Synthese Einfluss auf die kardiale Funktion von *Drosophila* nimmt. Mit der Verwendung von *Drosophila* kam ein etablierter Modellorganismus, der bereits vielfältig zum Verständnis kardialer Erkrankungen beigegeben hat, zum Einsatz. Eine hohe Anzahl konservierter Prozesse bei mangelnder Redundanz des Fliegen-genoms, im Kontrast zum Menschen, wo häufig mehrere Gene oder Splice-Varianten die Möglichkeit zur Kompensation eines Verlustes oder einer Mutation führen, ergeben mit der Verwendung von *Drosophila* die Möglichkeit, Genetik und Metabolismus Hand in Hand zu untersuchen. Eine im Verhältnis kurze Zeitspanne, um geeignete Fliegen zu züchten und zu untersuchen, machen *Drosophila* auch in der kardiovaskulären Forschung zu einem attraktiven Modell.

Die HI ist eine Erkrankung, die weltweit zu großen medizinischen und gesundheitsökonomischen Herausforderungen führt. Überdies ist sie als eine komplexe Erkrankung, zu deren Genese zusätzlich zum Akutereignis beispielsweise genetische Faktoren und Umwelteinflüsse beitragen. Weder sind die molekularen Mechanismen, die zur HI führen können, vollständig verstanden, noch gibt es effektive präventive Strategien zur Vermeidung einer HI. CLS spielt möglicherweise auch eine wichtige Rolle in der Pathogenese der HI, bei der bereits bekannt ist, dass sie mit reduziertem CL-Level einhergeht. Viele Prozesse des Fliegenherzens sind zum humanen Herzen konserviert. Dass CLS in *Drosophila* zu einem derartig ausgeprägten Phänotypen führt, legt nahe, auch im Menschen den Einfluss von CLS auf die Regulation der Herzfunktion besser zu verstehen.

Neue pharmakologische Konzepte werden notwendig sein, um therapeutische Erfolge zu erzielen und den Krankheitsverlauf frühzeitig zu stoppen oder gar präventiv handeln zu können. Weitere mechanistische Studien sind notwendig, um herauszuarbeiten, inwiefern die pharmakologische Modellierung der CLS möglicherweise therapeutisch

genutzt werden kann. *Drosophila* und ein etabliertes Modell mit CL-Defizit können hierbei nützlich sein.



**Abbildung 36 Grafische Zusammenfassung.** *Drosophila melanogaster* mit einem Defizit der Cardiolipinsynthese, sowie Fliegen mit Tafazzin-Defizit wurden hinsichtlich ihrer Herzfunktion untersucht. Aufgrund des starken kardialen Phänotypes, der in Fliegen mit CLS-Defizit messbar wurde, erfolgte die weitere Charakterisierung einer CLS-Mutanten-Fliege. Hier zeigten sich reduzierte CL-Level, jedoch keine signifikante Einschränkung der mitochondrialen Funktion. Während das Langzeitüberleben der CLS-Mutanten dem ihrer Kontrollgruppe entsprach, zeigte sich die Herzfunktion der gealterten CLS-Mutante deutlich eingeschränkt im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe. Abkürzungen: AI – Arrhythmie-Index; CL – Cardiolipin; CLS – Cardiolipinsynthese; Frakt. Verkürzung – Fraktionelle Verkürzung; HF – Herzfrequenz; HZI – Herzzeit-Intervalle; Taz – Tafazzin. Zeichnung Fruchtfliege Sci vis to.

## 10 Literaturverzeichnis

1. Crespo-Leiro MG, Anker SD, Maggioni AP, Coats AJ, Filippatos G, Ruschitzka F, Ferrari R, Piepoli MF, Delgado Jimenez JF, Metra M, Fonseca C, Hradec J, Amir O, Logeart D, Dahlström U, Merkely B, Drozd J, Goncalvesova E, Hassanein M, Chioncel O, Lainscak M, Seferovic PM, Tousoulis D, Kavaliuniene A, Fruhwald F, Fazlibegovic E, Temizhan A, Gatzov P, Erglis A, Laroche C, Mebazaa A, Heart Failure Association (HFA) of the European Society of Cardiology (ESC). European Society of Cardiology Heart Failure Long-Term Registry (ESC-HF-LT): 1-year follow-up outcomes and differences across regions. *Eur J Heart Fail.* Juni 2016;18(6):613–25.
2. Deutscher Herzbericht (2019). :200.
3. Erste „Universelle Definition der Herzinsuffizienz“ vorgestellt [Internet]. *Kardiologie.org*. 2021 [zitiert 29. Mai 2021]. Verfügbar unter: <https://www.kardiologie.org/herzinsuffizienz/erste--universelle-definition-der-herzinsuffizienz--vorgestellt/18964346>
4. Herold G. *Innere Medizin 2020* [Internet]. 2020 [zitiert 8. August 2021]. Verfügbar unter: <https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:101:1-2020071520335092997774>
5. Bozkurt B, Coats AJS, Tsutsui H, Abdelhamid CM, Adamopoulos S, Albert N, Anker SD, Atherton J, Böhm M, Butler J, Drazner MH, Michael Felker G, Filippatos G, Fiuzat M, Fonarow GC, Gomez-Mesa J-E, Heidenreich P, Imamura T, Jankowska EA, Januzzi J, Khazanie P, Kinugawa K, Lam CSP, Matsue Y, Metra M, Ohtani T, Francesco Piepoli M, Ponikowski P, Rosano GMC, Sakata Y, Seferović P, Starling RC, Teerlink JR, Vardeny O, Yamamoto K, Yancy C, Zhang J, Zieroth S. Universal definition and classification of heart failure: a report of the Heart Failure Society of America, Heart Failure Association of the European Society of Cardiology, Japanese Heart Failure Society and Writing Committee of the Universal Definition of Heart Failure: Endorsed by the Canadian Heart Failure Society, Heart Failure Association of India, Cardiac Society of Australia and New Zealand, and Chinese Heart Failure Association. *Eur J Heart Fail.* März 2021;23(3):352–80.
6. Booth LC, May CN, Yao ST. The role of the renal afferent and efferent nerve fibers in heart failure. *Front Physiol.* 2015;6:270.
7. Bertero E, Maack C. Metabolic remodelling in heart failure. *Nat Rev Cardiol.* August 2018;15(8):457–70.
8. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, Falk V, González-Juanatey JR, Harjola V-P, Jankowska EA, Jessup M, Linde C, Nihoyannopoulos P, Parissis JT, Pieske B, Riley JP, Rosano GMC, Ruilope LM, Ruschitzka F, Rutten FH, van der Meer P, Authors/Task Force Members, Document Reviewers. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail.* August 2016;18(8):891–975.

9. Mitochondrial Dysfunction in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction | *Circulation* [Internet]. [zitiert 11. Juli 2021]. Verfügbar unter: <https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.036259>
10. The Failing Heart — An Engine Out of Fuel | *NEJM* [Internet]. [zitiert 11. Juli 2021]. Verfügbar unter: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmra063052>
11. Myocardial Substrate Metabolism in the Normal and Failing Heart | *Physiological Reviews* [Internet]. [zitiert 11. Juli 2021]. Verfügbar unter: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/physrev.00006.2004>
12. Impact of Oxidative Stress on the Heart and Vasculature: Part 2 of a 3-Part Series | *Journal of the American College of Cardiology* [Internet]. [zitiert 11. Juli 2021]. Verfügbar unter: <https://www.jacc.org/doi/full/10.1016/j.jacc.2017.05.035>
13. Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Role of Cardiolipin in Mitochondrial Function and Dynamics in Health and Disease: Molecular and Pharmacological Aspects. *Cells* [Internet]. 16. Juli 2019 [zitiert 14. April 2021];8(7). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6678812/>
14. Oborník M. In the beginning was the word: How terminology drives our understanding of endosymbiotic organelles. *Microb Cell Graz Austria*. 21. Januar 2019;6(2):134–41.
15. Gottlieb RA, Bernstein D. Mitochondrial remodeling: Rearranging, recycling, and reprogramming. *Cell Calcium*. August 2016;60(2):88–101.
16. Tang JX, Thompson K, Taylor RW, Oláhová M. Mitochondrial OXPHOS Biogenesis: Co-Regulation of Protein Synthesis, Import, and Assembly Pathways. *Int J Mol Sci*. 28. Mai 2020;21(11):E3820.
17. Lesnefsky EJ, Moghaddas S, Tandler B, Kerner J, Hoppel CL. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia--reperfusion, aging, and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. Juni 2001;33(6):1065–89.
18. van der Blik AM, Sedensky MM, Morgan PG. Cell Biology of the Mitochondrion. *Genetics*. November 2017;207(3):843–71.
19. Dudek J, Hartmann M, Rehling P. The role of mitochondrial cardiolipin in heart function and its implication in cardiac disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 1. April 2019;1865(4):810–21.
20. Saric A, Andreau K, Armand A-S, Møller IM, Petit PX. Barth Syndrome: From Mitochondrial Dysfunctions Associated with Aberrant Production of Reactive Oxygen Species to Pluripotent Stem Cell Studies. *Front Genet*. 2015;6:359.
21. DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med*. 26. Juni 2003;348(26):2656–68.
22. Sazanov LA. A giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Juni 2015;16(6):375–88.

23. Schlame M, Greenberg ML. Biosynthesis, remodeling and turnover of mitochondrial cardiolipin. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. Januar 2017;1862(1):3–7.
24. Horvath SE, Daum G. Lipids of mitochondria. *Prog Lipid Res*. Oktober 2013;52(4):590–614.
25. Pangborn MC. Isolation and Purification of a serologically Active Phospholipid from Beef Heart. *J Biol Chem*. 1942;143:247–56.
26. Ardail D, Privat JP, Egret-Charlier M, Levrat C, Lerme F, Louisot P. Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics. *J Biol Chem*. 5. November 1990;265(31):18797–802.
27. Nicolay K, Rojo M, Wallimann T, Demel R, Hovius R. The role of contact sites between inner and outer mitochondrial membrane in energy transfer. *Biochim Biophys Acta*. 25. Juli 1990;1018(2–3):229–33.
28. Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC, Graeve L, Herausgeber. *Löffler/Petrides - Biochemie und Pathobiochemie*. 9., vollst. überarb. Aufl. Berlin Heidelberg: Springer; 2014. 1073 S. (Springer-Lehrbuch).
29. Chicco AJ, Sparagna GC. Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease. *Am J Physiol Cell Physiol*. Januar 2007;292(1):C33-44.
30. Schlame M. Cardiolipin remodeling and the function of tafazzin. *Biochim Biophys Acta*. März 2013;1831(3):582–8.
31. Lai L, Wang M, Martin OJ, Leone TC, Vega RB, Han X, Kelly DP. A role for peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 (PGC-1) in the regulation of cardiac mitochondrial phospholipid biosynthesis. *J Biol Chem*. 24. Januar 2014;289(4):2250–9.
32. Das S, Morvan F, Jourde B, Meier V, Kahle P, Brebbia P, Toussaint G, Glass DJ, Fornaro M. ATP citrate lyase improves mitochondrial function in skeletal muscle. *Cell Metab*. 2. Juni 2015;21(6):868–76.
33. Daum G. Lipids of mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 12. Juni 1985;822(1):1–42.
34. Xu Y, Malhotra A, Ren M, Schlame M. The Enzymatic Function of Tafazzin\*. *J Biol Chem*. 22. Dezember 2006;281(51):39217–24.
35. Richter-Dennerlein R, Korwitz A, Haag M, Tatsuta T, Dargazanli S, Baker M, Decker T, Lamkemeyer T, Rugarli EI, Langer T. DNAJC19, a Mitochondrial Co-chaperone Associated with Cardiomyopathy, Forms a Complex with Prohibitins to Regulate Cardiolipin Remodeling. *Cell Metab*. 1. Juli 2014;20(1):158–71.

36. Pfanner N, van der Laan M, Amati P, Capaldi RA, Caudy AA, Chacinska A, Darshi M, Deckers M, Hoppins S, Icho T, Jakobs S, Ji J, Kozjak-Pavlovic V, Meisinger C, Odgren PR, Park SK, Rehling P, Reichert AS, Sheikh MS, Taylor SS, Tsuchida N, van der Bliek AM, van der Klei IJ, Weissman JS, Westermann B, Zha J, Neupert W, Nunnari J. Uniform nomenclature for the mitochondrial contact site and cristae organizing system. *J Cell Biol.* 31. März 2014;204(7):1083–6.
37. Koob S, Barrera M, Anand R, Reichert AS. The non-glycosylated isoform of MIC26 is a constituent of the mammalian MICOS complex and promotes formation of crista junctions. *Biochim Biophys Acta.* Juli 2015;1853(7):1551–63.
38. Harner ME, Unger A-K, Izawa T, Walther DM, Ozbalci C, Geimer S, Reggiori F, Brügger B, Mann M, Westermann B, Neupert W. Aim24 and MICOS modulate respiratory function, tafazzin-related cardiolipin modification and mitochondrial architecture. *eLife.* 1. Januar 2014;3:e01684.
39. Paradies G, Paradies V, De Benedictis V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochim Biophys Acta.* April 2014;1837(4):408–17.
40. Klingenberg M. Cardiolipin and mitochondrial carriers. *Biochim Biophys Acta.* Oktober 2009;1788(10):2048–58.
41. Musatov A, Sedlák E. Role of cardiolipin in stability of integral membrane proteins. *Biochimie.* November 2017;142:102–11.
42. Lange C, Nett JH, Trumpower BL, Hunte C. Specific roles of protein-phospholipid interactions in the yeast cytochrome bc1 complex structure. *EMBO J.* 3. Dezember 2001;20(23):6591–600.
43. Musatov A, Robinson NC. Bound cardiolipin is essential for cytochrome c oxidase proton translocation. *Biochimie.* Oktober 2014;105:159–64.
44. Mileykovskaya E, Dowhan W. Cardiolipin-dependent formation of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Chem Phys Lipids.* April 2014;179:42–8.
45. Claypool SM. Cardiolipin, a critical determinant of mitochondrial carrier protein assembly and function. *Biochim Biophys Acta.* Oktober 2009;1788(10):2059–68.
46. Enríquez JA. Supramolecular Organization of Respiratory Complexes. *Annu Rev Physiol.* 2016;78:533–61.
47. Genova ML, Lenaz G. Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Biochim Biophys Acta.* April 2014;1837(4):427–43.
48. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 1. Januar 2009;417(1):1–13.

49. Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Ruggiero FM. The effect of reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain on the cytochrome c oxidase activity and on the cardiolipin content in bovine heart sub-mitochondrial particles. *FEBS Lett.* 28. Januar 2000;466(2–3):323–6.
50. Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Ruggiero FM. Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage. *Gene.* 6. März 2002;286(1):135–41.
51. Kagan VE, Tyurin VA, Jiang J, Tyurina YY, Ritov VB, Amoscato AA, Osipov AN, Belikova NA, Kapralov AA, Kini V, Vlasova II, Zhao Q, Zou M, Di P, Svistunenko DA, Kurnikov IV, Borisenko GG. Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nat Chem Biol.* September 2005;1(4):223–32.
52. Schug ZT, Gottlieb E. Cardiolipin acts as a mitochondrial signalling platform to launch apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* Oktober 2009;1788(10):2022–31.
53. Petrosillo G, Casanova G, Matera M, Ruggiero FM, Paradies G. Interaction of peroxidized cardiolipin with rat-heart mitochondrial membranes: induction of permeability transition and cytochrome c release. *FEBS Lett.* 27. November 2006;580(27):6311–6.
54. Schlame M, Horvath L, Vigh L. Relationship between lipid saturation and lipid-protein interaction in liver mitochondria modified by catalytic hydrogenation with reference to cardiolipin molecular species. *Biochem J.* 1. Januar 1990;265(1):79–85.
55. Xu Y, Phoon CKL, Berno B, D'Souza K, Hoedt E, Zhang G, Neubert TA, Epand RM, Ren M, Schlame M. Loss of protein association causes cardiolipin degradation in Barth syndrome. *Nat Chem Biol.* August 2016;12(8):641–7.
56. Stepanyants N, Macdonald PJ, Francy CA, Mears JA, Qi X, Ramachandran R. Cardiolipin's propensity for phase transition and its reorganization by dynamin-related protein 1 form a basis for mitochondrial membrane fission. *Mol Biol Cell.* 1. September 2015;26(17):3104–16.
57. Ban T, Ishihara T, Kohno H, Saita S, Ichimura A, Maenaka K, Oka T, Mihara K, Ishihara N. Molecular basis of selective mitochondrial fusion by heterotypic action between OPA1 and cardiolipin. *Nat Cell Biol.* Juli 2017;19(7):856–63.
58. Barth PG, Scholte HR, Berden JA, Van der Klei-Van Moorsel JM, Luyt-Houwen IE, Van 't Veer-Korthof ET, Van der Harten JJ, Sobotka-Plojhar MA. An X-linked mitochondrial disease affecting cardiac muscle, skeletal muscle and neutrophil leucocytes. *J Neurol Sci.* Dezember 1983;62(1–3):327–55.
59. Steward CG, Newbury-Ecob RA, Hastings R, Smithson SF, Tsai-Goodman B, Quarrell OW, Kulik W, Wanders R, Pennock M, Williams M, Cresswell JL, Gonzalez IL, Brennan P. Barth syndrome: an X-linked cause of fetal cardiomyopathy and stillbirth. *Prenat Diagn.* 2010;30(10):970–6.

60. Xu Y, Condell M, Plesken H, Edelman-Novemsky I, Ma J, Ren M, Schlame M. A *Drosophila* model of Barth syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1. August 2006;103(31):11584–8.
61. Wolf MJ, Rockman HA. *Drosophila*, genetic screens, and cardiac function. *Circ Res*. 16. September 2011;109(7):794–806.
62. Wolf MJ, Amrein H, Izatt JA, Choma MA, Reedy MC, Rockman HA. *Drosophila* as a model for the identification of genes causing adult human heart disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 31. Januar 2006;103(5):1394–9.
63. “The Nobel Prize has a strong role to play” [Internet]. NobelPrize.org. [zitiert 28. April 2021]. Verfügbar unter: <https://www.nobelprize.org/the-nobel-prize-has-a-strong-role-to-play/>
64. Organs | *droso4schools* [Internet]. [zitiert 11. Mai 2021]. Verfügbar unter: <https://droso4schools.wordpress.com/organs/>
65. Sellin J, Albrecht S, Kölsch V, Paululat A. Dynamics of heart differentiation, visualized utilizing heart enhancer elements of the *Drosophila melanogaster* bHLH transcription factor Hand. *Gene Expr Patterns*. 1. April 2006;6(4):360–75.
66. Lehmacher C, Abeln B, Paululat A. The ultrastructure of *Drosophila* heart cells. *Arthropod Struct Dev*. September 2012;41(5):459–74.
67. Azpiazu N, Frasch M. *tinman* and *bagpipe*: two homeo box genes that determine cell fates in the dorsal mesoderm of *Drosophila*. *Genes Dev*. Juli 1993;7(7B):1325–40.
68. Bodmer R. The gene *tinman* is required for specification of the heart and visceral muscles in *Drosophila*. *Dev Camb Engl*. Juli 1993;118(3):719–29.
69. Rotstein B, Paululat A. On the Morphology of the *Drosophila* Heart. *J Cardiovasc Dev Dis* [Internet]. 12. April 2016 [zitiert 21. April 2021];3(2). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5715677/>
70. Lammers K, Abeln B, Hüsken M, Lehmacher C, Psathaki OE, Alcorta E, Meyer H, Paululat A. Formation and function of intracardiac valve cells in the *Drosophila* heart. *J Exp Biol*. 15. Mai 2017;220(Pt 10):1852–63.
71. Zeitouni B, Sénatore S, Séverac D, Aknin C, Sémériva M, Perrin L. Signalling Pathways Involved in Adult Heart Formation Revealed by Gene Expression Profiling in *Drosophila*. *PLOS Genet*. 12. Oktober 2007;3(10):e174.
72. Hollfelder D, Frasch M, Reim I. Distinct functions of the laminin  $\beta$  LN domain and collagen IV during cardiac extracellular matrix formation and stabilization of alary muscle attachments revealed by EMS mutagenesis in *Drosophila*. *BMC Dev Biol*. 17. Juni 2014;14:26.
73. Weavers H, Prieto-Sánchez S, Grawe F, Garcia-López A, Artero R, Wilsch-Bräuning M, Ruiz-Gómez M, Skaer H, Denholm B. The insect nephrocyte is a podocyte-like cell with a filtration slit diaphragm. *Nature*. 15. Januar 2009;457(7227):322–6.

74. Dulcis D, Levine RB. Innervation of the heart of the adult fruit fly, *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol*. 27. Oktober 2003;465(4):560–78.
75. Gu GG, Singh S. Pharmacological analysis of heartbeat in *Drosophila*. *J Neurobiol*. November 1995;28(3):269–80.
76. Ocorr K, Reeves NL, Wessells RJ, Fink M, Chen H-SV, Akasaka T, Yasuda S, Metzger JM, Giles W, Posakony JW, Bodmer R. KCNQ potassium channel mutations cause cardiac arrhythmias in *Drosophila* that mimic the effects of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 6. März 2007;104(10):3943–8.
77. Ocorr K, Zambon A, Nudell Y, Pineda S, Diop S, Tang M, Akasaka T, Taylor E. Age-dependent electrical and morphological remodeling of the *Drosophila* heart caused by hERG/seizure mutations. *PLoS Genet*. Mai 2017;13(5):e1006786.
78. Abraham DM, Wolf MJ. Disruption of Sarcoendoplasmic Reticulum Calcium ATPase Function in *Drosophila* Leads to Cardiac Dysfunction. *PLoS ONE*. 3. Oktober 2013;8(10):e77785.
79. Wasserthal LT. *Drosophila* flies combine periodic heartbeat reversal with a circulation in the anterior body mediated by a newly discovered anterior pair of ostial valves and 'venous' channels. *J Exp Biol*. 1. November 2007;210(21):3707–19.
80. Ponzilli R, Astier M, Chartier A, Gallet A, Théron P, Sémériva M. Heart tube patterning in *Drosophila* requires integration of axial and segmental information provided by the Bithorax Complex genes and hedgehog signaling. *Dev Camb Engl*. Oktober 2002;129(19):4509–21.
81. Tögel M, Pass G, Paululat A. The *Drosophila* wing hearts originate from pericardial cells and are essential for wing maturation. *Dev Biol*. 1. Juni 2008;318(1):29–37.
82. Hayashi S, Kondo T. Development and Function of the *Drosophila* Tracheal System. *Genetics*. Juni 2018;209(2):367–80.
83. Lalevée N, Monier B, Sénatore S, Perrin L, Sémériva M. Control of Cardiac Rhythm by ORK1, a *Drosophila* Two-Pore Domain Potassium Channel. *Curr Biol*. 8. August 2006;16(15):1502–8.
84. Papaefthimiou C, Theophilidis G. An in vitro method for recording the electrical activity of the isolated heart of the adult *Drosophila melanogaster*. *Vitro Cell Dev Biol - Anim*. 1. Juli 2001;37(7):445–9.
85. Kaushik G, Fuhrmann A, Cammarato A, Engler AJ. In Situ Mechanical Analysis of Myofibrillar Perturbation and Aging on Soft, Bilayered *Drosophila* Myocardium. *Biophys J*. 7. Dezember 2011;101(11):2629–37.
86. Fink M, Callol-Massot C, Chu A, Ruiz-Lozano P, Belmonte JCI, Giles W, Bodmer R, Ocorr K. A new method for detection and quantification of heartbeat parameters in *Drosophila*, zebrafish, and embryonic mouse hearts. *BioTechniques*. Februar 2009;46(2):101–13.

87. Klassen MP, Peters CJ, Zhou S, Williams HH, Jan LY, Jan YN. Age-dependent diastolic heart failure in an in vivo *Drosophila* model. Volk T, Herausgeber. eLife. 22. März 2017;6:e20851.
88. Perveen FK. Introduction to *Drosophila* [Internet]. *Drosophila melanogaster* - Model for Recent Advances in Genetics and Therapeutics. IntechOpen; 2018 [zitiert 3. August 2021]. Verfügbar unter: <https://www.intechopen.com/chapters/54451>
89. Chyb S, Gompel N. Atlas of *Drosophila* Morphology [Internet]. Elsevier; 2013 [zitiert 31. März 2021]. Verfügbar unter: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/C2009061936X>
90. Thibault ST, Singer MA, Miyazaki WY, Milash B, Dompe NA, Singh CM, Buchholz R, Demsky M, Fawcett R, Francis-Lang HL, Ryner L, Cheung LM, Chong A, Erickson C, Fisher WW, Greer K, Hartouni SR, Howie E, Jakkula L, Joo D, Killpack K, Laufer A, Mazzotta J, Smith RD, Stevens LM, Stuber C, Tan LR, Ventura R, Woo A, Zakrajsek I, Zhao L, Chen F, Swimmer C, Kopczyński C, Duyk G, Winberg ML, Margolis J. A complementary transposon tool kit for *Drosophila melanogaster* using P and piggyBac. *Nat Genet.* März 2004;36(3):283–7.
91. Brand AH, Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development.* 1. Juni 1993;118(2):401–15.
92. Dietzl G, Chen D, Schnorrer F, Su K-C, Barinova Y, Fellner M, Gasser B, Kinsey K, Oettel S, Scheiblauer S, Couto A, Marra V, Keleman K, Dickson BJ. A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature.* Juli 2007;448(7150):151–6.
93. Duffy JB. GAL4 system in *drosophila*: A fly geneticist's swiss army knife. *genesis.* 2002;34(1–2):1–15.
94. Han Z, Olson EN. Hand is a direct target of Tinman and GATA factors during *Drosophila* cardiogenesis and hematopoiesis. *Development.* 1. August 2005;132(15):3525–36.
95. VDRC Stock Center: PageTitlePublication [Internet]. [zitiert 1. April 2021]. Verfügbar unter: [https://stockcenter.vdrc.at/control/library\\_rnai](https://stockcenter.vdrc.at/control/library_rnai)
96. gvogler/FlyHearts-tdtK-Rscripts [Internet]. GitHub. [zitiert 1. April 2021]. Verfügbar unter: <https://github.com/gvogler/FlyHearts-tdtK-Rscripts>
97. Chen S, Hoene M, Li J, Li Y, Zhao X, Häring H-U, Schleicher ED, Weigert C, Xu G, Lehmann R. Simultaneous extraction of metabolome and lipidome with methyl tert-butyl ether from a single small tissue sample for ultra-high performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 12. Juli 2013;1298:9–16.
98. Tsugawa H, Cajka T, Kind T, Ma Y, Higgins B, Ikeda K, Kanazawa M, VanderGheynst J, Fiehn O, Arita M. MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nat Methods.* Juni 2015;12(6):523–6.

99. Jaeger C, Lisec J. Statistical and Multivariate Analysis of MS-Based Plant Metabolomics Data. In: António C, Herausgeber. Plant Metabolomics: Methods and Protocols [Internet]. New York, NY: Springer; 2018 [zitiert 1. April 2021]. S. 285–96. (Methods in Molecular Biology). Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7819-9\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7819-9_20)
100. Singleton K, Woodruff RI. The Osmolarity of Adult *Drosophila* Hemolymph and Its Effect on Oocyte-Nurse Cell Electrical Polarity. *Dev Biol.* 1. Januar 1994;161(1):154–67.
101. Wang JW, Wong AM, Flores J, Vosshall LB, Axel R. Two-Photon Calcium Imaging Reveals an Odor-Evoked Map of Activity in the Fly Brain. *Cell.* 24. Januar 2003;112(2):271–82.
102. Neville KE, Bosse TL, Klekos M, Mills JF, Weicksel SE, Waters JS, Tipping M. A novel ex vivo method for measuring whole brain metabolism in model systems. *J Neurosci Methods.* 15. Februar 2018;296:32–43.
103. Kespohl M, Bredow C, Klingel K, Voß M, Paeschke A, Zickler M, Poller W, Kaya Z, Eckstein J, Fechner H, Spranger J, Fähling M, Wirth EK, Radoshevich L, Thery F, Impens F, Berndt N, Knobloch K-P, Beling A. Protein modification with ISG15 blocks coxsackievirus pathology by antiviral and metabolic reprogramming. *Sci Adv.* März 2020;6(11):eaay1109.
104. Linford NJ, Bilgir C, Ro J, Pletcher SD. Measurement of Lifespan in *Drosophila melanogaster*. *J Vis Exp.* 7. Januar 2013;(71):50068.
105. Schlame M, Blais S, Edelman-Novemsky I, Xu Y, Montecillo F, Phoon CKL, Ren M, Neubert TA. Comparison of cardiolipins from *Drosophila* strains with mutations in putative remodeling enzymes. *Chem Phys Lipids.* 1. Juli 2012;165(5):512–9.
106. Blumrich A, Vogler G, Dresen S, Diop SB, Jaeger C, Leberer S, Grune J, Wirth EK, Hoeft B, Renko K, Foryst-Ludwig A, Spranger J, Sigrist S, Bodmer R, Kintscher U. Fat-body brummer lipase determines survival and cardiac function during starvation in *Drosophila melanogaster*. *iScience.* 23. April 2021;24(4):102288.
107. Flores RE, Brown AK, Taus L, Khoury J, Glover F, Kami K, Sarangarajan R, Walshe TE, Narain NR, Kiebish MA, Shelton LM, Chinopoulos C, Seyfried TN. Mycoplasma infection and hypoxia initiate succinate accumulation and release in the VM-M3 cancer cells. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg.* 1. September 2018;1859(9):975–83.
108. Ocorr K, Perrin L, Lim H-Y, Qian L, Wu X, Bodmer R. Genetic control of heart function and aging in *Drosophila*. *Trends Cardiovasc Med.* Juli 2007;17(5):177–82.
109. Harvey RP. NK-2 homeobox genes and heart development. *Dev Biol.* 15. September 1996;178(2):203–16.

110. Risebro CA, Petchey LK, Smart N, Gomes J, Clark J, Vieira JM, Yanni J, Dobrzynski H, Davidson S, Zuberi Z, Tinker A, Shui B, Tallini YI, Kotlikoff MI, Miquerol L, Schwartz RJ, Riley PR. Epistatic rescue of Nkx2.5 adult cardiac conduction disease phenotypes by prospero-related homeobox protein 1 and HDAC3. *Circ Res.* 6. Juli 2012;111(2):e19-31.
111. Zhu S, Han Z, Luo Y, Chen Y, Zeng Q, Wu X, Yuan W. Molecular mechanisms of heart failure: insights from *Drosophila*. *Heart Fail Rev.* 1. Januar 2017;22(1):91–8.
112. Piazza N, Wessells RJ. Chapter 5 - *Drosophila* Models of Cardiac Disease. In: Chang KT, Min K-T, Herausgeber. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* [Internet]. Academic Press; 2011 [zitiert 11. Juli 2021]. S. 155–210. (Animal Models of Human Disease; Bd. 100). Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123848789000054>
113. Acehan D, Vaz F, Houtkooper RH, James J, Moore V, Tokunaga C, Kulik W, Wansapura J, Toth MJ, Strauss A, Khuchua Z. Cardiac and skeletal muscle defects in a mouse model of human Barth syndrome. *J Biol Chem.* 14. Januar 2011;286(2):899–908.
114. Powers C, Huang Y, Strauss A, Khuchua Z. Diminished Exercise Capacity and Mitochondrial bc1 Complex Deficiency in Tafazzin-Knockdown Mice. *Front Physiol.* 2013;4:74.
115. Phoon CKL, Acehan D, Schlame M, Stokes DL, Edelman-Novemsky I, Yu D, Xu Y, Viswanathan N, Ren M. Tafazzin knockdown in mice leads to a developmental cardiomyopathy with early diastolic dysfunction preceding myocardial noncompaction. *J Am Heart Assoc.* April 2012;1(2):jah3-e000455.
116. Spencer CT, Bryant RM, Day J, Gonzalez IL, Colan SD, Thompson WR, Berthy J, Redfearn SP, Byrne BJ. Cardiac and clinical phenotype in Barth syndrome. *Pediatrics.* August 2006;118(2):e337-346.
117. Ren M, Phoon CKL, Schlame M. Metabolism and function of mitochondrial cardiolipin. *Prog Lipid Res.* Juli 2014;55:1–16.
118. Schlame M, Ren M. Barth syndrome, a human disorder of cardiolipin metabolism. *FEBS Lett.* 9. Oktober 2006;580(23):5450–5.
119. Ronvelia D, Greenwood J, Platt J, Hakim S, Zaragoza MV. Intrafamilial variability for novel TAZ gene mutation: Barth syndrome with dilated cardiomyopathy and heart failure in an infant and left ventricular noncompaction in his great-uncle. *Mol Genet Metab.* November 2012;107(3):428–32.
120. Acehan D, Malhotra A, Xu Y, Ren M, Stokes DL, Schlame M. Cardiolipin Affects the Supramolecular Organization of ATP Synthase in Mitochondria. *Biophys J.* 4. Mai 2011;100(9):2184–92.
121. Sanyal S, Jennings T, Dowse H, Ramaswami M. Conditional mutations in SERCA, the Sarco-endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase, alter heart rate and rhythmicity in *Drosophila*. *J Comp Physiol B.* 1. März 2006;176(3):253–63.

122. Saini-Chohan HK, Holmes MG, Chicco AJ, Taylor WA, Moore RL, McCune SA, Hickson-Bick DL, Hatch GM, Sparagna GC. Cardiolipin biosynthesis and remodeling enzymes are altered during development of heart failure. *J Lipid Res.* August 2009;50(8):1600–8.
123. Steptoe A, Kivimäki M. Stress and cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol.* 3. April 2012;9(6):360–70.
124. Monastirioti M, Gorczyca M, Rapus J, Eckert M, White K, Budnik V. Octopamine immunoreactivity in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol.* 1995;356(2):275–87.
125. Zornik E, Paisley K, Nichols R. Neural transmitters and a peptide modulate *Drosophila* heart rate. *Peptides.* 1. Januar 1999;20(1):45–51.
126. Paternostro G, Vignola C, Bartsch D-U, Omens JH, McCulloch AD, Reed JC. Age-Associated Cardiac Dysfunction in *Drosophila melanogaster*. *Circ Res.* 25. Mai 2001;88(10):1053–8.
127. Lakatta EG, Spurgeon HA, Janczewski AM. Changes in the Heart That Accompany Advancing Age: Humans to Molecules. In: Jugdutt BI, Herausgeber. *Aging and Heart Failure: Mechanisms and Management* [Internet]. New York, NY: Springer; 2014 [zitiert 25. Juni 2021]. S. 319–37. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0268-2\\_21](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0268-2_21)
128. Cheng S, Fernandes VRS, Bluemke DA, McClelland RL, Kronmal RA, Lima JAC. Age-related left ventricular remodeling and associated risk for cardiovascular outcomes: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Circ Cardiovasc Imaging.* Mai 2009;2(3):191–8.
129. Carrick-Ranson G, Hastings JL, Bhella PS, Shibata S, Fujimoto N, Palmer MD, Boyd K, Levine BD. Effect of healthy aging on left ventricular relaxation and diastolic suction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1. August 2012;303(3):H315–322.
130. Feridooni HA, Dibb KM, Howlett SE. How cardiomyocyte excitation, calcium release and contraction become altered with age. *J Mol Cell Cardiol.* Juni 2015;83:62–72.
131. Schlame M, Towbin JA, Heerdt PM, Jehle R, DiMauro S, Blanck TJJ. Deficiency of tetralinoleoyl-cardiolipin in Barth syndrome. *Ann Neurol.* 2002;51(5):634–7.
132. Schlame M, Ren M, Xu Y, Greenberg ML, Haller I. Molecular symmetry in mitochondrial cardiolipins. *Chem Phys Lipids.* Dezember 2005;138(1–2):38–49.
133. Aw WC, Bajracharya R, Towarnicki SG, Ballard JWO. Assessing bioenergetic functions from isolated mitochondria in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Methods.* 8. Juni 2016;3(2):e42.
134. Imai Y, Meng H, Yamashita C, Hattori N. Measurements of the mitochondrial respiration and glycolytic activity in *Drosophila* embryonic cells. 2017;

135. UCP4C mediates uncoupled respiration in larvae of *Drosophila melanogaster*. *EMBO Rep.* 1. Mai 2014;15(5):586–91.
136. Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Cardiolipin and mitochondrial function in health and disease. *Antioxid Redox Signal.* 20. April 2014;20(12):1925–53.
137. Hill BG, Benavides GA, Lancaster JR, Ballinger S, Dell'Italia L, Jianhua Z, Darley-Usmar VM. Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy. *Biol Chem.* Dezember 2012;393(12):1485–512.
138. Divakaruni AS, Paradyse A, Ferrick DA, Murphy AN, Jastroch M. Analysis and interpretation of microplate-based oxygen consumption and pH data. *Methods Enzymol.* 2014;547:309–54.
139. Kiebish MA, Yang K, Sims HF, Jenkins CM, Liu X, Mancuso DJ, Zhao Z, Guan S, Abendschein DR, Han X, Gross RW. Myocardial regulation of lipidomic flux by cardiolipin synthase: setting the beat for bioenergetic efficiency. *J Biol Chem.* 20. Juli 2012;287(30):25086–97.
140. Szeto HH. First-in-class cardiolipin-protective compound as a therapeutic agent to restore mitochondrial bioenergetics. *Br J Pharmacol.* April 2014;171(8):2029–50.
141. Szeto HH, Birk AV. Serendipity and the discovery of novel compounds that restore mitochondrial plasticity. *Clin Pharmacol Ther.* Dezember 2014;96(6):672–83.
142. Butler J, Khan MS, Anker SD, Fonarow GC, Kim RJ, Nodari S, O'Connor CM, Pieske B, Pieske-Kraigher E, Sabbah HN, Senni M, Voors AA, Udelson JE, Carr J, Gheorghiade M, Filippatos G. Effects of Elamipretide on Left Ventricular Function in Patients With Heart Failure With Reduced Ejection Fraction: The PROGRESS-HF Phase 2 Trial. *J Card Fail.* 1. Mai 2020;26(5):429–37.
143. Pennington ER, Funai K, Brown DA, Shaikh SR. The role of cardiolipin concentration and acyl chain composition on mitochondrial inner membrane molecular organization and function. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* Juli 2019;1864(7):1039–52.
144. Dai W, Shi J, Gupta RC, Sabbah HN, Hale SL, Kloner RA. Bendavia, a mitochondria-targeting peptide, improves postinfarction cardiac function, prevents adverse left ventricular remodeling, and restores mitochondria-related gene expression in rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* Dezember 2014;64(6):543–53.
145. Chatfield KC, Sparagna GC, Chau S, Phillips EK, Ambardekar AV, Aftab M, Mitchell MB, Sucharov CC, Miyamoto SD, Stauffer BL. Elamipretide Improves Mitochondrial Function in the Failing Human Heart. *JACC Basic Transl Sci.* April 2019;4(2):147–57.
146. Karaa A, Haas R, Goldstein A, Vockley J, Weaver WD, Cohen BH. Randomized dose-escalation trial of elamipretide in adults with primary mitochondrial myopathy. *Neurology.* 3. April 2018;90(14):e1212–21.

147. Tian R, Colucci WS, Arany Z, Bachschmid MM, Ballinger SW, Boudina S, Bruce JE, Busija DW, Dikalov S, Dorn GW, Galis ZS, Gottlieb RA, Kelly DP, Kitsis RN, Kohr MJ, Levy D, Lewandowski ED, McClung JM, Mochly-Rosen D, O'Brien KD, O'Rourke B, Park J-Y, Ping P, Sack MN, Sheu S-S, Shi Y, Shiva S, Wallace DC, Weiss RG, Vernon HJ, Wong R, Schwartz Longacre L. Unlocking the Secrets of Mitochondria in the Cardiovascular System: Path to a Cure in Heart Failure—A Report from the 2018 National Heart, Lung, and Blood Institute Workshop. *Circulation*. 1. Oktober 2019;140(14):1205–16.
148. Song C, Zhang J, Qi S, Liu Z, Zhang X, Zheng Y, Andersen J, Zhang W, Strong R, Martinez PA, Musi N, Nie J, Shi Y. Cardiolipin remodeling by ALCAT1 links mitochondrial dysfunction to Parkinson's diseases. *Aging Cell*. Juni 2019;18(3):e12941.

## 11 Eidesstaatliche Erklärung

Ich, Sarah Leberer, versichere an des Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Rolle von Cardiolipinen für die Herzfunktion von *Drosophila melanogaster*“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

---

Datum

Unterschrift

### Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Sarah Leberer hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

1. Annelie Blumrich, Georg Vogler, Soda Balla Diop, Carsten Jaeger, Sarah Leberer, Eva K. Wirth, Beata Hoefft, Kostja Renko, Anna Foryst-Ludwig, Joachim Spranger, Stephan Sigrist, Rolf Bodmer, Ulrich Kintscher (2021): Fat-body brummer lipase determines survival and cardiac function during starvation in *Drosophila melanogaster*.. iScience 9;24(4):102288, PMID: 33889813

Beitrag im Einzelnen:

- Mitarbeit bei der Etablierung der Seahorse-Methode
- Mitarbeit bei der Datenaquise für mitochondriale Funktionsmessungen (Seahorse)

2. Elia Smeir \*, **Sarah Leberer** \*, Annelie Blumrich, Georg Vogler , Anastasia Vasiliades, Sandra Dresen , Carsten Jaeger, Yoann Gloaguen, Christian Klose, Dieter Beule, P Christian Schulze, Rolf Bodmer, Anna Foryst-Ludwig, Ulrich Kintscher (2021): Depletion of cardiac cardiolipin synthase alters systolic and diastolic function iScience 19;24(11):103314, PMID: 34805785

Beitrag im Einzelnen:

- Herzfunktionsanalyse *Drosophila melanogaster*
- Datenaquise für mitochondriale Funktionsmessungen (Seahorse)

---

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## **12 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

### 13 Publikationsliste

1. Annelie Blumrich, Georg Vogler, Soda Balla Diop, Carsten Jaeger, **Sarah Leberer**, Eva K. Wirth, Beata Hoeft, Kostja Renko, Anna Foryst-Ludwig, Joachim Spranger, Stephan Sigrist, Rolf Bodmer, Ulrich Kintscher (2021): Fat-body brummer lipase determines survival and cardiac function during starvation in *Drosophila melanogaster*. iScience 9;24(4):102288, PMID: 33889813

2. Elia Smeir \*, **Sarah Leberer** \*, Annelie Blumrich, Georg Vogler , Anastasia Vasiliades, Sandra Dresen , Carsten Jaeger, Yoann Gloaguen, Christian Klose, Dieter Beule, P Christian Schulze, Rolf Bodmer, Anna Foryst-Ludwig, Ulrich Kintscher (2021): Depletion of cardiac cardiolipin synthase alters systolic and diastolic function iScience 19;24(11):103314, PMID: 34805785

## 14 Danksagung

Am Ende meiner Doktorandinnen-Zeit blicke ich auf einen Weg zurück und bin dankbar, für all die Menschen und Begegnungen, die mir im Rahmen meiner Promotion zuteil wurden.

Herzlichen Dank Herr Prof. Kintscher für Ihr Vertrauen in meine Arbeit und die Möglichkeit ein wirklich eigenes Projekt in sehr guter Betreuung durchführen zu dürfen.

Danke Annelie, dafür dass du mir die Tür in die Welt von *Drosophila* geöffnet hast. Danke für deine Geduld, deine Unterstützung und nicht zuletzt deine Weitsicht bei der Planung von Experimenten und bei der Gestaltung von Vorträgen Du bist ein absolutes Vorbild - nicht nur was das wissenschaftliche Arbeiten betrifft.

Danke Anna, für deine offene Bürotür und deine unendliche Hilfsbereitschaft. Danke Beata, dass du im Fliegenlabor eingesprungen bist und für deine unerschütterliche gute Laune. Danke Jule für deine Einweisung ins wissenschaftliche Schreiben und die Mitkorrektur dieser Arbeit. Danke Melanie, für die Unterstützung in organisatorischen Belangen rund um unser Labor.

Danke an alle Mitglieder der AG Kintscher für einen lebendigen Doktorandenraum und die gute Zusammenarbeit – nicht nur bei der Vernichtung des Freitagabendfeierabends.

Ein großes Dankeschön an die AG Bodmer, unsere *Drosophila*-Kooperationspartner für die praktische Unterstützung– sei es durch die Bereitstellung von Fliegen und Software zur Etablierung der Klassen-Methode oder beim Planen unserer Versuche. Ein besonderes Dankeschön an Geo Vogler, für nächtlichen Software-Support und deine Hilfe beim Aufsetzen der Computerprogramme und Mikroskope.

Dankeschön an die AG Spranger, die mit uns ihre Erfahrungen zur Mitochondrienfunktionsanalyse teilten und unser Experiment, durch das Teilen einer Idee erst möglich machte.

Danke an die AG Sigrist, insbesondere an Eva und Tian, die uns stets für einen fachlichen Austausch zu haben waren, aber auch praktisch mit dem Schleifen von Präp-Besteck und dem Erlernen von Methoden zur Seite standen.

Eva, Emilie, Olga, Tanja und Annelie ein Dankeschön für den fruchtbaren Austausch rund um *Drosophila* und Herz.

Dr. Franziska Schwarz von Sci vis to danke ich für die Zeichnung der in den Abbildungen verwendeten Fliege und des Fliegenherzens.

Ein großes Dankeschön Allen, die mich in meiner wissenschaftlichen Ausbildung gefördert und gefordert haben. Dem CCR mit allen motivierten, interessierten Mitgliedern des Wednesday-Seminars und allen, die zum kollegialen Austausch beitragen. Danke auch an das DZHK, welches die Teilnahme an Kongressen unterstütze und mit dem Young-DZHK zudem eine wertvolle Austausch-Plattform für Jungwissenschaftler geschaffen hat.

Gerade in der einsamen Schreibphase dieser Arbeit danke ich dir lieber Flo für dein Zuhören, Korrekturlesen, deine Unterstützung und dein großes Vertrauen in meine Fertigkeiten und das immer wieder gemeinsame Aufbrechen an wunderbare Orte, die meinen Schreibfluss beflügelt und mir das Gefühl von Lebendigkeit geschenkt haben.

Herzlichen Dank an Anna und all die DoktorandInnen deiner wunderbaren Coworking-Plattform. Ihr wart das Ende der Einsamkeit in der Schreibphase und noch viel mehr als das! Danke für eure Offenheit, euer Teilen im Austausch und die vielen gemeinschaftlich abgeleisteten Arbeitsstunden.

Danke auch an all die Menschen, die bewusst oder unbewusst meinen Weg durch die Promotion begleitet und bereichert haben. Danke Hanna, Martin, Ben, Louise, Alina, Isabel, Kulreet, Ruth, Sina, Lisa.

Zum Schluss möchte ich meiner lieben Familie danken, die mich in meinem Weg und in meinen Ideen bestärkt hat und mir einen festen Boden unter meinen Füßen gibt.