

Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
Pharmakologie für Pharmazeuten
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Kardialer und kardiomyozytärer Stoffwechsel in CRTC1-defizienten Mäusen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften
Fachbereich Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Anna Laura Gundler
Hamburg, 2021

Erstgutachterin: Prof. Dr. med. Elke Oetjen

Zweitgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Friederike Cuello

Datum der Disputation: 18.06.2021

Datum der Druckfreigabe: 29.06.2021

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	21
1.1. Kardiale Hypertrophie und Herzinsuffizienz	21
1.2. Elektromechanische Kopplung	23
1.3. Kardialer Stoffwechsel	25
1.3.1. Mitochondrien und Energiebereitstellung	25
1.3.2. Glucose zur Energiegewinnung	27
1.3.3. Fettsäurestoffwechsel	29
1.3.4. Mitochondriale Atmung	30
1.4. S1P-System	33
1.5. <i>Crtc1</i> -defiziente Mäuse	35
1.6. Zielsetzung	38
2. Ergebnisse	41
2.1. Kardialer Stoffwechsel	41
2.1.1. Energiebilanz	42
2.1.2. Fettsäurestoffwechsel	44
2.1.3. Glucosestoffwechsel	46
2.1.4. Mitochondriale Atmung	51
2.2. Mitochondrienphysiologie	54
2.2.1. Mitochondrienbiogenese	54
2.2.2. Morphologie der Mitochondrien	58
2.2.3. Funktion und Integrität der Mitochondrien	62
2.3. Regulation des S1P-Systems	66
2.3.1. Gefäßverletzung	66
2.3.2. S1P Rezeptor Expression	68
2.3.3. Promotor Untersuchungen	69

2.4.	Kardialer Phänotyp	75
2.4.1.	Kontraktilität	75
2.4.2.	Calcium-Handling	77
2.4.3.	Kardiale CRTC Expression	79
2.4.4.	Herz- und Körpergewicht	82
3.	Diskussion	87
3.1.	Kardialer Stoffwechsel	89
3.2.	Mitochondrienphysiologie	96
3.3.	Kardiales Remodeling	102
3.4.	Phänotyp der <i>Crtc1</i> ^{-/-} Mäuse	104
4.	Ausblick	108
5.	Material und Methoden	111
5.1.	Material	111
5.1.1.	Chemikalien	111
5.1.2.	Kits	117
5.1.3.	Geräte und Software	119
5.1.4.	Verbrauchsmaterialien	122
5.1.5.	Primer	123
5.1.6.	Antikörper	125
5.1.7.	Plasmide	126
5.1.8.	Restriktionsenzyme	126
5.1.9.	DNA- und Proteinmolekulargewichtsmarker	126
5.1.10.	Vorratslösungen	128
5.1.11.	Zellen	128
5.1.12.	Tiermodelle	129
5.2.	Methoden	130
5.2.1.	Tiere	130
5.2.2.	Zellen und Zellorganellen	133
5.2.3.	Proteine	137
5.2.4.	Nucleinsäuren	142
5.2.5.	Statistische Analyse	158

Literaturverzeichnis	159
A. Auflistung der verwendeten Gefahrenstoffe nach GHS	202
B. Ergänzende Daten	207
C. Danksagung	208
D. Eidesstattliche Versicherung	210

Abbildungsverzeichnis

1.1. Morphologische Veränderungen bei kardialer Hypertrophie.	22
1.2. Übersicht kardialer Stoffwechsel und elektromechanische Kopplung.	28
1.3. Sphingolipid-Rheostat.	34
1.4. Regulation von CRTG.	37
2.1. mRNA Expression von die Energiebilanz betreffenden Genen in den Herzen von <i>Crtc1</i> ^{-/-} und <i>Mybpc3</i> ^{ki} Mäusen.	43
2.2. pACC Proteinmenge in den Herzen von <i>Crtc1</i> ^{-/-} und <i>Mybpc3</i> ^{ki} Mäusen.	44
2.3. <i>Prkg2</i> mRNA Expression in den Herzen von <i>Crtc1</i> ^{-/-} und Wildtypmäusen verschiedenen Alters.	44
2.4. mRNA Expression von den Fettsäuremetabolismus betreffenden Genen in den Herzen von <i>Crtc1</i> ^{-/-} und <i>Mybpc3</i> ^{ki} Mäusen.	45
2.5. mRNA Expression von den Fettsäuremetabolismus betreffenden Genen in den Herzen von <i>Crtc1</i> ^{-/-} und Wildtypmäusen verschiedenen Alters.	46
2.6. mRNA Expression von den Glucosemetabolismus betreffenden Genen in den Herzen von <i>Crtc1</i> ^{-/-} und <i>Mybpc3</i> ^{ki} Mäusen.	48
2.7. mRNA Expression von den Glucosemetabolismus betreffenden Genen in den Herzen von <i>Crtc1</i> ^{-/-} und Wildtypmäusen verschiedenen Alters.	50
2.8. Mitochondriale Atmung in den Herzen von <i>Crtc1</i> ^{-/-} und Wildtypmäusen.	52

2.9. Stimulierte mitochondriale Atmung und <i>Respiratory Control Ratio</i> in den Herzen von <i>Crtc1</i> ^{-/-} und Wildtypmäusen.	53
2.10. mRNA Expression von die Mitochondrienbiogenese betreffenden Genen in den Herzen von <i>Crtc1</i> ^{-/-} und <i>Mybpc3</i> ^{ki} Mäusen.	55
2.11. mRNA Expression von die Mitochondrienbiogenese betreffenden Genen in den Herzen von <i>Crtc1</i> ^{-/-} und Wildtypmäusen verschiedenen Alters.	57
2.12. PGC-1 α Proteinmenge in den Herzen von <i>Crtc1</i> ^{-/-} und <i>Mybpc3</i> ^{ki} Mäusen.	58
2.13. Rekrutierung von CRTC1 und CREB an den murinen <i>Ppargc1a</i> Promotor.	58
2.14. mRNA Expression von <i>fission</i> und <i>fusion</i> betreffenden Genen in den Herzen von <i>Crtc1</i> ^{-/-} und <i>Mybpc3</i> ^{ki} Mäusen.	59
2.15. Mitochondrien im linken Ventrikel von Wildtyp- und <i>Crtc1</i> ^{-/-} Mäusen.	60
2.16. Morphologische Merkmale der Mitochondrien in den linken Ventrikeln der <i>Crtc1</i> ^{-/-} Mäuse.	61
2.17. Calciumretentionskapazität von kardialen Mitochondrien aus <i>Crtc1</i> ^{-/-} Mäusen.	63
2.18. Redoxstatus von isolierten Kardiomyozyten aus <i>Crtc1</i> ^{-/-} Mäusen während erhöhter Arbeitslast.	64
2.19. Membranpotential $\Delta\Psi_M$ isolierter kardialer Mitochondrien aus <i>Crtc1</i> ^{-/-} Mäusen.	65
2.20. <i>Crtc</i> mRNA Expression in <i>S1pr3</i> ^{-/-} und Wildtypmäusen nach Ligatur der Arteria carotis.	67
2.21. <i>S1pr</i> mRNA Expression in den Herzen der <i>Crtc1</i> ^{-/-} Mäuse.	68
2.22. <i>S1pr</i> mRNA Expression in den Aorten der <i>Crtc1</i> ^{-/-} Mäuse.	69
2.23. CRE-abhängige Transkription in HEK293T Zellen durch Forskolin und Calcimycin.	71
2.24. <i>SPHK1</i> Promotoraktivität.	72
2.25. <i>S1PR3</i> Promotoraktivität.	73

2.26. Rekrutierung von CRTC1 und CREB an den murinen <i>Sphk1</i> Promotor.	74
2.27. Rekrutierung von CRTC1 und CREB an den murinen <i>S1pr3</i> Promotor.	74
2.28. Kontraktilität isolierter Kardiomyozyten von <i>Crtc1</i> ^{-/-} Mäusen.	76
2.29. Calciumkonzentration in isolierten Kardiomyozyten von <i>Crtc1</i> ^{-/-} Mäusen.	78
2.30. Calciumsensitivität isolierter Kardiomyozyten von <i>Crtc1</i> ^{-/-} Mäusen.	79
2.31. CRTC1 Proteinmenge in den Herzen von <i>Mybpc3</i> ^{ki} Mäusen.	80
2.32. <i>Crtc</i> mRNA Expression in den Herzen von <i>Mybpc3</i> ^{ki} Mäusen.	81
2.33. <i>Crtc2</i> und <i>Crtc3</i> mRNA Expression in den Herzen von <i>Crtc1</i> ^{-/-} Mäusen.	81
2.34. CRTC2 Proteinmenge in den Herzen von <i>Crtc1</i> ^{-/-} und <i>Mybpc3</i> ^{ki} Mäusen.	81
2.35. <i>Crtc2</i> und <i>Crtc3</i> mRNA Expression in den Herzen von <i>Crtc1</i> ^{-/-} und Wildtypmäusen verschiedenen Alters.	82
2.36. Kardiale Hypertrophie von <i>Crtc1</i> ^{-/-} und <i>Mybpc3</i> ^{ki} Mäusen.	83
2.37. Kardiale Hypertrophie von <i>Crtc1</i> ^{-/-} Mäusen verschiedenen Alters.	84
2.38. Körpergewicht von <i>Crtc1</i> ^{-/-} Mäusen verschiedenen Alters.	85
5.1. Schematische Darstellung und Prinzip des Proteinnachweises per Immunoblot.	140
5.2. Schematische Darstellung und Prinzip der quantitativen PCR mit Fluoreszenzfarbstoff.	144
5.3. Schematische Darstellung der Chromatinimmunopräzipitation.	155
B.1. Arrhythmik in isolierten Kardiomyozyten von <i>Crtc1</i> ^{-/-} Mäusen.	207

Tabellenverzeichnis

5.1. Chemikalien	111
5.2. Kits	117
5.3. Geräte	119
5.4. Software und Online-Tools	121
5.5. Verbrauchsmaterialien	122
5.6. Primerpaare	123
5.7. Primäre Antikörper	125
5.8. Sekundäre Antikörper, HRP-konjugiert	125
5.9. Plasmide	126
5.10. Restriktionsenzyme	126
5.12. Puffer und Lösungen für Immunoblot	137
5.13. Antikörper Anwendung für Immunoblot	141
5.14. Programm für qPCR	144
5.16. Primer für Genotypisierung	146
5.17. Programm für Genotypisierung	146
5.18. Puffer und Lösungen für Herstellung Plasmid DNA	147
5.19. Puffer und Lösungen für Promotor-Luciferase-Reportergen Analysen	150
5.20. Puffer und Lösungen für Chromatinimmunopräzipitation	153
5.22. Programm für PCR	158
A.1. Gefahrenhinweise (H-Sätze)	202
A.2. Sicherheitshinweise (P-Sätze)	204

Abkürzungsverzeichnis

ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase
ADP	Adenosindiphosphat
AGAT	L-Arginin:Glycin-Amidino-transferase
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ANP	atriales natriuretisches Peptid
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
β-MHC	β-Myosin schwere Kette
BCA	Bicinchoninsäure
BNP	<i>brain</i> natriuretisches Peptid
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca²⁺	Calciumkation
CaMK IV	Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase IV
cAMP	Zyklisches AMP
cDNA	komplementäre DNA

ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CMV	Cytomegalievirus
CN	Cyanid
CoA	Coenzym A
CPT-1b	Carnitin-Palmitoyltransferase 1b
CRE	cAMP responsives Element
CREB	CRE bindendes Protein
CRTC	CREB regulierter transkriptioneller Koaktivator
<i>Crtc1</i>^{-/-}	<i>Crtc1</i> -defizient
CsA	Cyclosporin A
CSQ	Calsequestrin
Ct	<i>cycle threshold</i>
dH₂O	deionisiertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNM1L	Dynamin 1-Like
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>

E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejektionsfraktion
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FBS	Fetales Kälberserum
FCCP	Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon
FSK	Forskolin
Gα_s	G-Protein α_s Untereinheit, kodiert durch <i>Gnas</i>
GFP	Grün-fluoreszierendes-Protein
GLUT	Glucose Transporter
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HCl	Salzsäure
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
HEK	Humane embryonale Niere
HG	Herzgewicht
HFpEF	Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion
HFrEF	Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
HSV-TK	Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase

IgG	Immunglobulin G
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LTCC	L-Typ-Ca ²⁺ -Kanal
LVH	linksventrikuläre Hypertrophie
MCU	Mitochondrialer Ca ²⁺ -Uniporter
MFN2	Mitofusin 2
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MT-ND1	mitochondriale NADH-Dehydrogenase 1
MYBPC3	Myosin-bindendes Protein C3
<i>Mybpc3^{ki}</i>	<i>Mybpc3</i> Knock-in
Na⁺	Natriumkation
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher
NNT	Nikotinamid-Nukleotid-Transhydrogenase
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCr	Phosphokreatin

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PDK	Pyruvatdehydrogenase Kinase
PDP	Pyruvatdehydrogenase Phosphatase
PGC-1α	Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma Koaktivator 1-alpha
PKA	Proteinkinase A
PLN	Phospholamban
PPARα	Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor alpha
PPARγ	Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma
PTP	<i>permeability transition pore</i>
qPCR	<i>real-time quantitative PCR</i>
RGS2	<i>regulator of G-protein signaling 2</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Reverse Transkription
RyR	Ryanodinrezeptor
S1P	Sphingosin-1-phosphat
S1PR	S1P Rezeptor
<i>S1pr3^{-/-}</i>	<i>S1pr3</i> -defizient
SDS	Natriumlaurylsulfat
SeAP	Sezernierte Alkalische Phosphatase
SEM	Standardfehler

Seq	Sequenzierung
SERCA	<i>sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase</i>
SIK	Salz-induzierbare Kinase
SOB	<i>Super Optimal Broth</i>
SOC	SOB mit Glucose zur Katabolitrepression
SPHK	Sphingosinkinase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
TAC	transversale Aortenverengung
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	TBS mit Tween 20
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFAM	mitochondrialer Transkriptionsfaktor A
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TL	Tibialänge
TMRM⁺	Tetramethylrhodamin-methylester
Tnl	Troponin I
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
WT	Wildtyp

Zusammenfassung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen, häufig mit einer Herzhypertrophie einhergehend, sind die häufigsten Todesursachen in Deutschland. Es wird zwischen einer physiologischen und einer pathologischen Hypertrophie unterschieden, wobei die pathologische Hypertrophie zu einer Herzinsuffizienz führen kann. Zusammen mit kardialer Hypertrophie treten Veränderungen des Herzstoffwechsels auf, wobei nicht abschließend geklärt ist, ob diese Modifikationen eine Folge des kardialen Remodelings sind oder zur Pathogenese beitragen. Mäuse ohne den CREB-regulierten Transkriptions-Coaktivator CRT1 (*Crtc1*^{-/-}) entwickeln spontan eine milde Hypertrophie und kardiale Dysfunktion. Da RNA-Seq- und Proteomics-Analysen in *Crtc1*^{-/-} Mäusen Veränderungen der Expression von an Stoffwechselprozessen beteiligten mRNA und Proteinen zeigten, wurden in dieser Arbeit Gene für Schlüsselenzyme des kardialen Stoffwechsels und der Mitochondrienphysiologie von *Crtc1*^{-/-} Mäusen untersucht. Als Vergleich diente Herzgewebe von *Mybpc3* Knock-in (*Mybpc3*^{ki}) Mäusen, einem etablierten Mausmodell für Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM). Im Kontrast zu *Crtc1*^{-/-} Mäusen wurde im Herzgewebe von *Mybpc3*^{ki} Mäusen erhöhte CRT1 mRNA- und Proteinmengen nachgewiesen.

In *Crtc1*^{-/-} Mäusen wurde die mRNA Menge in 5-6, 10-13, 25-30 und 45-52 Wochen alten Mäusen gemessen und mit ihren Wildtypgeschwistertieren verglichen. Es wurde untersucht, ob eine Veränderung des Expressionsmusters von Genen für Schlüsselenzyme des kardialen Stoffwechsels und der Mitochondrienphysiologie in Abhängigkeit des Alters bei *Crtc1*^{-/-} Mäusen vorliegt. Die mRNA Expression von den Metabolismus und die Mitochondrien betreffenden Genen war in Herzen von *Crtc1*^{-/-} Mäusen größtenteils unverändert im Vergleich zu ihren Wildtypgeschwistertieren. Die mRNA Expression von für die Mitochondrienbiogenese essenziellen Genen wie *Ppargc1a*, *mt-Nd1* und *Dnm1l* war in Herzen der *Mybpc3*^{ki} Mäuse verringert. Bei *Crtc1*^{-/-} Mäusen wurde keine veränderte mRNA oder Protein Expression von PGC-1 α gemessen, obwohl CRT1 an den murinen PGC-1 α Promotor im Herzgewebe rekrutiert wurde. Der mitochondriale Tran-

skriptionsfaktor A (TFAM) wird durch PGC-1 α induziert und die kardiale *Tfam* mRNA Expression war bei *Crtc1*^{-/-} Mäusen erhöht. Der Sauerstoffverbrauch kardialer Mitochondrien, gemessen mittels einer Clark-Elektrode, war bei *Crtc1*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu ihren Wildtypgeschwistertieren unverändert. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der linken Ventrikel von *Crtc1*^{-/-} Mäusen zeigten keine morphologischen Veränderungen der Mitochondrien. Ebenso war die mitochondriale Funktion gemessen anhand der Ca²⁺-Retentionskapazität, des Membranpotentials sowie des Redoxstatus unverändert.

In einem zweiten Projektteil wurde nach einer Gefäßverletzung in Carotisarterien eine verminderte *Crtc* mRNA Expression gemessen. Untersuchungen zur Regulation des Sphingosin-1-phosphat (S1P)-Systems zeigten eine unveränderte mRNA Expression der S1P-Rezeptoren sowohl in den Herzen als auch in den thorakalen Aorten von *Crtc1*^{-/-} Mäusen verglichen mit ihren Wildtypgeschwistertieren. Im Promotor-Luciferase-Reporter Assay konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Ca²⁺ den humanen S1P-Rezeptor 3 Promotor aktiviert (S1PR3), aber weder CREB noch CRT1 wurden in Maus Herzen an die Promotoren von S1PR3 oder der Sphingosinkinase 1 (SPHK1) rekrutiert.

Zur Beschreibung des kardialen Phänotyps der *Crtc1*^{-/-} Mäuse wurde die Kontraktilität, Ca²⁺-Handling und die Ca²⁺-Sensitivität von Kardiomyozyten gemessen; sie zeigten keine Veränderungen im Vergleich mit ihren Wildtypgeschwistertieren. Anders als in vorherigen Arbeiten wurde in den Herzen der *Crtc1*^{-/-} Mäuse eine erhöhte *Crtc2* und *Crtc3* mRNA Expression gemessen. Konsistent mit vorherigen Ergebnissen wurden auch in dieser Arbeit wenige Effekte direkt auf der Ebene der Kardiomyozyten beobachtet. Zusammengefasst können die Ergebnisse dieser Arbeit die Hypothese, dass CRT1 an der Regulation kardialen Stoffwechsels auf zellulärer Ebene beteiligt sei, nicht bestätigen. CRT1 könnte jedoch als ein zentraler Regulator des Metabolismus und des Sympathikotonus agieren.

Abstract

Cardiovascular diseases, often accompanied by cardiac hypertrophy, are the most frequent causes of death in Germany. A distinction is made between physiological and pathological hypertrophy, whereby pathological hypertrophy can lead to heart failure. Together with cardiac hypertrophy, changes in cardiac metabolism occur, although it is not conclusively understood whether these modifications are a consequence of cardiac remodeling or contribute to the pathogenesis. Mice lacking the CREB-regulated transcription coactivator CRT1 (*Crtc1*^{-/-}) spontaneously develop mild hypertrophy and cardiac dysfunction. Since RNA-Seq and proteomics analyses in *Crtc1*^{-/-} mice showed alterations in the expression of mRNA and proteins involved in metabolic processes, genes for key enzymes of cardiac metabolism and mitochondrial physiology of *Crtc1*^{-/-} mice were investigated in this work. Heart tissue from *Mybpc3* knock-in (*Mybpc3*^{ki}) mice, an established mouse model for hypertrophic cardiomyopathy (HCM), was used as a comparison. In contrast to *Crtc1*^{-/-} mice, increased CRT1 mRNA and protein levels were detected in heart tissue from *Mybpc3*^{ki} mice.

In *Crtc1*^{-/-} mice, mRNA levels were measured in 5-6, 10-13, 25-30 and 45-52 week old mice and compared to their wild-type littermates, to investigate whether there is an age-dependent change in the expression pattern of genes encoding key enzymes of cardiac metabolism and mitochondrial physiology in *Crtc1*^{-/-} mice. The mRNA expression of genes related to metabolism and mitochondria was largely unchanged in hearts from *Crtc1*^{-/-} mice compared to their wild-type littermates. The mRNA expression of genes essential for mitochondrial biogenesis, such as *Ppargc1a*, *mt-Nd1* and *Dnm1l*, was decreased in hearts of *Mybpc3*^{ki} mice. No altered mRNA or protein expression of PGC-1 α was detected in *Crtc1*^{-/-} mice, although CRT1 was recruited to the murine PGC-1 α promoter in heart tissue. Mitochondrial transcription factor A (TFAM) is induced by PGC-1 α and cardiac *Tfam* mRNA expression was increased in *Crtc1*^{-/-} mice. Oxygen consumption of cardiac mitochondria measured by a Clark elec-

trode was unchanged in *Crtc1*^{-/-} mice compared to their wild-type littermates. Electron micrographs of the left ventricles of *Crtc1*^{-/-} mice showed no morphological changes in mitochondria. Similarly, mitochondrial function as measured by Ca²⁺ retention capacity, membrane potential and redox status was unchanged.

In a second part of the project, reduced *Crtc* mRNA expression was measured in carotid arteries after vascular injury. Studies on the regulation of the sphingosine-1-phosphate (S1P) system showed unchanged mRNA expression of S1P receptors in both the hearts and thoracic aortas of *Crtc1*^{-/-} mice compared to their wild-type littermates. In a promoter luciferase reporter gene assay, treatment with Ca²⁺ activated the human S1P receptor 3 promoter (S1PR3), but neither CREB nor CRTC1 were recruited to the promoters of S1PR3 or sphingosine kinase 1 (SPHK1) in murine cardiac tissue.

To characterise the cardiac phenotype of the *Crtc1*^{-/-} mice, cardiomyocyte contractility, Ca²⁺ handling and Ca²⁺ sensitivity were measured; they showed no changes compared to their wild-type littermates. Unlike previous work, increased *Crtc2* and *Crtc3* mRNA expression was measured in the hearts of *Crtc1*^{-/-} mice. Consistent with previous results, few effects were observed directly at the cardiomyocyte level. Taken together, the results of this work do not confirm the hypothesis that CRTC1 is involved in the regulation of cardiac metabolism at the cellular level. However, CRTC1 may act as a central regulator of metabolism and sympathetic tone.

1. Einleitung

1.1. Kardiale Hypertrophie und Herzinsuffizienz

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind die häufigsten Todesursachen in Deutschland [2]. In 2019 war die Herzinsuffizienz Auslöser für 11 % der Sterbefälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen [173]. Die Herzinsuffizienz ist ein komplexes klinisches Syndrom, welches durch Funktionsstörungen im Herz-Kreislaufsystem bedingt und durch hämodynamische, renale und neurohormonale Kompensationsmechanismen gekennzeichnet ist [184].

Um eine erhöhte kardiale Arbeitslast auszugleichen, reagieren Kardiomyozyten mit Wachstum, um die kardiale Pumpfunktion zu erhöhen und die Wandspannung zu verringern. Kardiomyozyten sind im erwachsenen Herzen terminal differenziert, daher kommt es nicht zu einer Zunahme der Kardiomyozytenzahl, sondern einzelne Kardiomyozyten nehmen an Größe zu. Ein adaptives Remodeling kann zum Beispiel bei Leistungssportler:innen und Schwangeren auftreten. Diese physiologische Hypertrophie des Herzmuskels sorgt für eine Leistungssteigerung und deckt den erhöhten Sauerstoffbedarf des Körpers. In der Regel ist diese adaptive Hypertrophie reversibel und durch eine normale kardiale Funktion und Angiogenese gekennzeichnet [38].

Auch Erkrankungen wie arterielle Hypertonie, Aortenstenose, genetische Mutationen oder diabetische Kardiomyopathien können eine erhöhte Arbeitsbelastung des Herzens zur Folge haben. Damit einhergehende neurohumorale Signale, zum Beispiel ein Anstieg von Noradrenalin und Angiotensin, sorgen für ein maladaptives Remodeling. Auf Dauer kann

das zu einer linksventrikulären Hypertrophie (LVH), zum Verlust von Kardiomyozyten, einer ventrikulären Dilatation, einer Abnahme der kontraktilen Funktion und schließlich zur Herzinsuffizienz führen [66] [69] [159] (Abbildung 1.1). Unterschieden wird eine Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF) und Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion (HFrEF) [21].

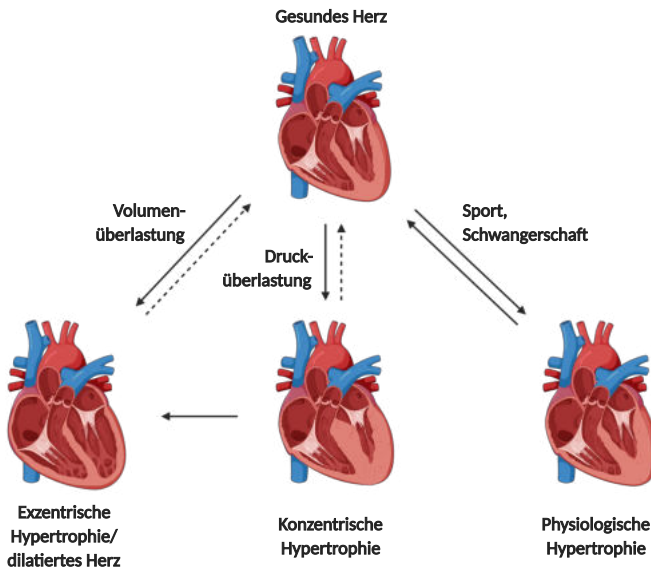


Abbildung 1.1.: Morphologische Veränderungen bei kardialer Hypertrophie.

Bei physiologischer Hypertrophie durch Sport oder Schwangerschaft sind Kardiomyozyten vergrößert, ohne Entwicklung einer Fibrose. Die Herzfunktion ist normal oder verbessert. Die konzentrische Hypertrophie ist insbesondere mit einer Zunahme der linksventrikulären Wanddicke, Fibrose und beginnender kardialer Dysfunktion verbunden. Sie ist nur teilweise reversibel und kann sich zu einer exzentrischen Hypertrophie entwickeln. Die exzentrische Hypertrophie ist mit vergrößerten Ventrikelhöhlräumen bei relativ dünnen Wänden, ausgedehnter Fibrose, Myozytenabsterben und kardialer Dysfunktion verbunden. Abbildung adaptiert von Chung und Leinwand [38] und erstellt mit BioRender [4].

Obwohl die physiologische Hypertrophie sich ebenso wie eine pathologische Hypertrophie zunächst als kompensatorische Reaktion auf kardialen Stress entwickelt, unterscheiden sie sich stark in den zugrunde lie-

genden molekularen Mechanismen, dem kardialen Phänotyp und der Prognose. Eine pathologische Hypertrophie geht einher mit Fibrose, Apoptose oder kardialer Dysfunktion. Zudem werden wieder Gene induziert, die normalerweise während der Embryogenese exprimiert werden. Dazu gehören das atriale natriuretische Peptid (ANP), *Brain* natriuretisches Peptid (BNP), β -Myosin schwere Kette (β -MHC) und skelettales α -Aktin. Diese Geninduktion wird als Reaktivierung des fetalen kardialen Genprogramms bezeichnet [63] [100]. Außerdem scheinen auch Gene, die für Calcium (Ca^{2+})-sensitive Proteine kodieren, bei maladaptiver kardialer Hypertrophie verändert zu sein [131].

Mutationen in Genen der Sarkomerproteine können eine hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) auslösen, die häufigste genetisch bedingte Herzkrankung weltweit [51] [143] [183]. Dabei können verschiedene Mutationen zu einem ähnlichen Phänotyp führen. Die Mehrheit der HCM-auslösenden Mutationen betreffen das Gen für das Myosin-bindende Protein C3 (MYBPC3) [28].

Die kardiale Hypertrophie wird von Veränderungen der Genexpression und Veränderungen im Stoffwechsel begleitet, allerdings wird jede Form der Hypertrophie durch unterschiedliche zelluläre Signalwege reguliert. Studien der letzten Jahre deuten vermehrt darauf hin, dass bisher unerkannte Mechanismen, einschließlich des zellulären Stoffwechsels, der Proliferation, nicht-kodierender RNAs, Immunreaktionen, Translationsregulation und epigenetischer Modifikationen, die kardiale Hypertrophie positiv oder negativ regulieren können [118] [131].

1.2. Elektromechanische Kopplung

Bei der elektromechanischen Kopplung, also dem Prozess der elektrischen Erregung der Myozyte bis hin zur Kontraktion, spielt Ca^{2+} eine entscheidende Rolle, sowohl für die elektrische Aktivität des Herzens, als auch für die kontraktionsauslösende Aktivierung der Myofilamente. Während des

Aktionspotentials öffnen spannungsabhängige Natrium (Na^+)-Kanäle, was zur schnellen Depolarisation der Zellmembran und damit zur Öffnung der spannungsabhängigen L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle (LTCC) führt. Der Ca^{2+} -Einstrom aktiviert lokal innerhalb einer zellulären Ca^{2+} -Mikrodomäne der T-Tubuli Ryanodinrezeptoren (RyR) in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) und führt dadurch zu einer Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung. Diese lokale Aktivitätssynchronisation kann bei Herzinsuffizienz durch eine Reorganisation der T-Tubuli verloren gehen [168]. Das ins Zytosol gelangte Ca^{2+} bindet an Troponin C (TnC) des Troponinkomplexes der dünnen Filamente, welches dann mit Troponin I (TnI) assoziiert. Daraufhin wird die Aktin-Bindestelle für Tropomyosin frei. Dadurch kann Myosin an Aktin binden und die Kontraktion unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP) auslösen. Bei der anschließenden Relaxation dissoziiert Ca^{2+} von TnC bei sinkender Ca^{2+} -Konzentration ab. Ca^{2+} wird hauptsächlich durch die *sarcoplasmic/endoplasmic reticulum* Ca^{2+} -ATPase (SERCA), den sarkolemmlen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) und die plasmalemmale Ca^{2+} -ATPase aus dem Zytosol entfernt (Abbildung 1.3.2 oben).

Insbesondere das sympathische Nervensystem reguliert die Herzfunktion. Dabei spielen vor allem die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin eine große Rolle, die am Herzen an α_1 -, β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren binden. Durch β -adrenerge Stimulation kommt es zur verstärkten und beschleunigten Kontraktion (positiv inotroper Effekt) sowie zu einer beschleunigten Relaxation (positiv lusitroper Effekt). Noradrenalin bindet an stimulierende G_{α_s} -gekoppelte β_1 -Adrenozeptoren, dem am häufigsten exprimierten β -Adrenozeptor-Subtyp im Herzen. Dadurch werden Adenylatcyclasen aktiviert, was eine gesteigerte Bildung von zyklischem AMP (cAMP) auslöst. cAMP aktiviert die Proteinkinase A (PKA), die verschiedene Proteine phosphoryliert (unter anderem LTCC, MYBPC3, Phospholamban (PLN), TnI) und dadurch zu dem positiv inotropen Effekt der Katecholamine durch eine Erhöhung der Ca^{2+} -Transienten-Amplitude führt.

In HCM und kardialer Hypertrophie kann dieses fein abgestimmte Zusammenspiel gestört sein, insbesondere durch eine verstärkte Ca^{2+} -Sensibilisierung der Aktinfilamente und dadurch einer Hyperkontraktibilität der

Filamente. Daraus folgt ein erhöhter ATP-Verbrauch, der wiederum andere ATP-abhängige Prozesse einschränkt, was unter anderem zu einem gestörten Ca^{2+} -Handling führt. Ca^{2+} hat aber nicht nur Einfluss auf die Kontraktilität der Kardiomyozyten, sondern wirkt auch auf die Energiehomöostase. Über den mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter (MCU) gelangt Ca^{2+} in den Matrixraum der Mitochondrien und induziert dort die Reaktionen des Citratzyklus. Gestörtes Ca^{2+} -Handling kann durch eine mitochondriale Ca^{2+} -Überladung vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) freisetzen und zur Apoptose und damit zur Pathogenese der Herzinsuffizienz beitragen [29].

1.3. Kardialer Stoffwechsel

Die kardiale Pumpleistung verbraucht so viel Energie, dass das Herz seinen gesamten ATP-Pool mehrere Male pro Minute neu synthetisieren muss. Im versagenden Herzen führt eine metabolische Dysfunktion der Kardiomyozyten zu einer Verringerung der Kapazität für die ATP-Synthese [110].

1.3.1. Mitochondrien und Energiebereitstellung

ATP wird in den Mitochondrien synthetisiert. In Kardiomyozyten nehmen Mitochondrien ein Zellvolumen von über 30 % ein. Mitochondrien sind zudem entscheidend für das Redox-Gleichgewicht und die Ionen-Homöostase der Zelle. Sie sind dynamische Organellen, die an benachbarte Strukturen gebunden sind, insbesondere über die Proteine Mitofusin (MFN) 1 und 2 an das SR. Mitochondrien unterliegen kontinuierlicher Spaltung und Vereinigung (*fission* und *fusion*) zur mitochondrialen Biogenese und Qualitätskontrolle. Beschädigte Mitochondrien werden durch Mitophagie eliminiert und recycelt. Störungen der mitochondrialen Funktion spielen eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie des myokardialen Remodelings und der Progression der Herzinsuffizienz [29]. Mitochondrien sind in der Lage zelltoxisches Ca^{2+} aus dem Zytosol abzufangen. Wenn es zu einer mitochondrialen Ca^{2+} -Überladung kommt, öffnet die *permeability transition*

permeability transition pore (PTP) und entlässt mitochondriale Proteine und reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die zur Apoptose beitragen.

ROS sind sowohl freie Sauerstoffradikale wie Superoxide ($\cdot\text{O}_2^-$) und Hydroxylradikale ($\cdot\text{OH}$) als auch potente Oxidantien wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) [46] [205]. In physiologischen Konzentrationen können ROS intrazelluläre Signalfunktionen übernehmen [43]. Allerdings können sie durch ihre hohe Reaktivität zahlreiche zelluläre Strukturen schädigen und Mutationen verursachen. Reduzierende Enzyme wie die Superoxiddismutase, Katalase und Glutathionperoxidase bauen ROS ab. Eine übermäßige ROS-Produktion wird als oxidativer Stress bezeichnet. Die Mehrzahl der ROS werden innerhalb der Mitochondrien produziert [15] [32] [114]. Die mitochondriale DNA (mtDNA) ist aufgrund ihrer Nähe zur Hauptproduktionsstätte der ROS sowie fehlendem schützendem Proteingerüst anfälliger für Mutationen als die chromosomale DNA im Zellkern. Der mitochondriale Transkriptionsfaktor A (TFAM) aktiviert die mitochondriale Transkription und Genomreplikation. Zentraler Regulator der mitochondrialen Biogenese ist der Transkriptionsfaktor Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma Koaktivator 1-alpha (PGC-1 α).

Das gesunde Herz kann seine Substratverwertung je nach Energiebedarf und Substratverfügbarkeit flexibel wechseln. Unter aeroben Bedingungen stammen 60-90 % des ATP, das durch oxidative Phosphorylierung erzeugt wird, aus der Fettsäureverwertung und β -Oxidation und der Rest aus dem Glucosestoffwechsel [29]. Eine Ausnahme ist das sich entwickelnde Herz, welches auf die Glycolyse zur Energiegewinnung angewiesen ist, da die β -Oxidation nur unter aeroben Bedingungen erfolgen kann. Mit der Geburt findet ein Wechsel von der Glycolyse zur oxidativen Phosphorylierung statt [56]. Im adulten gesunden Herzen wird unter Belastung der Anteil aus dem Glucosestoffwechsel erhöht. Obwohl der kardiale Stoffwechsel bei physiologischer und pathologischer Hypertrophie unterschiedlich reguliert wird, wird in beiden Fällen zunächst von Fettsäure- auf Kohlenhydratoxidation umgestellt [110] [131].

1.3.2. Glucose zur Energiegewinnung

Glucose ist Ausgangspunkt zahlreicher Stoffwechselwege, unter anderem werden Kohlenhydrate zu Glucose zerlegt und so zur Energiegewinnung nutzbar gemacht. Nahezu alle Zelltypen benötigen Transportsysteme um Glucose durch ihre Plasmamembranen zu transportieren. Die Glucoseaufnahme durch erleichterte Diffusion gelingt mithilfe von spezifischen Carriern die als Glucosetransporter dienen (GLUT). Verschiedene GLUT werden gewebs- oder zellspezifisch exprimiert und zum Teil durch externe Stimuli reguliert. Insbesondere werden Insulin-abhängige und Insulin-unabhängige Transporter unterschieden. Der Insulin-unabhängige GLUT1 ist am weitesten verbreitet und scheint die basale Glucoseversorgung zu gewährleisten. GLUT1 wird besonders in fetalen Zellen und in den Kapillaren des zentralen Nervensystems exprimiert. Außerdem erfolgt die Glucoseaufnahme in die β -Zellen des Pankreas über GLUT1. GLUT4 ist für die Insulin-abhängige Glucoseaufnahme verantwortlich und kommt ausschließlich in Adipozyten, Skelettmuskel- und Herzmuskelzellen vor.

Im Zytosol der Zellen wird Glucose während der Glycolyse zu Pyruvat abgebaut, dabei können pro Mol Glucose zwei Mol ATP gebildet werden. Unter anaeroben Bedingungen muss Pyruvat weiter zu Lactat umgewandelt werden, um das für die Glycolyse benötigte Nicotinamidadeninucleotid (NAD^+ , reduzierte Form ist NADH) zu erzeugen. Unter aeroben Bedingungen wird Pyruvat in die mitochondriale Matrix transloziert und dort über eine dehydrierende Decarboxylierung zu Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) umgesetzt. Diese Reaktion wird von einem fein regulierten Multienzymkomplex, dem Pyruvatdehydrogenase-Komplex (PDH-Komplex) katalysiert. Teil des PDH-Komplexes sind sowohl eine inhibierende Pyruvatdehydrogenase Kinase (PDK) als auch eine aktivierende Pyruvatdehydrogenase Phosphatase (PDP). Reguliert wird die PDH-Aktivität indirekt durch Adenosindiphosphat (ADP), Pyrophosphat und Pyruvat, welche die PDK hemmen und durch Magnesium (Mg^{2+}) und Ca^{2+} , welche die PDP aktivieren. Acetyl-CoA und NADH hemmen die aktive, dephosphorylierte PDH. Bei erhöhtem Energiebedarf kommt es zu einem Anstieg der Ca^{2+} -Konzen-

1. Einleitung

tration und führt über die Aktivierung der PDP zur Dephosphorylierung der PDH.

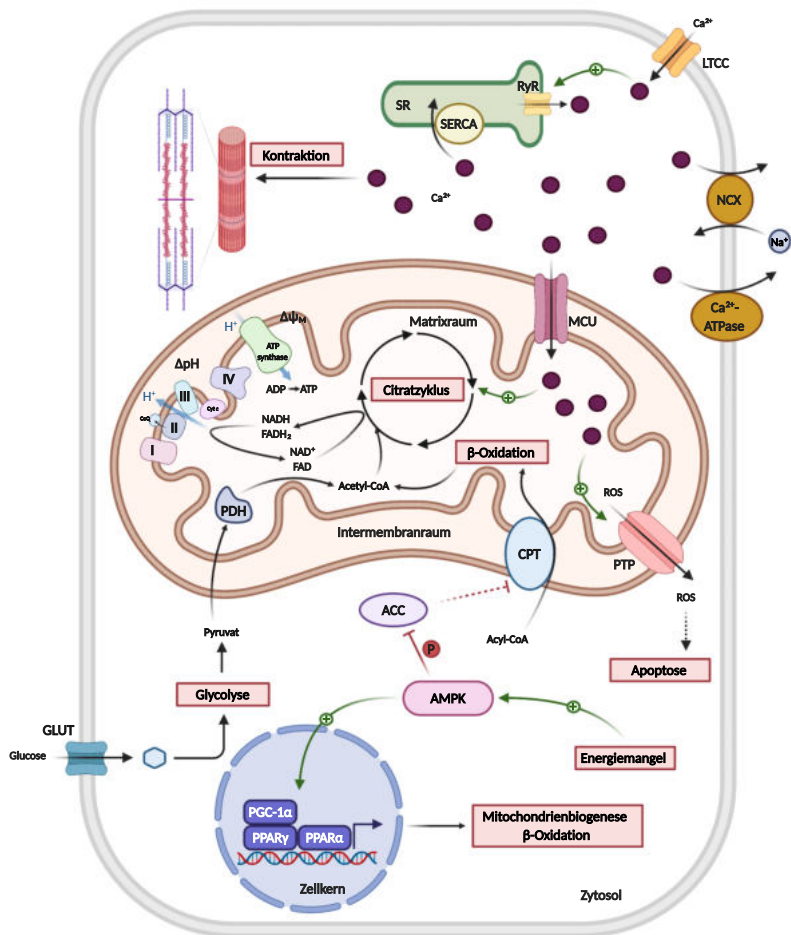


Abbildung 1.2.: Übersicht kardialer Stoffwechsel und elektromechanische Kopplung.

Der Calciumionen (Ca^{2+})-Einstrom durch spannungsabhängige L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle (LTCC) aktiviert lokal Ryanodinrezeptoren (RyR) in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) und führt zu einer Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung. Die steigende Ca^{2+} -Konzentration löst den Kontraktionsvorgang aus. Ca^{2+} wird hauptsächlich durch die *sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase* (SERCA), den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) und die Ca^{2+} -ATPase aus dem Zytosol entfernt. Auch Mitochondrien können Ca^{2+} aus dem Zytosol eliminieren. Über den mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter (MCU) gelangt Ca^{2+} in den Matrixraum der Mitochondrien. Bei einer mitochondrialen Ca^{2+} -Überladung öffnet die *permeability transition pore* (PTP) und entlässt vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS), was zur Apoptose beitragen kann. Im Matrixraum induziert Ca^{2+} die Reaktionen des Citratzyklus und fördert dadurch die Bildung der Reduktionsäquivalente Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FADH_2 , reduzierte Form). Diese geben an den Komplexen der Elektronentransportkette (I, CoQ, II, Cyt, IV) Elektronen und Protonen (H^+) ab und sorgen so für die Aufrechterhaltung des pH-Gradienten (ΔpH) und des Membranpotentials ($\Delta\Psi_M$). Durch den H^+ -Rückfluss über die F_1/F_0 -ATP-Synthase wird Adenosin-triphosphat (ATP) aus Adenosindiphosphat (ADP) synthetisiert. In den Citratzyklus wird Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) eingeschleust, welches sowohl aus dem Glucose- als auch aus dem Lipidabbau stammen kann. Glucose gelangt in die Zellen durch erleichterte Diffusion über Glucosetransporter (GLUT) und wird im Zytosol zu Pyruvat abgebaut. Pyruvat transloziert in die mitochondriale Matrix und wird dort von einem Multienzymkomplex, der Pyruvatdehydrogenase (PDH) zu Acetyl-CoA umgesetzt. Aus dem Lipidabbau stammendes Acyl-CoA wird über Carnitin-Palmitoyltransferasen (CPT) in den Matrixraum geschleust und wird über die β -Oxidation zu Acetyl-CoA abgebaut. Bei ausreichendem Energiespeicher wird die CPT durch die Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC)-Aktivität indirekt gehemmt. Bei Energiemangel wird die ACC durch die AMP-abhängige Proteinkinase (AMPK) phosphoryliert und damit deaktiviert. Die AMPK sorgt durch Phosphorylierung verschieder Transkriptionsfaktoren dafür, dass energieliefernde Vorgänge wie die β -Oxidation und die Mitochondrienbiogenese gesteigert werden. Abbildung erstellt mit BioRender [4].

1.3.3. Fettsäurestoffwechsel

Neben der Decarboxylierung von Pyruvat durch die PDH wird Acetyl-CoA für den weiteren Abbau im Citratzyklus auch über Fettsäureoxidation (β -Oxidation) im Matrixraum der Mitochondrien bereit gestellt. Fettsäuren müssen vor ihrem Abbau durch Kettenlängen-spezifische Acyl-CoA-Synthetasen zu Acyl-CoA aktiviert werden. Acyl-CoA-Moleküle mit Kettenlängen über 12 Kohlenstoffatomen müssen über das Carnitin-Acyltransferase-System (CAT) in den Matrixraum gelangen. Die Carnitin-Palmitoyltransferase 1 (CPT-1) ist in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert. Die CPT-1 katalysiert die Umesterung des Acyl-CoA mit L-Carnitin zu Acylcarnitin und CoA, da Acylcarnitin mithilfe von Porinen die äußere Mitochondrienmembran passieren kann. Dies ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der β -Oxidation der Fettsäuren. CPT-1 wird durch Malonyl-CoA, welches bei der Fettsäurebiosynthese gebildet wird, inhibiert. Schilddrüsenhormone induzieren die Expression von CPT-1 um den erhöhten Energiebedarf zu decken. Außerdem steigern langkettige Fettsäuren die CPT-

1-Expression durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor alpha (PPAR α). PPAR α induziert zusätzlich Enzyme der β -Oxidation [109]. Acylcarnitin wird durch die Carnitin-Acylcarnitin-Translokase (CACT) durch die innere Mitochondrienmembran transportiert. Dort regeneriert die Carnitin-Palmitoyltransferase 2 (CPT-2) das Acyl-CoA und Carnitin. Intramitochondrial werden die Fettsäuren in dem sich wiederholenden Prozess der β -Oxidation schrittweise zu Acetyl-CoA abgebaut. So können geradzahlige Fettsäuren vollständig zu Acetyl-CoA abgebaut und in den Citratzyklus eingeschleust werden.

Acetyl-CoA kann, wenn es nicht zur Energiegewinnung benötigt wird, auch zur Fettsäurebiosynthese genutzt werden. Die Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Fettsäurebiosynthese aus Acetyl-CoA. Langkettige Acyl-CoA hemmen die ACC, Glucose und Insulin induzieren sie. Außerdem kann die ACC durch die AMP-abhängige Proteinkinase (AMPK) und die cAMP-abhängige PKA phosphoryliert und damit deaktiviert werden. Beide Kinasen verhindern damit Fettsäuresynthese bei Energiemangel (AMPK bei steigendem AMP-Spiegel) beziehungsweise erhöhtem Energiebedarf (PKA bei Katecholamin-Signalen). Katecholamine sind zudem die wichtigsten Stimulatoren der Lipolyse. Bei gehemmter ACC wird weniger Malonyl-CoA gebildet, welches zu erhöhter CPT-1-Aktivität und dadurch zu einem gesteigerten Einstrom von Acyl-Carnitin in die mitochondriale Matrix und damit zu gesteigerter β -Oxidation der Fettsäuren führt.

1.3.4. Mitochondriale Atmung

Das Acetyl-CoA aus Fettsäureoxidation und PDH-abhängiger Decarboxylierung wird im Citratzyklus oxidativ zu CO₂ und H₂O abgebaut. Der Citratzyklus findet im Matrixraum der Mitochondrien statt und ist das Bindeglied von Substratabbau und Endoxidation. Der Citratzyklus, aber auch die β -Oxidation und in deutlich geringerem Ausmaß die Glycolyse, liefern die Reduktionsäquivalente Nicotinamadenindinukleotid und Flavin-Adenin-Dinukleotid (NADH/H⁺ und FADH₂). Die Reduktionsäqui-

valente werden durch die Atmungskette oxidiert und liefern dadurch den Wasserstoff, der später mit Sauerstoff reagiert. Um die dabei frei werdende Redoxenergie zur ATP-Synthese nutzen zu können, speichern Mitochondrien sie in Form eines elektrochemischen Protonengradienten über ihre innere Membran. Bei der schrittweisen Übertragung der Elektronen der Reduktionsäquivalente auf den Sauerstoff nutzen die Atmungskettenkomplexe die frei werdende Energie, um Protonen über die innere Mitochondrienmembran zu pumpen und so den Gradienten aufzubauen. Das entstehende Membranpotential ($\Delta\Psi$) ist eine Voraussetzung der oxidativen Phosphorylierung.

Die Komplexe der mitochondrialen Elektronentransportkette sind die NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase (auch NADH-Dehydrogenase, Komplex I), die Succinat:Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex II), die Ubihydrochinon:Cytochrom-c-Oxidoreduktase (Komplex III) und die Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV). Sie sind in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und tragen vermutlich zur Formung der Cristae bei. Die Elektronenübertragung zwischen den Komplexen wird durch zwei mobile Substrate, das Cytochrom c und das Ubichinon gewährleistet. Teilweise in der inneren Membran liegt die F_1/F_0 -ATP-Synthase (manchmal als Komplex V bezeichnet). Der F_1 -Teil ragt in die Matrix während der F_0 -Teil in der Membran liegt. Dieser Teil enthält ein Protein welches Oligomycin binden kann, einen Hemmstoff der F_1/F_0 -ATP-Synthase. Die F_1/F_0 -ATP-Synthase nutzt den Protonengradienten zur ATP-Synthese aus ADP und Phosphat, der oxidativen Phosphorylierung (Abbildung 1.3.2).

Mitochondrien oxidieren nur dann Substrate, wenn ADP und Phosphat zur Verfügung stehen. Diese Kopplung von Substratoxidation und ATP-Synthese wird als Atmungskontrolle bezeichnet und verbindet die Elektronentransportkette mit dem Citratzyklus. Der Sauerstoffverbrauch von Mitochondrien bei Substratverfügbarkeit (Stufe 2; in Stufe 1 ist lediglich Sauerstoff verfügbar) ist relativ gering und kann durch Zugabe von ADP (Stufe 3, *Pull*-Aktivierung) erhöht werden. Entkoppler der Atmungskette wie das körpereigene Thermogenin oder das künstliche FCCP (Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon) ermöglichen

einen passiven Rückstrom von Protonen und heben so den Gradienten auf. Da die Komplexe der Atmungskette weiterhin Elektronen transportieren, ist die Substratoxidation und damit der Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien im entkoppelten Zustand maximal. Wird die ATP-Synthese durch Oligomycin gehemmt, verbrauchen intakte Mitochondrien keinen Sauerstoff.

Bei Energiemangel und steigender AMP-Konzentration wird die AMPK aktiviert. Die AMPK sorgt durch Phosphorylierung verschiedener Enzyme und Transkriptionsfaktoren dafür, dass energieverbrauchende Synthesevorgänge wie Glycogenbiosynthese, Fettsäurebiosynthese, Cholesterinbiosynthese und Proteinbiosynthese abgeschaltet und dafür energieliefernde Vorgänge wie Glycolyse und β -Oxidation der Fettsäuren gesteigert werden. Ist ausreichend ATP und NADH vorhanden, wird der Citratzyklus gehemmt. ADP kann den Citratzyklus aktivieren, wird im Zytoplasma allerdings kurzzeitig durch das Phosphokreatin-Kreatin-System abgefangen und zur Auffüllung der ATP-Speicher genutzt. Herzinsuffizienz ist mit geringeren Phosphokreatin-Speichern verbunden [56]. Externe Stimuli zur Steigerung der ATP-Synthese erhöhen die mitochondriale Ca^{2+} -Konzentration, welche neben der PDH auch Enzyme des Citratzyklus und Atmungskettenkomplexe aktiviert. Ca^{2+} ist damit ein zentraler Regulator sowohl der elektromechanischen Kopplung der Muskelkontraktion, als auch der mitochondrialen ATP-Produktion.

1.4. S1P-System

Sphingosin-1-Phosphat (S1P) ist ein bioaktiver Lipidmediator mit parakrinen und autokrinen Effekten auf die kardiovaskuläre Funktion [77]. S1P gehört zu den Sphingolipiden, die 10–20 % der Membranlipide ausmachen und bei denen das Glycerin der Phosphoglyceride durch den Aminodialkohol Sphingosin ersetzt ist. Die De-novo-Synthese von S1P wird im endoplasmatischen Retikulum initiiert. Ceramid wird durch eine Ceramidase zu Sphingosin deacyliert, das wiederum durch die Sphingosin-Kinase (SPHK) Isoform 1 oder 2 zu S1P phosphoryliert wird [77] [82] [138]. Die humane SPHK1 und SPHK2 weisen eine 80 %ige Homologie auf und werden ubiquitär exprimiert [77]. SPHKs regulieren das Zellschicksal indem sie das Gleichgewicht von pro-apoptotischem Ceramid und Sphingosin und anti-apoptotischem S1P kontrollieren. Dieses Gleichgewicht wird als „Sphingolipid-Rheostat“ bezeichnet [133]. Ein gestörter Fettsäurestoffwechsel in der Pathogenese der Herzinsuffizienz kann zur Akkumulation schädlicher Lipidprodukte wie Ceramid führen und ist mit Kardioliptotoxizität assoziiert [59]. Dabei fördert die SPHK1-Aktivität allgemein die Zellproliferation und das Zellüberleben [142]. Im Gegensatz dazu kann die SPHK2 im Zellkern die DNA-Synthese hemmen [71] und unter Stressbedingungen die Induktion der Apoptose über eine Ca^{2+} -Aufnahme in Mitochondrien fördern [117] (Abbildung 1.3).

Die Stimulation der SPHKs führt zu einer erhöhten S1P-Produktion und der anschließenden Wirkung als intrazelluläres Signalmolekül oder der Freisetzung ins Blut. Intrazellulär kommt es zu einer G-Protein- und Inositoltrisphosphat-unabhängigen Ca^{2+} -Freisetzung [54] [55] [122]. Mehr als 50 % des extrazellulären S1P wird durch *High Density* Lipoproteine (HDL) transportiert. Etwa 30-40 % werden an Albumin gebunden und weniger als 10 % werden von Lipoproteinen niedriger Dichte (LDL) und Lipoproteinen sehr niedriger Dichte (VLDL) transportiert [82] [97]. Die kardioprotektive Wirkung von HDL könnte auf dessen S1P-Gehalt zurückzuführen sein [82]. Die Konzentration von S1P im Plasma liegt zwischen 0,1 und 1,2 μM und korreliert bei Patienten mit Herzinsuffizienz negativ

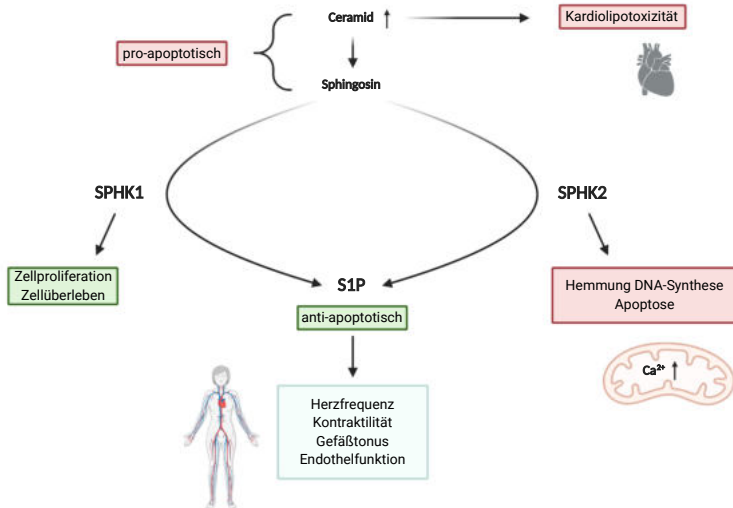


Abbildung 1.3.: Sphingolipid-Rheostat.

Als „Sphingolipid-Rheostat“ wird das Gleichgewicht von pro-apoptotischem Ceramid und Sphingosin und anti-apoptotischem Sphingosin-1-Phosphat (S1P) bezeichnet. Sphingosin wird durch Deacylierung aus Ceramid gebildet. Eine Akkumulation schädlicher Lipidprodukte wie Ceramid ist mit Kardiopotoxizität assoziiert. S1P entsteht durch Phosphorylierung von Sphingosin durch die Sphingosin-Kinasen 1 und 2 (SPHK1 und SPHK2). Die Aktivität der SPHK1 fördert die Zellproliferation und das Zellüberleben, die SPHK2 kann zur Apoptose beitragen indem sie die DNA-Synthese im Zellkern hemmt und unter Stressbedingungen die Induktion der Apoptose über eine Ca²⁺-Aufnahme in Mitochondrien fördert. S1P hat im kardiovaskulären System Einfluss auf die Herzfrequenz, die kardiale Kontraktilität, den vaskulären Tonus und die endotheliale Funktion. Abbildung erstellt mit BioRender [4].

mit dem Schweregrad der Herzinsuffizienz. Patienten der NYHA-Klassen III und IV haben niedrigere Plasma-S1P-Spiegel als Patienten der NYHA-Klassen I und II [138].

Extrazelluläres S1P vermittelt Signale über G-Protein-gekoppelte S1P-Rezeptoren (S1PR) [138]. Die molekulare Wirkung ist dabei von der unterschiedlichen Expression der Rezeptor-Isoformen 1-5 in verschiedenen Geweben abhängig [77]. Die S1PR 1, 2 und 3 werden vorwiegend in kardiovaskulären Geweben exprimiert, während S1PR4 für das lymphatische System und S1PR5 für das Immun- und Nervensystem charakteristisch ist [26]. Obwohl Kardiomyozyten, kardiale Fibroblasten, Endothelzellen

und glatte Gefäßmuskelzellen alle S1PR 1, 2 und 3 exprimieren, zeigen sie unterschiedliche Muster der S1PR-Expression. S1PR1 ist der vorherrschende Rezeptortyp der Kardiomyozyten, in kardialen Fibroblasten wird S1PR3 stark exprimiert. In Endothelzellen ist S1P-Signalisierung hauptsächlich S1PR1- und S1PR3-vermittelt, in glatten Gefäßmuskelzellen besonders durch S1PR2 und S1PR3 [158].

Durch die unterschiedliche Rezeptor-Ausstattung verschiedener Gewebe hat S1P pleiotrope Funktionen und reguliert viele zelluläre Prozesse wie Zellwachstum, Proliferation, Migration und Apoptose [77]. Defekte S1P-Signalübertragung kann aufgrund einer gestörten Vaskulo- oder Kardiogenese zu embryonaler Letalität führen. S1P reguliert im kardiovaskulären System den vaskulären Tonus, die endotheliale Funktion und Integrität und die Feinabstimmung der kardialen Kontraktilität und Herzfrequenz durch den S1PR-Signalweg [138], aber auch chronische Prozesse wie Hypertrophieentwicklung. Ein Ungleichgewicht der S1P-Produktion und -Signalübertragung scheint mit der Pathogenese diverser kardiovaskulärer Erkrankungen wie arterieller Hypertonie, Atherosklerose, endothelialer Dysfunktion, hypertrophen und fibrotischen Herzerkrankungen und Herzinsuffizienz verknüpft zu sein [77] [138].

1.5. *Crtc1*-defiziente Mäuse

Die β -adrenerge Signalübertragung führt zu einem intrazellulärem cAMP- und Ca^{2+} -Anstieg in Kardiomyozyten. Der Transkriptionsfaktor *cAMP-response element binding protein* (CREB) wird durch beide *second messenger* aktiviert und bindet nach Dimerisierung über seine Leuzin-Zipper-Domäne an seine DNA-Bindungsstelle, das *cAMP-Response-Element* (CRE). Die hoch konservierte und in vielen Genpromotoren vorkommende palindromische CRE-Sequenz (5'-TGACGTCA-3') und CRE-Teilsequenzen (5'-TGACG-3' oder 5'-CGTCA-3') werden von CREB erkannt [39]. Die Phosphorylierung von CREB durch PKA oder Ca^{2+} -abhängig durch die Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase IV (CaMK IV) sorgt für die Re-

krutierung des Co-Aktivators CREB bindendes Protein (CBP) an CREB. Ein weiterer Co-Aktivatoren von CREB, der unabhängig von der Phosphorylierung an CREB bindet, ist der CREB-regulierte Transkriptions-Coaktivator (CRTC) [6] [160]. Unter unstimulierten Bedingungen liegt CRTC phosphoryliert im Zytosol vor. Die Salz-induzierbare Kinase (SIK) kann CRTC phosphorylieren und dadurch die Assoziation mit 14-3-3-Proteinen induzieren. CRTC wird so im Zytosol sequestriert [160]. Hinweise deuten auf eine Phosphorylierung und dadurch Inaktivierung der SIK durch die PKA in Folge von β -adrenergen Stimuli hin [79] [81]. CRTC kann durch die Calcium/Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin dephosphoryliert werden. Dadurch wird die Bindung an 14-3-3-Proteine aufgehoben und CRTC transloziert in den Zellkern [18]. Dort interagiert CRTC mit dem dimerisierten Leuzin-Zipper von CREB und bildet ein Homotetramer [39] (Abbildung 1.4). CRTC kann im Zellkern durch die SIK phosphoryliert werden und transloziert ins Zytoplasma [42].

CRTC1 ist eine der drei Isoformen der evolutionär hoch konservierten CRTC [72], die in verschiedenen Geweben unterschiedlich exprimiert werden. CRTC1 wird am stärksten im Gehirn exprimiert und steht im Zusammenhang mit dem Langzeitgedächtnis, dem Energiehaushalt, der neuronalen Funktion und mit Stimmungsstörungen [6] [95]. Global *Crtc1*-defiziente (*Crtc1*^{-/-}) Mäuse entwickeln einen depressionsähnlichen Phänotyp [23].

Die mRNA aller *Crtc*-Isoformen wird in geringen Mengen im Herzen und *Crtc1* in Kardiomyozyten exprimiert [39]. In der Arbeitsgruppe von Prof. Elke Oetjen (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Deutschland) wurde die Regulation von CRTC1 in Kardiomyozyten und sein Einfluss auf die Herzfunktion und kardiale Hypertrophie untersucht [127]. Isoprenalin induziert in Kardiomyozyten die Dephosphorylierung und damit Aktivierung von CRTC1, die durch Propranolol unterbunden werden kann. *Crtc1*^{-/-} Mäuse zeigen eine linksventrikuläre Dysfunktion, kardiale Hypertrophie und vergrößerte Kardiomyozyten. Die Isoprenalin-induzierte Kontraktilität isolierter Trabekel und die Phosphorylierung von TnI, MYBPC3, PLN und RyR sind unverändert [127]. Die mRNA- und Proteinmenge des

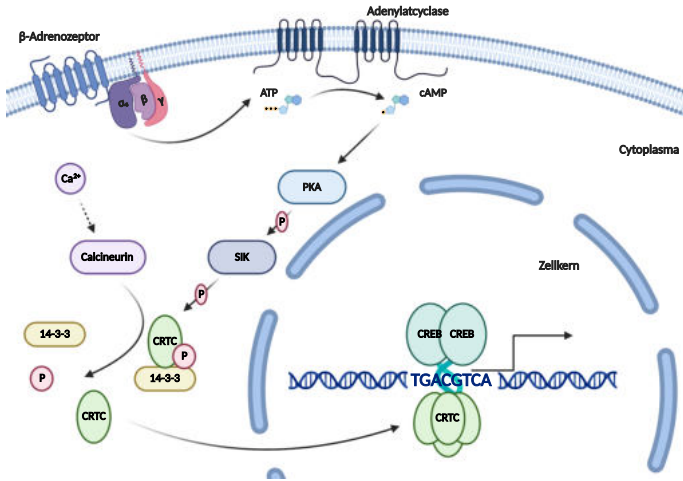


Abbildung 1.4.: Regulation von CRTC.

Unter unstimulierten Bedingungen wird CRTC durch die Salz-induzierbare Kinase (SIK) phosphoryliert und assoziiert anschließend mit 14-3-3-Proteinen (14-3-3). Dadurch wird CRTC im Zytoplasma sequestriert. Bei β -adrenerger Stimulation wird zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) aus Adenosintriphosphat (ATP) gebildet, katalysiert durch die Adenylatzyklase. cAMP aktiviert die Proteinkinase A (PKA), die ihrerseits die SIK durch Phosphorylierung hemmt. CRTC kann durch die Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin dephosphoryliert werden. Dephosphoryliertes CRTC transloziert in den Zellkern, wo es an den dimerisierten Leuzin-Zipper des DNA-gebundenen *cAMP-response element binding protein* (CREB) bindet und die Gentranskription koaktiviert. Abbildung nach Morhenn [126], erstellt mit BioRender [4].

regulator of G-protein signaling 2 (RGS2) sind in Herzen von *Crtc1*^{-/-} Mäusen vermindert. Die verminderte RGS2 Expression könnte zu der erhöhten Phosphorylierung der *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) bei den *Crtc1*^{-/-} Mäusen und damit zur Entwicklung der Hypertrophie beitragen [127]. Die CRTC1 Expression ist im Herzgewebe von Patienten mit Aortenstenose oder HCM erhöht, ebenso wie in Mausmodellen dieser Krankheiten, unter anderen bei *Mybpc3* Knock-in (*Mybpc3*^{ki}) Mäusen. Diese Erkenntnisse zeigen eine wichtige Rolle von CRTC1 bei der Regulierung der Herzfunktion und des Kardiomyozytenwachstums [127].

1.6. Zielsetzung

In humanem und murinem Herzgewebe wurde ein erhöhter CRTC1-Proteingehalt bei erworbener und vererbter Hypertrophie festgestellt [127]. Mäuse mit einem globalen *Crtc1*-Defizit entwickeln jedoch ohne Stimulus eine kardiale Hypertrophie und eine kardiale Dysfunktion. Im Herzgewebe dieser Mäuse wird das anti-hypertrophe Protein RGS2 vermindert exprimiert und die *Rgs2* Gentranskription ist CRTC1-abhängig. Das Fehlen der RGS2-abhängigen Inhibition des GPCR-Signalling könnte der Grund für die Entwicklung der Hypertrophie sein. Die gesteigerte Expression von CRTC1 bei maladaptiver Hypertrophie könnte so einen kompensatorischen Mechanismus zur Verzögerung der Pathogenese darstellen, indem es die *Rgs2*-Gentranskription erhöht.

Parallel zur Entwicklung einer Hypertrophie werden Veränderungen im systemischen und kardialen Stoffwechsel beobachtet. Dies geht einher mit einer Änderung des Expressionsmusters verschiedener für den Stoffwechsel relevanter Gene, zum Teil zurück zu einem fetalen Expressionsmuster [175] und einem Wechsel von der Nutzung aerober Stoffwechselwege zur verstärkten Nutzung anaerober Stoffwechselwege [148]. Mitochondrien als Orte der Energiegewinnung beeinflussen die Hypertrophieentwicklung nicht nur durch die Stoffwechselanpassungen, sondern können durch eine gestörte Funktion selbst zur Pathogenese beitragen [202]. In murinen Muskelzellen erhöht eine Überexpression von CRTC Proteinen die basale Zellatmung und die Transkription von PGC-1 α , dem zentralen Regulator der Mitochondrienbiogenese [192]. RNA-Seq- und Proteomics-Analysen in *Crtc1*^{-/-} Mäusen zeigten Veränderungen der Expression von an Stoffwechselprozessen beteiligten mRNA und Proteinen, wie die regulatorische Untereinheit der Pyruvatdehydrogenase Phosphatase, Hexokinase 3 und Monocarboxylat-Transporter 1 [126].

Um die Rolle von CRTC1 für die Pathogenese einer kardialen Hypertrophie zu analysieren, wurden im Herzgewebe von *Crtc1*^{-/-} Mäusen die Expression von Genen für Schlüsselenzyme des kardialen Stoffwechsels, die mitochondriale Funktion sowie der kardiomyozytäre Phänotyp untersucht.

Außerdem wurde der Einfluss von CRTC1 auf die Regulation des S1P-Systems, welches unter anderem essenziell für die Revaskularisierung nach Gefäßverletzungen ist, in Herzen, Gefäßen und an Promotor-Modellen untersucht.

2. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die Regulation des kardialen Stoffwechsels und die Funktion der Mitochondrien in Herzen von global *Crtc1*-defizienten (*Crtc1*^{-/-}) Mäusen untersucht. *Crtc1*^{-/-} Mäuse entwickeln eine kardiale Hypertrophie [127]. Zum Teil wurden Ergebnisse verglichen mit den Daten von *Mybpc3* Knock-in (*Mybpc3*^{ki}) Mäusen, die eine hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) entwickeln [186] und im Kontrast zu den global defizienten *Crtc1*^{-/-} Mäusen eine erhöhte CRT1C1 Menge in ihren Herzen aufweisen [127]. Falls nicht anders angegeben wurden alle Mäuse im Alter von 5 bis 6 Wochen untersucht und mit ihren Wildtypgeschwistertieren verglichen.

2.1. Kardialer Stoffwechsel

Ein Merkmal des maladaptiven hypertrophen Herzens scheint ein Energieungleichgewicht zu sein [162], während eine physiologische Herzfunktion mit einem ausgeglichenen Phosphokreatin zu Adenosintriphosphat (ATP) Verhältnis verbunden ist [94]. In verschiedenen Modellen von Herzinsuffizienz wird eine verstärkte Nutzung anaerober Stoffwechselwege mit Glucose als hauptsächlicher Energielieferant beobachtet [148]. Dies geht einher mit einer Änderung des Expressionsmusters verschiedener für den Stoffwechsel relevanter Gene, zum Teil zurück zu einem fetalen Expressionsmuster [175]. Zur Beschreibung des kardialen Metabolismus wurde die mRNA Expression verschiedener an Stoffwechselprozessen beteiligter Gene per RT-qPCR gemessen und die Proteinmengen einiger beteiligter Proteine mittels Immunoblot. *Crtc1*^{-/-} Mäuse wurden mit

Mybpc3^{ki} Mäusen im Alter von 5 bis 6 Wochen verglichen. *Crtc1^{-/-}* Mäuse wurden außerdem im Alter von 10 bis 13, 25 bis 30 und 45 bis 52 Wochen untersucht, um Unterschiede des Genstatus abhängig vom Alter detektieren zu können.

2.1.1. Energiebilanz

Für eine allgemeine Abschätzung des Energiestatus der Kardiomyozyten wurde die mRNA Expression von Genen zweier Enzyme untersucht, die eine konstante ATP-Bereitstellung ermöglichen und die ATP-Synthese bei steigendem Bedarf indirekt erhöhen können:

AMPK AMP-aktivierte Proteinkinase, nicht-katalytische Untereinheit gamma2, kodiert durch *Prkag2*.

AMPK ist der „Energiesensor“ der Zelle, der durch AMP aktiviert und durch ATP gehemmt wird. AMPK phosphoryliert verschiedene Enzyme (u.a. die Acetyl-CoA-Carboxylase) und Transkriptionsfaktoren und hemmt dadurch insgesamt energieverbrauchende zugunsten von energieliefernden Vorgängen.

AGAT L-Arginin:Glycin-Amidino-transferase, kodiert durch *Gatm*.

AGAT ist ein mitochondriales Enzym welches den ersten Schritt der Kreatinsynthese katalysiert. Kreatin in Form von Phosphokreatin dient der Überbrückung des ATP Verbrauchs in den ersten Sekunden einer Muskelkontraktion.

Zwischen den Mäusen wurden keine Unterschiede in der mRNA Expression der untersuchten Gene gemessen (Abbildung 2.1).

Die Menge der phosphorylierten Acetyl-CoA-Carboxylase (pACC) wurde mit Hilfe eines Antikörpers gegen die phosphorylierte ACC gemessen. Dies diente zur Abschätzung der AMPK-Aktivität, da die ACC bei ATP Mangel durch die AMPK phosphoryliert und dadurch gehemmt wird. Die ACC Proteinmenge gesamt oder phosphoryliert ist nicht unterschiedlich in *Crtc1^{-/-}* und in *Mybpc3^{ki}* Mäusen im Vergleich zum Wildtyp. Weder in *Crtc1^{-/-}* noch

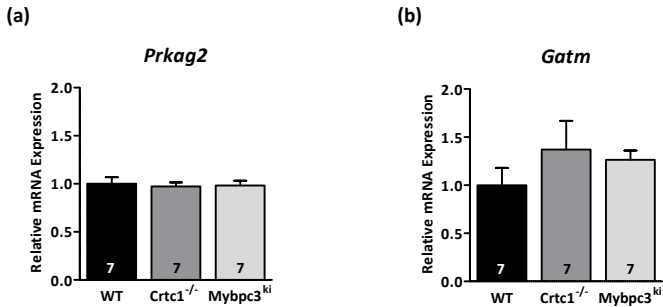


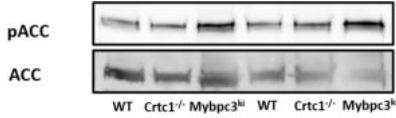
Abbildung 2.1.: mRNA Expression von die Energiebilanz betreffenden Genen in den Herzen von *Crtc1*^{-/-} und *Mybpc3*^{ki} Mäusen.

Quantitative (a) *Prkg2* und (b) *Gatm* mRNA Expression bezogen auf *Gnas* im Herzgewebe von *Crtc1*^{-/-} und *Mybpc3*^{ki} Mäusen verglichen mit Wildtypmäusen (WT) wurde mittels RT-qPCR gemessen und mit der $\Delta\Delta Ct$ -Methode berechnet. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; die Anzahl der Mäuse ist in den Balken angegeben.

in *Mybpc3*^{ki} Mäusen wurde eine Veränderung der Phosphorylierung gemessen (Abbildung 2.2).

Bei der Überprüfung altersabhängiger Unterschiede wurde sowohl in den Herzen der Wildtypmäuse als auch der *Crtc1*^{-/-} Mäuse im Alter von 10 bis 13 Wochen eine erhöhte *Prkg2* mRNA Expression verglichen mit 5 bis 6 Wochen alten Tieren des gleichen Genotyps gemessen. Ab einem Alter von 25-30 Wochen war diese Erhöhung nicht mehr detektierbar (Abbildung 2.3).

(a)



(b)

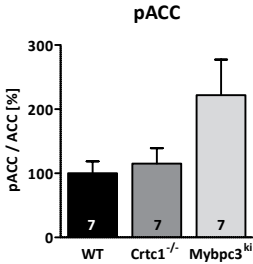


Abbildung 2.2.: pACC Proteinmenge in den Herzen von *Crtc1*^{-/-} und *Mybpc3*^{ki} Mäusen.

pACC Proteinmenge wurde mit einem Antikörper gegen pACC im Immunoblot von Proben der Proteinlysate aus den Herzen von *Crtc1*^{-/-}, *Mybpc3*^{ki} und Wildtypmäusen (WT) untersucht. Die totale ACC Menge entsprechend mit einem Antikörper gegen gesamte ACC. (a) Repräsentativer Immunoblot. (b) Quantitative Auswertung bezogen auf die totale ACC Menge. Dargestellt als Mittelwert±SEM; die Anzahl der Mäuse ist in den Balken angegeben.

Prkag2

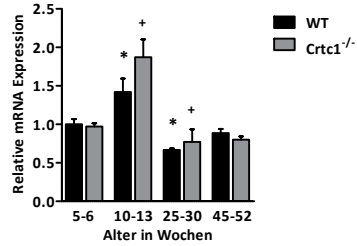


Abbildung 2.3.: *Prkag2* mRNA Expression in den Herzen von *Crtc1*^{-/-} und Wildtypmäusen verschiedenen Alters.

Quantitative *Prkag2* mRNA Expression bezogen auf *Gnas* im Herzgewebe von *Crtc1*^{-/-} Mäusen verglichen mit ihren Wildtypgeschwistertieren (WT) wurde mittels RT-qPCR gemessen und mit der $\Delta\Delta Ct$ -Methode berechnet. Dargestellt als Mittelwert±SEM; n=5-8; *p<0,05 vs. jeweils jüngere WT Gruppe; +p<0,05 vs. jeweils jüngere *Crtc1*^{-/-} Gruppe; ANOVA und Bonferroni-Test.

2.1.2. Fettsäurestoffwechsel

Bei verschiedenen Hypertrophieformen scheint es zu einer anteiligen Verringerung des kardialen Fettsäuremetabolismus zu kommen. Zur Einschätzung des Fettsäurestoffwechsels wurden Gene untersucht die an der Regulation und der Substratbereitstellung beteiligt sind:

PPAR α Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor alpha, kodiert durch *Ppara*.

PPAR α reguliert die Expression von Genen, die an der Fettsäureaktivierung, der mitochondrialen Fettsäureaufnahme (über CPT-1b) und der β -Oxidation beteiligt sind.

CPT-1b Carnitin-Palmitoyltransferase 1b, kodiert durch *Cpt1b*.

CPT-1b ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der β -Oxidation, da es die Umwandlung von langkettigem Acyl-CoA zu Acylcarnitin und damit den Transport aus dem Zytoplasma in die Mitochondrien ermöglicht.

Zwischen Wildtypmäusen und *Crtc1*^{-/-} Mäusen wurden keine Unterschiede in der mRNA Expression der untersuchten Gene gemessen (Abbildung 2.4). In den Herzen der *Mybpc3*^{ki} Mäuse wurde im Vergleich zu *Crtc1*^{-/-} und Wildtypmäusen eine verminderte *Ppara* Expression gemessen (Abbildung 2.4a) und eine erhöhte *Cpt1b* Expression (Abbildung 2.4b), obwohl PPAR α an der Erhöhung der Transkription des CPT-1b Gens beteiligt ist [175].

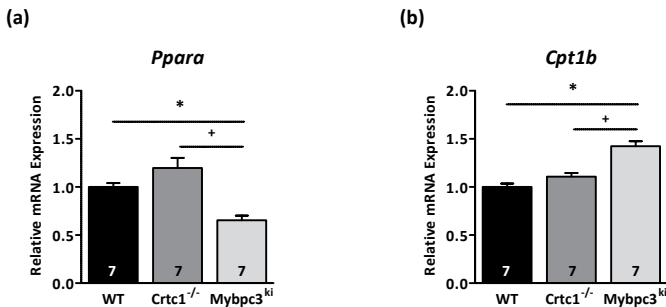


Abbildung 2.4.: mRNA Expression von den Fettsäuremetabolismus betreffenden Genen in den Herzen von *Crtc1*^{-/-} und *Mybpc3*^{ki} Mäusen.

Quantitative (a) *Ppara* und (b) *Cpt1b* mRNA Expression bezogen auf *Gnas* im Herzgewebe von *Crtc1*^{-/-} und *Mybpc3*^{ki} Mäusen verglichen mit Wildtypmäusen (WT) wurde mittels RT-qPCR gemessen und mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode berechnet. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; * p <0,05 vs. WT; + p <0,05 vs. *Crtc1*^{-/-}; ANOVA und Tukey-Test; die Anzahl der Mäuse ist in den Balken angegeben.

Um altersabhängige Unterschiede entdecken zu können wurden *Crtc1*^{-/-} Mäuse zusätzlich im Alter von 10 bis 13 Wochen, 25 bis 30 Wochen und 45 bis 52 Wochen untersucht (Abbildung 2.5). Bezogen auf die jeweils jüngere Gruppe an Tieren war die *Ppara* mRNA Expression in den Herzen der 10-13 Wochen alten Wildtypmäuse erhöht, bei den 25-30 Wochen alten

Wildtypmäusen vermindert. In 25-30 Wochen alten *Crtc1*^{-/-} Mäusen war die *Ppara* mRNA Expression bezogen auf die jüngere Gruppe ebenfalls vermindert, in 45-52 Wochen alten Tieren erhöht (Abbildung 2.5a). Die *Cpt1b* mRNA Expression unterschied sich nicht zwischen den Gruppen verschiedenen Alters. Im Alter von 25-30 Wochen war die *Cpt1b* mRNA Expression in den Herzen der *Crtc1*^{-/-} Mäuse verglichen mit ihren gleichaltrigen Wildtypgeschwistertieren erhöht (Abbildung 2.5b).

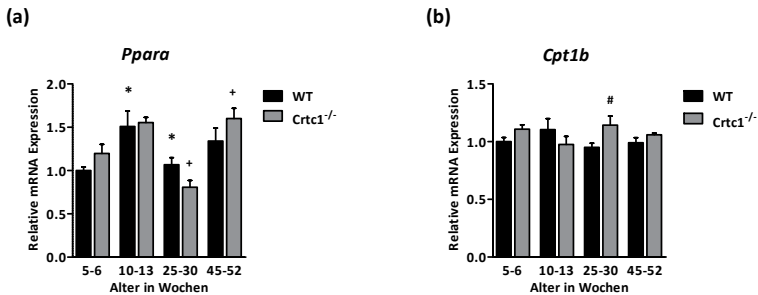


Abbildung 2.5.: mRNA Expression von den Fettsäuremetabolismus betreffenden Genen in den Herzen von *Crtc1*^{-/-} und Wildtypmäusen verschiedenen Alters.

Quantitative (a) *Ppara* und (b) *Cpt1b* mRNA Expression bezogen auf *Gnas* im Herzgewebe von *Crtc1*^{-/-} Mäusen verglichen mit ihren Wildtypgeschwistertieren (WT) wurde mittels RT-qPCR gemessen und mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode berechnet. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; n=5-8; *p<0,05 vs. jeweils jüngere WT Gruppe; +p<0,05 vs. jeweils jüngere *Crtc1*^{-/-} Gruppe; ANOVA und Bonferroni-Test; #p<0,05 vs. jeweils gleichaltrige WT Gruppe; Student t-Test.

2.1.3. Glucosestoffwechsel

Bei der Pathogenese der Herzinsuffizienz scheint die ATP-Produktion durch Glucose zunächst erhöht, in einem späteren Stadium des allgemeinen Energiemangels vermindert. Zur Einschätzung einer Veränderung des Glucosestoffwechsels wurden Gene untersucht, deren Produkte an der Substratbereitstellung und dem Glucoseabbau beteiligt sind:

GLUT1 Glucose Transporter 1, kodiert durch *Slc2a1*.

Glucosetransporter erleichtern die Diffusion von Glucose. GLUT1

dient der Grundversorgung der Zellen mit Glucose und kommt in allen, aber besonders häufig in fetalen Zellen vor.

GLUT4 Glucose Transporter 4, kodiert durch *Slc2a4*.

GLUT4 ist ein Insulin-abhängiger Glucosetransporter der ausschließlich in Fett- und Muskelzellen vorkommt.

PDP Pyruvatdehydrogenase Phosphatase, regulatorische Untereinheit, kodiert durch *Pdpr*.

PDP ist Teil des Pyruvatdehydrogenase-Komplex, der die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat katalysiert und dadurch die Glycolyse mit dem Citratzyklus und der Fettsäuresynthese verbindet. PDP dephosphoryliert und aktiviert die Pyruvatdehydrogenase (PDH) und wird selbst unter anderem durch Ca^{2+} aktiviert.

Zwischen Wildtypmäusen und *Crtc1*^{-/-} Mäusen wurden keine signifikanten Unterschiede in der mRNA Expression der untersuchten Gene gemessen (Abbildung 2.6). In Herzen der *Mybpc3*^{ki} Mäuse wurde im Vergleich zu den Wildtypmäusen eine verminderte *Slc2a4* Expression gemessen (Abbildung 2.6b). Die *Pdpr* Expression betreffend wurde lediglich eine erhöhte mRNA Expression bei *Crtc1*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu *Mybpc3*^{ki} Mäusen beobachtet, nicht aber im Vergleich zu Wildtypmäusen (Abbildung 2.6c).

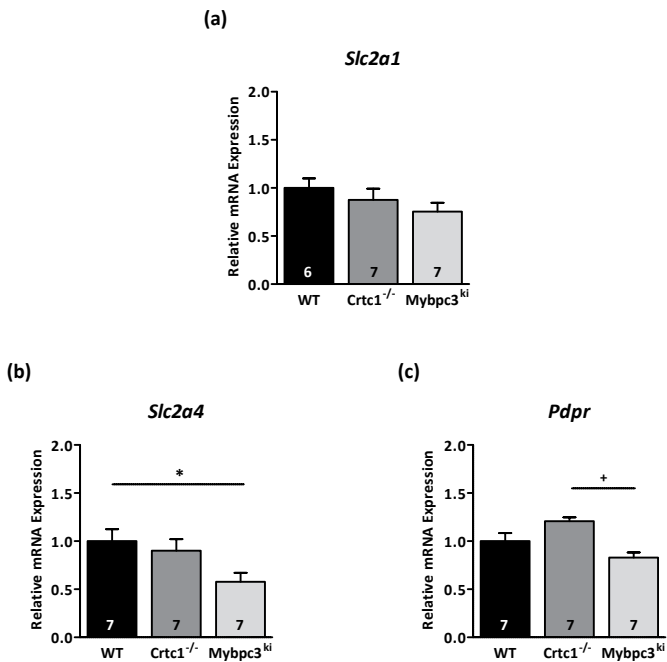


Abbildung 2.6.: mRNA Expression von den Glucosemetabolismus betreffenden Genen in den Herzen von *Crtc1*^{-/-} und *Mybpc3*^{ki} Mäusen.

Quantitative (a) *Slc2a1*, (b) *Slc2a4*, und (c) *Pdpr* mRNA Expression bezogen auf *Gnas* im Herzgewebe von *Crtc1*^{-/-} und *Mybpc3*^{ki} Mäusen verglichen mit Wildtypmäusen (WT) wurde mittels RT-qPCR gemessen und mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode berechnet. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. WT; + $p < 0,05$ vs. *Crtc1*^{-/-}; ANOVA und Tukey-Test; die Anzahl der Mäuse ist in den Balken angegeben.

Bei der Untersuchung altersabhängiger Unterschiede (Abbildung 2.7) wurde bei 5-6 Wochen alten *Crtc1*^{-/-} Mäusen eine erhöhte *Pdpr* Expression im Vergleich mit gleichaltrigen Wildtypgeschwistertieren detektiert. Da in dieser Darstellung die mRNA Expression nicht mit *Mybpc3*^{ki} Mäusen verglichen wurde, wurde ein anderer statistischer Test verwendet als für die Auswertung in Abbildung 2.6, die Daten für die *Crtc1*^{-/-} Mäuse und ihre Wildtypgeschwistertiere sind aber identisch. Die *Slc2a4* Expression schwankt bei den Wildtypmäusen, im Alter von 10 von 13 Wochen war die Expression erhöht, im Alter von 25 von 30 Wochen vermindert. In den Herzen der *Crtc1*^{-/-} Mäuse war die *Slc2a4* Expression bezogen auf die jüngere Gruppe im Alter von 10 von 13 Wochen erhöht.

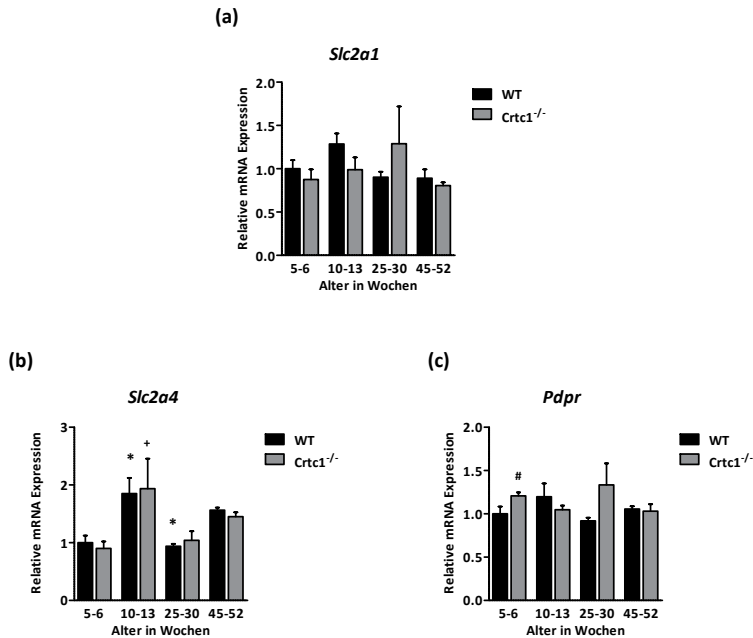


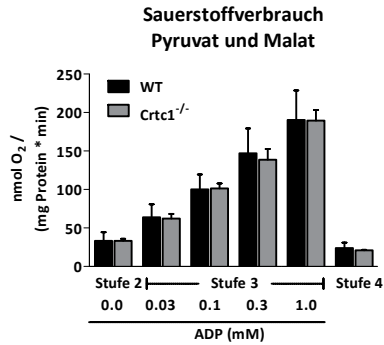
Abbildung 2.7.: mRNA Expression von den Glucosemetabolismus betreffenden Genen in den Herzen von *Crtc1*^{-/-} und Wildtypmäusen verschiedenen Alters.

Quantitative (a) *Slc2a1*, (b) *Slc2a4* und (c) *Pdpr* mRNA Expression bezogen auf *Gnas* im Herzgewebe von *Crtc1*^{-/-} Mäusen verglichen mit ihren Wildtypgeschwistertieren (WT) wurde mittels RT-qPCR gemessen und mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; n=5-8; *p<0,05 vs. jeweils jüngere WT Gruppe; +p<0,05 vs. jeweils jüngere *Crtc1*^{-/-} Gruppe; ANOVA und Bonferroni-Test; #p<0,05 vs. jeweils gleichaltrige WT Gruppe; Student t-Test.

2.1.4. Mitochondriale Atmung

Zur Untersuchung der Funktionalität der Mitochondrien bei unterschiedlichem Substratangebot wurden *Crtc1*^{-/-} Mäuse und Wildtypgeschwister-tiere im Alter zwischen 13 und 16 Wochen in Kooperation mit der Gruppe von Prof. Christoph Maack (Universitätsklinikum Würzburg, Deutschland) untersucht. Bei isolierten Mitochondrien aus den Herzen von *Crtc1*^{-/-} und Wildtypmäusen wurde der Sauerstoffverbrauch mithilfe einer Clark-Elektrode gemessen; zunächst unter der Zugabe von Substraten die den Citratzyklus antreiben, Pyruvat und Malat. In einem weiteren Versuch wurde der Sauerstoffverbrauch fettsäuregetriggert durch Zugabe von Oleoylcarnitin gemessen, um die Fettsäureoxidationskapazität der Mitochondrien zu prüfen. In beiden Versuchsanordnungen wird ADP in steigender Menge zugeführt, um höhere Geschwindigkeiten des Elektronentransports innerhalb der Atmungskette zu stimulieren. Am Ende wird Oligomycin zur Kontrolle der Intaktheit der Mitochondrien hinzugegeben. Oligomycin hemmt die F_O-Untereinheit der ATP-Synthase. Sinkt der Sauerstoffverbrauch nach Zugabe von Oligomycin wird erkennbar, dass der vorherige Sauerstoffverbrauch durch die mitochondriale Elektronentransportkette verursacht war (siehe auch Beschreibung im Methodenteil, Kapitel 5.2.2). In beiden Versuchsanordnungen waren der Sauerstoffverbrauch von *Crtc1*^{-/-} Mäusen und ihren Wildtypgeschwister-tieren nicht unterschiedlich (Abbildung 2.8). Bei beiden Genotypen war der Sauerstoffverbrauch unter reiner Substratverfügbarkeit gering und ließ sich durch Zugabe von ADP konzentrationsabhängig steigern. Am meisten Sauerstoff wurde bei einer supraphysiologischen ADP-Konzentration von 1 mM verbraucht. Das Absinken des Sauerstoffverbrauchs nach Zugabe von Oligomycin lässt auf intakte Mitochondrien bei beiden Genotypen schließen. Als Maß für die Kopplung von Elektronentransport und der oxidativen Phosphorylierung kann der Sauerstoffverbrauch aus Stufe 3 (ADP getrieben) im Verhältnis zu Stufe 2 (reine Substratverfügbarkeit) gesetzt werden. Das Verhältnis von Stufe 3 zu Stufe 4 (Hemmung der ATP-Synthase) gilt als Maß für die Integrität der Mitochondrien (*Respiratory Control Ra-*

(a)



(b)

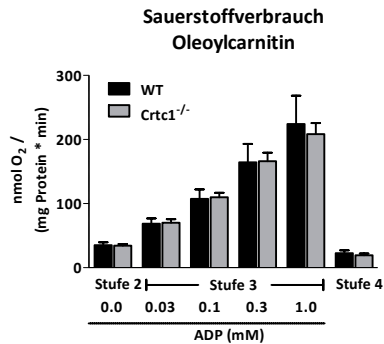


Abbildung 2.8.: Mitochondriale Atmung in den Herzen von *Crtc1*^{-/-} und Wildtypmäusen.

Quantitativer Sauerstoffverbrauch (O₂) isolierter Mitochondrien aus Herzgewebe von *Crtc1*^{-/-} Mäusen verglichen mit ihren Wildtypgeschwistertieren (WT) bezogen auf Gesamtprotein und Zeit unter Zugabe von (a) Pyruvat und Malat beziehungsweise (b) Oleoylcarnitin in Stufe 2; sowie unter steigender ADP-Konzentration (Stufe 3) und Oligomycin (Stufe 4). Dargestellt als Mittelwert±SEM; Anzahl der Mäuse n=6.

tio, RCR). Ein geringer RCR-Wert kann auf geschädigte Mitochondrien hindeuten. Bei beiden Quotienten zeigte sich kein Unterschied zwischen den Genotypen (Abbildung 2.9).

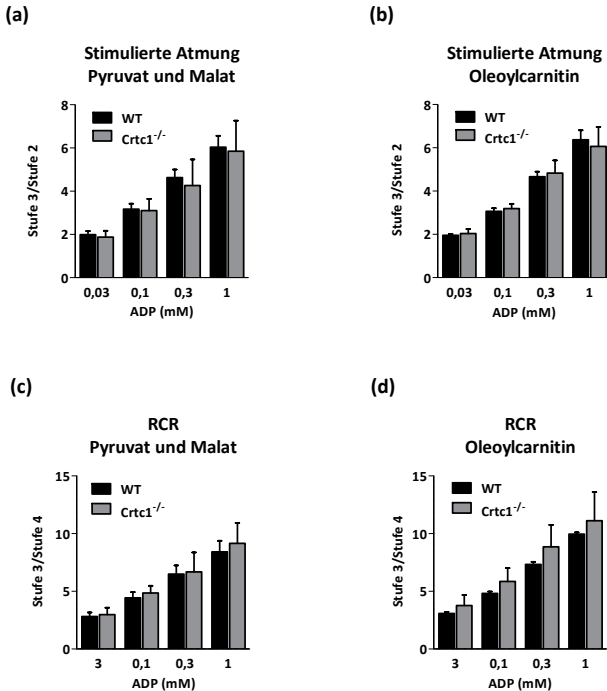


Abbildung 2.9.: Stimulierte mitochondriale Atmung und Respiratory Control Ratio in den Herzen von *Crtc1*^{-/-} und Wildtypmäusen.

Crtc1^{-/-} Mäuse verglichen mit ihren Wildtypgeschwistertieren (WT). Verhältnis von Stufe 3 zu Stufe 2 (vgl. Abbildung 2.8) als Maß für Atmung unter reiner Substratverfügbarkeit im Verhältnis zu *Pull*-Aktivierung der Atmungskette durch ADP (a) unter Verfügbarkeit von Pyruvat und Malat, (b) unter Verfügbarkeit von Oleoylcarnitin. Verhältnis von Stufe 3 zu Stufe 4 ist der Respiratory Control Ratio (RCR), als Maß für die Integrität der Mitochondrien. (c) Unter Verfügbarkeit von Pyruvat und Malat, (d) unter Verfügbarkeit von Oleoylcarnitin. Dargestellt als Mittelwert±SEM; Anzahl der Mäuse n=6.

2.2. Mitochondrienphysiologie

Von besonderer Bedeutung für die Energieversorgung des Herzmuskels sind die Mitochondrien. Zur Untersuchung der Regulation kardialer Mitochondrien wurden die mRNA Mengen verschiedener an der Biogenese und dem Gleichgewicht von Spaltung und Vereinigung (*fission* und *fusion*) der Mitochondrien beteiligter Gene per RT-qPCR gemessen und die Proteinmengen einiger beteiligter Proteine mittels Immunoblot. *Crtc1*^{-/-} Mäuse wurden mit *Mybpc3*^{ki} Mäusen im Alter von 5 bis 6 Wochen verglichen. *Crtc1*^{-/-} Mäuse wurden außerdem im Alter von 10 bis 13, 25 bis 30 und 45 bis 52 Wochen untersucht, um Unterschiede des Genstatus abhängig vom Alter detektieren zu können.

2.2.1. Mitochondrienbiogenese

Eine flexible Mitochondrienregulation ist essenziell für angemessene Reaktionen auf Veränderungen des Energiebedarfs. Die Mitochondrienbiogenese betreffende untersuchte Gene:

PGC-1 α Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma Koaktivator 1-alpha, kodiert durch *Ppargc1a*.

PGC-1 α verstärkt als Transkriptionsfaktor die Transkriptionsaktivität von PPAR γ und ist zentraler Regulator der mitochondrialen Biogenese.

mt-Nd1 Mitochondriale NADH-Dehydrogenase 1, kodiert durch *mt-Nd1*.

Die NADH-Dehydrogenase (auch NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase) ist Teil des Komplex I der mitochondrialen Elektronentransportkette und wird durch das mitochondriale Genom kodiert.

TFAM Mitochondrialer Transkriptionsfaktor A, kodiert durch *Tfam*.

TFAM aktiviert die mitochondriale Transkription und Genomreplikation.

Zwischen Wildtypmäusen und *Crtc1*^{-/-} Mäusen wurden keine Unterschiede in der mRNA Expression der untersuchten Gene gemessen (Abbil-

derung 2.10). In *Mybpc3^{ki}* Mäusen wurden im Vergleich zu den Wildtypmäusen eine verminderte *Ppargc1a* und *mt-Nd1* Expression gemessen.

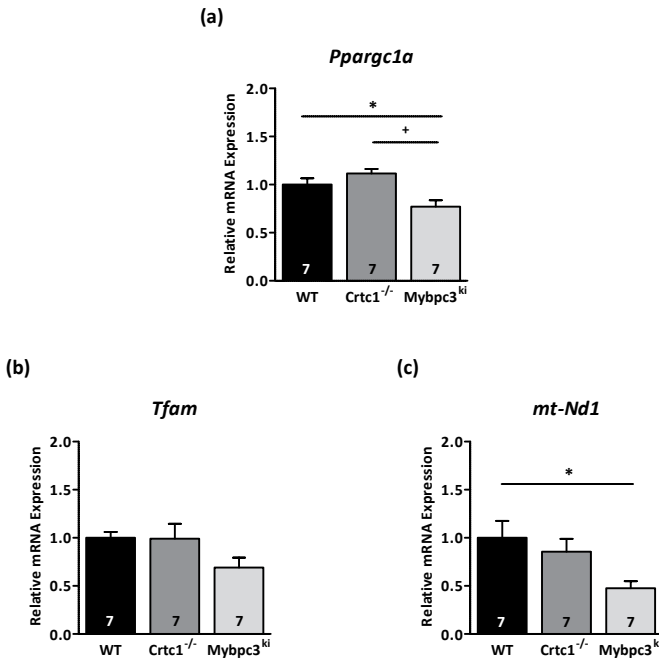


Abbildung 2.10: mRNA Expression von die Mitochondrienbiogenese betreffenden Genen in den Herzen von *Crtc1*^{-/-} und *Mybpc3*^{ki} Mäusen.

Quantitative (a) *Ppargc1a*, (b) *Tfam*, und (c) *mt-Nd1* mRNA Expression bezogen auf *Gnas* im Herzgewebe von *Crtc1*^{-/-} und *Mybpc3*^{ki} Mäusen verglichen mit Wildtypmäusen (WT) wurde mittels RT-qPCR gemessen und mit der $\Delta\Delta Ct$ -Methode berechnet. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. WT; + $p < 0,05$ vs. *Crtc1*^{-/-}; ANOVA und Tukey-Test; die Anzahl der Mäuse ist in den Balken angegeben.

Die Expression derselben Gene wurde auf altersabhängige Unterschiede in den Herzen von *Crtc1*^{-/-} Mäusen und ihren Wildtypgeschwistertieren untersucht (Abbildung 2.11). Bezogen auf die jeweils jüngere Gruppe an Tieren war die *Ppargc1a* mRNA Expression in den Mausherzen sowohl bei *Crtc1*^{-/-} als auch bei ihren Wildtypgeschwistertieren im Alter von 10-13 Wochen erhöht und im Alter von 25-30 wieder vermindert. Die *Tfam* Expression schwankt bei den Wildtypmäusen, im Alter von 10-13 Wochen

war die Expression erhöht, mit steigendem Alter wurde eine verminderte Expression gemessen die dann bei 45-52 Wochen alten Mäusen wieder erhöht war. In *Crtc1*^{-/-} Mäusen war die *Tfam* Expression im Alter von 10-13 Wochen verglichen mit der jüngeren Gruppe erhöht. Im Alter von 25-30 Wochen war die *Tfam* mRNA Expression in den Herzen der *Crtc1*^{-/-} Mäuse erhöht verglichen mit ihren gleichaltrigen Wildtypgeschwistertieren. Die *mt-Nd1* Expression war in den 25-30 Wochen alten Wildtypmäusen bezogen auf die jüngere Gruppe erhöht. Im Alter von 45-52 Wochen war die *mt-Nd1* Expression in den *Crtc1*^{-/-} Mäusen vermindert im Vergleich zu ihren gleichaltrigen Wildtypgeschwistertieren.

Parallel zu den mRNA Untersuchungen wurde die Expression bestimmter Proteine per Immunoblot quantitativ bestimmt. Vorherige Arbeiten zeigten, dass PGC-1 α durch CRTC1 reguliert wird [147][192]. In den hier durchgeführten Experimenten wurde keine veränderte kardiale Proteinexpression von PGC-1 α beobachtet, weder bei *Crtc1*^{-/-} noch bei *Mybpc3*^{ki} Mäusen (Abbildung 2.12).

Wu et al. zeigten, dass CRTC1 an der Transkription von PGC-1 α im Muskel beteiligt ist [192]. Um den Einfluss der Transkriptionsfaktoren CREB und CRTC1 auf die Expression von PGC-1 α im Herzen zu untersuchen, wurde eine Chromatin-Immunpräzipitation an Herzgewebe von Wildtypmäusen durchgeführt. Durch die Verwendung von Antikörpern gegen CRTC1 und CREB wurde die Bindung von endogenem CRTC1 und CREB an den *Ppargc1a* Promotor in Mausherzen untersucht. Da IgG nicht an den *Ppargc1a* Promotor bindet, wurde IgG als Negativkontrolle verwendet. Die anschließende PCR mit Primern für den *Ppargc1a* Promotor zeigte eine Rekrutierung sowohl von CRTC1 als auch CREB an den *Ppargc1a* Promotor (Abbildung 2.13).

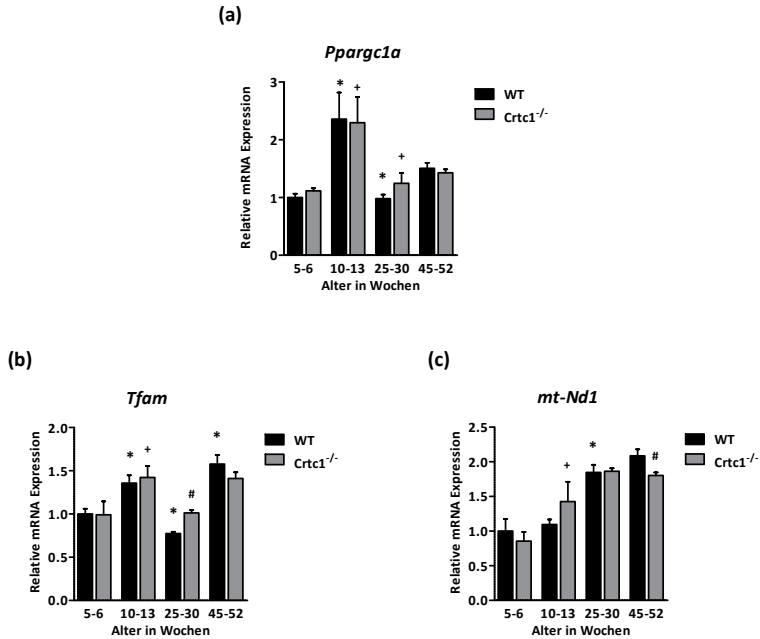


Abbildung 2.11.: mRNA Expression von die Mitochondrienbiogenese betreffenden Genen in den Herzen von *Crtc1*^{-/-} und Wildtypmäusen verschiedenen Alters.

Quantitative (a) *Ppargc1a*, (b) *Tfam* und (c) *mt-Nd1* mRNA Expression bezogen auf *Gnas* im Herzgewebe von *Crtc1*^{-/-} Mäusen verglichen mit ihren Wildtypgeschwistertieren (WT) wurde mittels RT-qPCR gemessen und mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; n=5-8; *p<0,05 vs. jeweils jüngere WT Gruppe; +p<0,05 vs. jeweils jüngere *Crtc1*^{-/-} Gruppe; ANOVA und Bonferroni-Test; #p<0,05 vs. jeweils gleichaltrige WT Gruppe; Student t-Test.

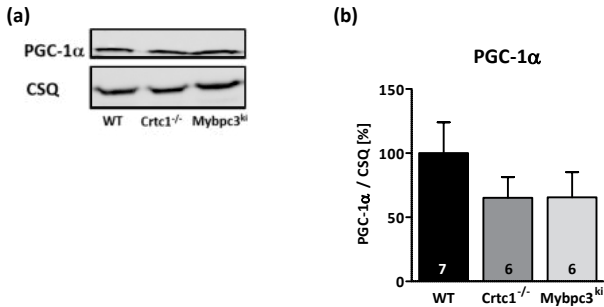


Abbildung 2.12.: PGC-1α Proteinmenge in den Herzen von *Crtc1*^{-/-} und *Mybpc3*^{KI} Mäusen.
PGC-1α Proteinmenge wurde mit einem Antikörper gegen PGC-1α im Immunoblot von Proben der Proteinlysate aus den Herzen von *Crtc1*^{-/-}, *Mybpc3*^{KI} und Wildtypmäusen (WT) untersucht. (a) Repräsentativer Immunoblot. (b) Quantitative Auswertung bezogen auf die CSQ Menge. Dargestellt als Mittelwert±SEM; die Anzahl der Mäuse ist in den Balken angegeben.

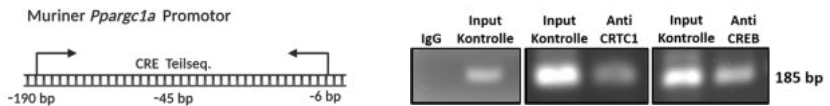


Abbildung 2.13.: Rekrutierung von CRTC1 und CREB an den murinen *Ppargc1a* Promotor.
An Herzgewebe von Wildtypmäusen wurde eine Chromatin-Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen CRTC1, CREB sowie mit IgG als Negativkontrolle durchgeführt. Die erhaltene DNA wurde mittels PCR und Primern für den *Ppargc1a* Promotor amplifiziert.

2.2.2. Morphologie der Mitochondrien

Fission und Fusion

Das Gleichgewicht zwischen *fission* und *fusion*, also der Spaltung und Vereinigung von Mitochondrien, ist notwendig für eine normale Funktion. *Fission* und *fusion* betreffende untersuchte Gene:

Dnm1 Dynamin 1-Like, kodiert durch *Dnm1*.

Dnm1 ist eine GTPase welche die mitochondriale Spaltung (*fission*) reguliert.

MFN2 Mitofusin-2, kodiert durch *Mfn2*.

MFN2 ist an der mitochondrialen Vereinigung (*fusion*) und der Aufrechterhaltung des mitochondrialen Netzwerkes (Gleichgewicht von *fission* und *fusion*) beteiligt.

Zwischen Wildtypmäusen und *Crtc1*^{-/-} Mäusen wurden keine Unterschiede in der mRNA Expression der untersuchten Gene gemessen (Abbildung 2.14). Die *Dnm1* Expression betreffend wurde lediglich eine erhöhte Expression in *Crtc1*^{-/-} Mäusen verglichen mit *Mybpc3*^{ki} Mäusen beobachtet, nicht aber im Vergleich zu den Wildtypmäusen.

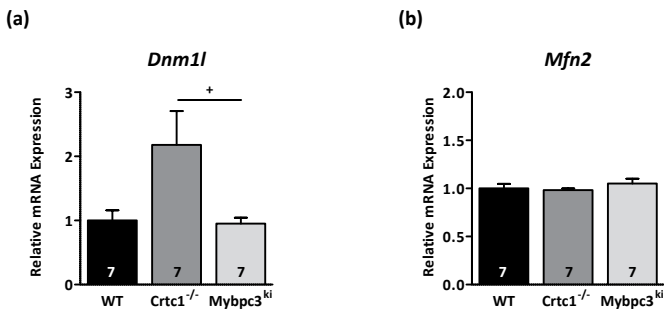


Abbildung 2.14.: mRNA Expression von *fission* und *fusion* betreffenden Genen in den Herzen von *Crtc1*^{-/-} und *Mybpc3*^{ki} Mäusen.

Quantitative (a) *Dnm1* und (b) *Mfn2* mRNA Expression bezogen auf *Gnas* im Herzgewebe von *Crtc1*^{-/-} und *Mybpc3*^{ki} Mäusen verglichen mit Wildtypmäusen (WT) wurde mittels RT-qPCR gemessen und mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; + $p < 0,05$ vs. *Crtc1*^{-/-}; ANOVA und Tukey-Test; die Anzahl der Mäuse ist in den Balken angegeben.

Histologie

Zur histologischen Untersuchung der Mitochondrien wurden in der Gruppe von Prof. Gabriele M. Rune (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Deutschland) elektronenmikroskopische Aufnahmen von Schnitten des linken Ventrikels von *Crtc1*^{-/-} Mäusen und ihren Wildtypgeschwistertieren im Alter von acht Wochen angefertigt (exemplarische Ausschnitte in Abbildung 2.15).

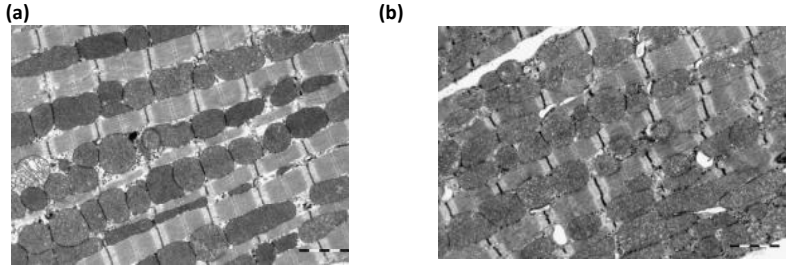


Abbildung 2.15.: Mitochondrien im linken Ventrikel von Wildtyp- und *Crtc1*^{-/-} Mäusen. Exemplarische Abbildungen der Mitochondrien in elektronenmikroskopischen Schnitten des jeweils linken Ventrikels von acht Wochen alten (a) Wildtyp- und (b) *Crtc1*^{-/-} Mäusen.

Auf verblindet und zufällig ausgewählten Ausschnitten wurde die Größe der Mitochondrien quantitativ ausgewertet. Dazu wurde der Umfang (Abbildung 2.16a), der Feret Durchmesser (Abbildung 2.16b) und die Fläche der Mitochondrien (Abbildung 2.16c) gemessen. Die Berechnung $4 \times \pi \times (A \div (2 \times \pi \times r)^2)$ kann als Maß für die Nähe der Form der Mitochondrien an einen Kreis herangezogen werden (Abbildung 2.16d). Kleine, rundere Mitochondrien können vermehrt nach ischämischen Episoden auftreten [137]. Außerdem wurde über die Pixeldichte die Dichte der Cristae abgeschätzt (Abbildung 2.16e). In den ausgewerteten Bildern wurden die Mitochondrien gezählt (Abbildung 2.16f) und die Länge der Sarkomere gemessen (Abbildung 2.16g). Bei diesen quantitativen Bestimmungen der Mitochondrienhistologie wurden keine Unterschiede zwischen den *Crtc1*^{-/-} Mäusen und ihren Wildtypgeschwistertieren gemessen (Abbildung 2.16).

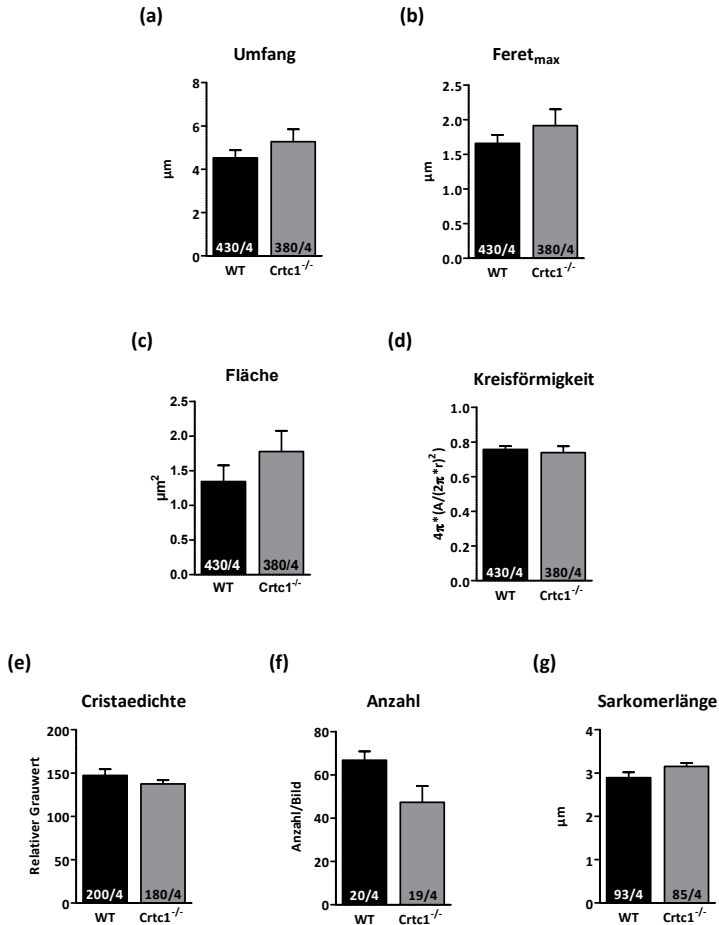


Abbildung 2.16.: Morphologische Merkmale der Mitochondrien in den linken Ventrikeln der *Crtc1*^{-/-} Mäuse.

Quantitative Auswertung der Mitochondrienhistologie an Schnitten von linken Ventrikeln von *Crtc1*^{-/-} und Wildtypmäusen (WT) im Alter von acht Wochen mit ImageJ [3]. Berechnet wurden der (a) Umfang, (b) der maximale Feret-Durchmesser, (c) die Fläche, (d) ein Maß für die Kreisförmigkeit, (e) die Pixeldichte als Maß der Cristaedichte, (f) die Anzahl der Mitochondrien auf den ausgewählten Ausschnitten und (g) die Sarkomerlänge. Dargestellt als Mittelwert±SEM; die Anzahl der Mitochondrien/Mäuse (a-e) beziehungsweise Bilder/Mäuse (f) oder Sarkomere/Mäuse (g) ist in den Balken angegeben.

2.2.3. Funktion und Integrität der Mitochondrien

Für die dynamische Regulation der mitochondrialen antioxidativen Kapazität ist eine intakte Erregungs-Kontraktions-Kopplung essenziell[17]. Diese Dynamik kann in versagenden Herzmuskelzellen durch maladaptive Veränderungen gestört sein und den Ca^{2+} -Efflux aus der mitochondrialen Matrix beschleunigen. Dadurch kann die Ca^{2+} -abhängige Stimulation der Citratzyklus-Dehydrogenasen behindert werden, was zu einer Abnahme der Reduktionslage der Mitochondrien führt. Dies begrenzt die Elektronenzufuhr zur Elektronentransportkette [115]. So beeinträchtigt das gestörte intrazelluläre Ca^{2+} -Handling bei Herzinsuffizienz die Regeneration der antioxidativen Kapazität, was zur Emission von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) aus den Mitochondrien führt [187].

Zur Untersuchung der Funktionalität der Mitochondrien wurden *Crtc1*^{-/-} Mäuse und ihre Wildtypgeschwister im Alter zwischen 13 und 16 Wochen in Kooperation mit der Gruppe von Prof. Christoph Maack (Universitätsklinikum Würzburg, Deutschland) untersucht. Ein *permeability transition pore* (PTP)-Assay wurde durchgeführt zur Bestimmung der Calciumretentionskapazität und der Redoxstatus der Kardiomyozyten wurde überprüft als Maß für das Reduktionspotential der Mitochondrien. Außerdem wurde das Membranpotential als Maß für die Integrität bestimmt.

Calciumretentionskapazität

In einem PTP-Assay konnte die Calciumretentionskapazität von kardialen Mitochondrien überprüft werden. Alle 120 Sekunden wird Ca^{2+} (10 μM) appliziert und die extramitochondriale Ca^{2+} -Konzentration gemessen. Je schneller die extramitochondriale Ca^{2+} -Konzentration sinkt, umso effektiver wird das Ca^{2+} in die Mitochondrien aufgenommen. Cyclosporin A (CsA) verhindert die Öffnung der PTP und sorgt für eine Ca^{2+} -Aufnahme der Mitochondrien über die physiologische Retentionskapazität hinaus. Die kardialen Mitochondrien der *Crtc1*^{-/-} Mäuse scheinen Ca^{2+} effektiver aufzunehmen als die der Wildtypmäuse, es wurde aber kein Unterschied zwischen den Genotypen gemessen (Abbildung 2.17).

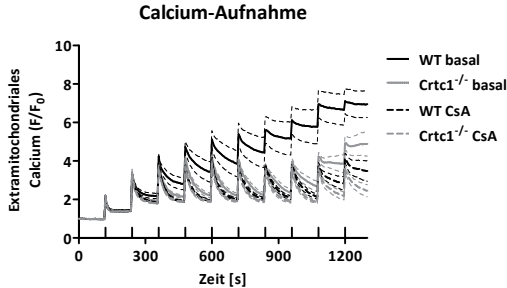


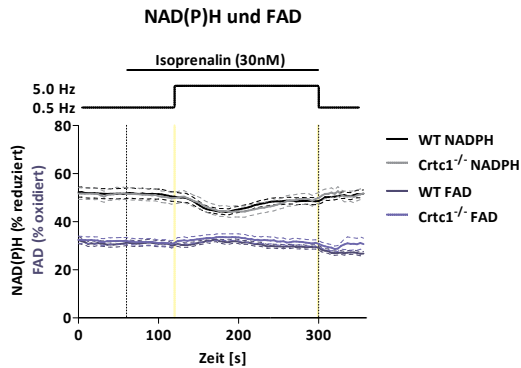
Abbildung 2.17.: Calciumretentionskapazität von kardialen Mitochondrien aus *Crtc1*^{-/-} Mäusen. Relatives Fluoreszenzsignal (F/F_0) stellt über die Zeit extramitochondriale Calciumkonzentrationen nativer (basal) und mit Cyclosporin A (CsA) behandelter Mitochondrien dar. Alle 120 Sekunden wurde Calcium ($10 \mu\text{M}$) zugeführt. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; Anzahl der Mäuse $n=6$.

Redoxstatus

Bei Herzinsuffizienz führt die Unfähigkeit der Mitochondrien, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) effizient zu eliminieren zu einem schädigenden Überfluss an ROS [187]. NADH/NADPH und FAD können zur Abschätzung des allgemeinen Oxidationsstatus einer Zelle herangezogen werden. Da beide Komponenten autofluoreszierend sind, NADH/NADPH abnehmend bei Oxidation, FAD zunehmend bei Oxidation, können sie ohne Fluoreszenzfarbstoff direkt gemessen werden. Bei einem Stressprotokoll unter Zugabe von Isoprenalin wurde NAD(P)H vermehrt oxidiert, erreichte nach 180 Sekunden Stimulation jedoch wieder den Ausgangswert. FAD lag unverändert vor. Zwischen *Crtc1*^{-/-}- und Wildtypmaus-Kardiomyozyten wurden keine Unterschiede gemessen (Abbildung 2.18a).

Das Verhältnis von NAD(P)H/FAD kann als sensitiver und ratiometrischer Index des mitochondrialen Redoxstatus dargestellt werden. Hier zeigte sich eine transiente Verschiebung in Richtung Oxidation während erhöhter Arbeitslast, welche am Ende der Stimulation wieder auf die Ausgangswerte zurückging. Dies war bei *Crtc1*^{-/-} und Wildtypmäusen nicht unterschiedlich (Abbildung 2.18b).

(a)



(b)



Abbildung 2.18.: Redoxstatus von isolierten Kardiomyozyten aus *Crtc1*^{-/-} Mäusen während erhöhter Arbeitslast.

(a) Prozentuale Angabe der Autofluoreszenz von NAD(P)H und FAD zur am Ende jeder Messung mit FCCP und CN kalibrierten NAD(P)H und FAD Gesamtmenge. (b) Verhältnis von NAD(P)H zu FAD als ratiometrischer Indikator des mitochondrialen Redoxstatus. Dargestellt als Mittelwert±SEM; Anzahl der Mäuse n=4.

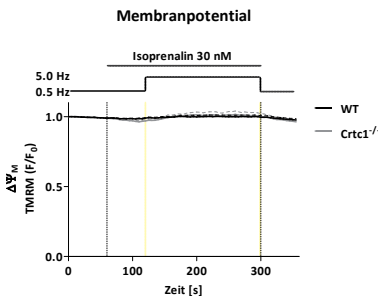
Membranpotential

Das mitochondriale Membranpotential ist kritisch für die ATP Produktion und für das Überleben der Zelle. Das Gleichgewicht des Membranpotentials ist sensibel reguliert.

Die Messungen des mitochondrialen Membranpotentials ergaben über den gesamten Verlauf der Messung in beiden Versuchsgruppen nahezu konstant gleiche Werte; auch bei Erhöhung der Arbeitslast der Kardiomyozyten durch Stimulation bei 5 Hz und Zugabe von Isoprenalin (Abbildung 2.19a).

Unter Zugabe von FCCP und Oligomycin kann das Membranpotential nicht durch ATP aufrechterhalten werden und sinkt von einem Maximalwert auf einen Minimalwert ab. Der Maximalwert scheint bei *Crtc1*^{-/-} Mäusen leicht erhöht, insgesamt wurden keine Unterschiede bei der Spannbreite des Membranpotentials zwischen den Genotypen gemessen (Abbildung 2.19b).

(a)



(b)

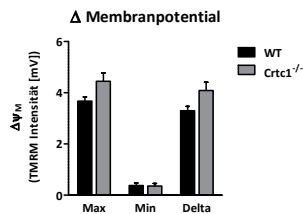


Abbildung 2.19.: Membranpotential $\Delta\Psi_M$ isolierter kardialer Mitochondrien aus *Crtc1*^{-/-} Mäusen.

(a) Relatives Fluoreszenzsignal (F/F_0) während erhöhter Arbeitslast (5 Hz und Isoprenalin) bezogen auf Fluoreszenzintensität (F_0) unter Basalbedingungen (0,5 Hz) zu Beginn der Messung. (b) Maximales Membranpotential (Max), minimales Membranpotential nach FCCP und Oligomycin Behandlung (Min) und die Membranpotentialveränderung (Delta) von isolierten kardialen Mitochondrien von *Crtc1*^{-/-} Mäusen verglichen mit ihren Wildtypgeschwistertieren. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; Anzahl der Mäuse n=2-3.

2.3. Regulation des S1P-Systems

In einem zweiten Projektteil wurde ein Zusammenhang zwischen CRTC1 und dem System des bioaktiven Lipids Sphingosin-1-Phosphat (S1P) untersucht. S1P wird über zwei Isoformen der Sphingosinkinase (SPHK1 und SPHK2) synthetisiert und kann in kardiovaskulären Geweben an drei verschiedene Rezeptoren binden. S1P aktiviert CREB [121], welches wiederum selbst die SPHK2 reguliert [125]. Theoretisch wäre ein Zusammenhang zwischen S1P, welches unter anderem essenziell für Revaskularisierung nach Gefäßverletzungen ist, und der ausbleibenden Fibrose in *Crtc1*^{-/-} Mäusen möglich. Möglicherweise ist dies auf eine verminderte *tissue inhibitor of metalloproteinases 4 (Timp4)* mRNA Expression zurückzuführen. In verschiedenen Geweben werden TIMPs durch S1P aktiviert [120]. Um Zusammenhänge der gegenseitigen Regulation und Involviertheit von CRTC1 zu überprüfen, wurden mRNA Daten erhoben und Promotor Untersuchungen durchgeführt.

2.3.1. Gefäßverletzung

In der Arbeitsgruppe von Dr. Günter Daum (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Deutschland) wurden bei Wildtypmäusen und Mäusen mit globalem S1P Rezeptor 3 *knockout* (*S1pr3*^{-/-}) jeweils die linke Arteria carotis ligiert und nach 4, 7 und 14 Tagen beide Carotisarterien entnommen und mRNA isoliert. Die *Crtc1*, *Crtc2* und *Crtc3* mRNA Expression wurde mittels RT-qPCR gemessen. In den Carotisarterien sowohl der Wildtyp- wie auch der *S1pr3*^{-/-} Mäuse wurde unabhängig von der Dauer der Ligation eine verminderte mRNA Expression aller *Crtc* Isoformen gemessen. Zwischen den Genotypen wurden keine Unterschiede gemessen (Abbildung 2.20).

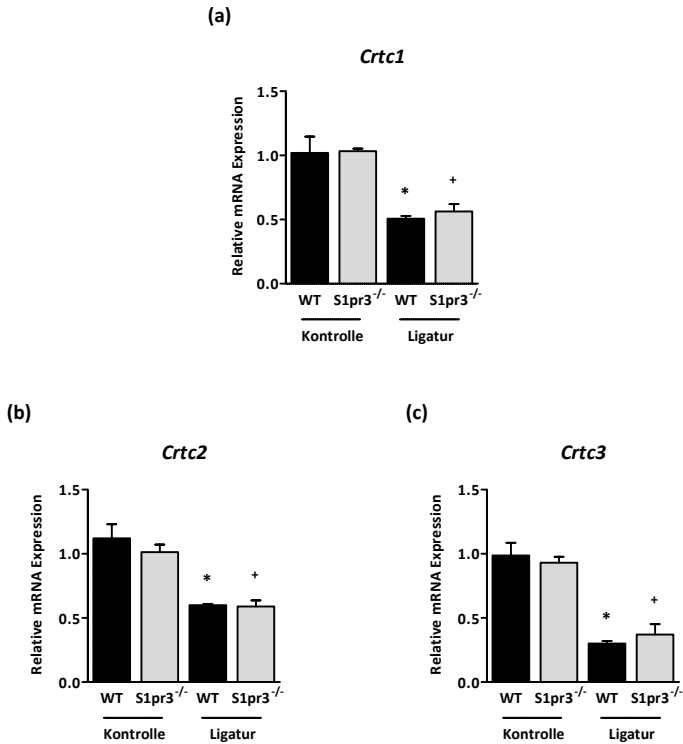


Abbildung 2.20.: *Crtc* mRNA Expression in *S1pr3*^{-/-} und Wildtypmäusen nach Ligatur der Arteria carotis. Quantitative (a) *Crtc1*, (b) *Crtc2* und (c) *Crtc3* mRNA Expression bezogen auf *Gnas* in ligierten Carotisarterien (Ligatur) von Wildtyp (WT) und *S1pr3*^{-/-} Mäusen verglichen mit den nicht ligierten Carotisarterien (Kontrolle) derselben Mäuse wurde mittels RT-qPCR gemessen und mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet. Angegeben sind die Werte von 10 gepoolten Mäusen; dargestellt als Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$ WT Ligatur vs. WT Kontrolle, + $p < 0,05$ *S1pr3*^{-/-} Ligatur vs. *S1pr3*^{-/-} Kontrolle; Student t-Test; n=3/30.

2.3.2. S1P Rezeptor Expression

Um die Zusammenhänge zwischen der mRNA Expression der S1P Rezeptoren (*S1pr*) und CRTC1 auf transkriptioneller Ebene zu erforschen, wurde die *S1pr* Expression in den Herzen und in den Aorten von *Crtc1*^{-/-} Mäusen gemessen. Die mRNA Expression der S1P Rezeptoren 1, 2 und 3 ist unverändert in den ganzen Herzen (Abbildung 2.21) sowie in der thorakalen Aorta (Abbildung 2.22) von *Crtc1*^{-/-} Mäusen verglichen mit ihren Wildtypgeschwistertieren.

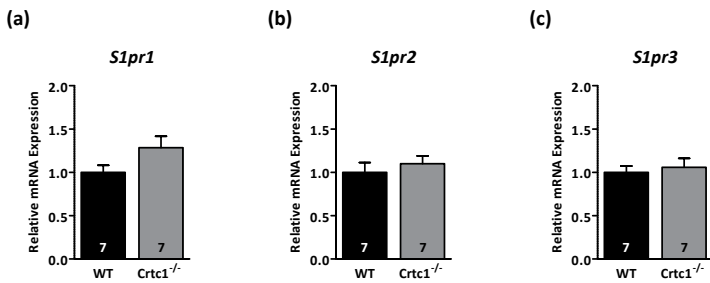


Abbildung 2.21.: *S1pr* mRNA Expression in den Herzen der *Crtc1*^{-/-} Mäuse.

Quantitative (a) *S1pr1*, (b) *S1pr2* und (c) *S1pr3* mRNA Expression bezogen auf *Gnas* im Herzgewebe von *Crtc1*^{-/-} Mäusen verglichen mit Wildtypmäusen (WT) wurde mittels RT-qPCR gemessen und mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; die Anzahl der Mäuse ist in den Balken angegeben.

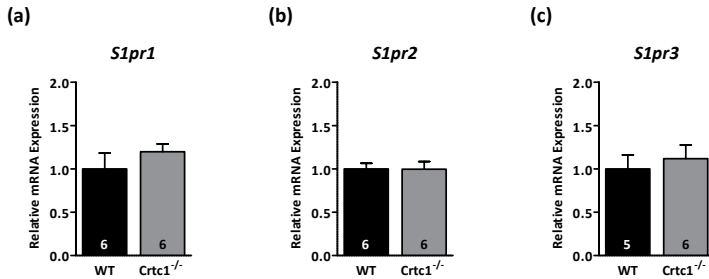


Abbildung 2.22.: *S1pr* mRNA Expression in den Aorten der *Crtc1*^{-/-} Mäuse.

Quantitative (a) *S1pr1*, (b) *S1pr2* und (c) *S1pr3* mRNA Expression bezogen auf *Gnas* in thorakalen Aorten von *Crtc1*^{-/-} Mäusen verglichen mit Wildtypmäusen (WT) wurde mittels RT-qPCR gemessen und mit der $\Delta\Delta Ct$ -Methode berechnet. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; die Anzahl der Mäuse ist in den Balken angegeben.

2.3.3. Promotor Untersuchungen

Um den Einfluss der Transkriptionsfaktoren CREB und CRTC1 auf die Expression der Sphingosinkinase 1 (SPHK1) und des S1P Rezeptor 3 (S1PR3) zu untersuchen, wurden Promotor-Luciferase-Reportergen Analysen und eine Chromatin-Immunpräzipitation durchgeführt.

Transkriptionelle Aktivität des SPHK1 und S1PR3 Promotor

Für den Luciferase Assay wurden HEK293T Zellen mit Plasmiden transfiziert, die das Luciferasegen unter der Kontrolle des zu untersuchenden Promotors enthalten. Eine Behandlung dieser Zellen mit Forskolin aktiviert den cAMP-Signalweg. In diesen Reportergenassays ist eine verstärkte Luciferaseaktivität aufgrund einer erhöhten Transkription ein Maß für eine Erhöhung der transkriptionellen Aktivität des zu untersuchenden Promotors.

Zunächst wurde untersucht, ob Forskolin in der HEK293T Zelllinie die CRE-abhängige Gentranskription steigert. Dazu wurde in HEK293T Zellen ein Plasmid transfiziert welches das Glühwürmchen Luciferasegen unter der Kontrolle des minimalen Herpes-Simplex-Virus-Thymidin-Kinase

(HSV-TK) Promotors (-81 bis +58 bp) und vier Kopien des CRE Ratten-Somatostatinpromotors enthält (Abbildung 2.23a). Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde gleichzeitig ein Plasmid mit dem Grün-fluoreszierenden-Protein (GFP) unter der Kontrolle des Cytomegaloviruspromotors (CMV) kotransfiziert. Diese Zellen wurden mit Forskolin zur cAMP-Signalweg Aktivierung behandelt. Außerdem wurde ein Calcium-Ionophor (A23187, Calcimycin) verwendet um Calcium-abhängige Signalwege zu aktivieren.

Forskolin und Calcimycin erhöhten die CRE-abhängige Gentranskription (Abbildung 2.23b). In einem weiteren Experiment wurde die Aktivierung durch Forskolin zusammen mit Calcimycin getestet. Die relative Luciferase Aktivität ist deutlich erhöht bei der gemeinsamen Behandlung (Abbildung 2.23c).

Anschließend wurde in HEK293T Zellen ein Plasmid transfiziert welches das Glühwürmchen Luciferasegen unter der Kontrolle des humanen Sphingosin Kinase 1 (*SPHK1*) Promotors enthält. Das Promotorkonstrukt, beschrieben von Anelli et al. [8] wurde zur Verfügung gestellt von Dr. Igor Prudovsky (Maine Medical Center Research Institute, USA). Die Promotorsequenz enthält eine CRE Teilsequenz, die als potenzielle Bindungsstelle für CREB dienen kann (Abbildung 2.24a). Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde gleichzeitig ein Plasmid mit GFP kotransfiziert. Diese Zellen wurden mit Forskolin, S1P und Calcimycin behandelt. Da das Serum in den Zellmedien S1P enthalten kann, wurden die Versuche an Zellen unter Serumentzug durchgeführt. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit den jeweiligen Lösungsmitteln der Substanzen behandelt. Die Behandlung mit S1P, Forskolin und/oder Calcimycin steigerte die SPHK1-Promotor abhängige Gentranskription nicht (Abbildung 2.24).

In einem weiteren Versuch wurden Zellen mit einem Plasmid mit dem Gaussia Luciferasegen unter der Kontrolle des humanen S1P Rezeptor 3 (*S1PR3*) Promotors transfiziert. Die Promotorsequenz enthält neun CRE Teilsequenzen, welche als potenzielle Bindungsstellen für CREB dienen können (Abbildung 2.25a). Dieses Plasmid enthält als interne Kontrolle für die Transfektionseffizienz die Sequenz für die Alkalische Phosphatase

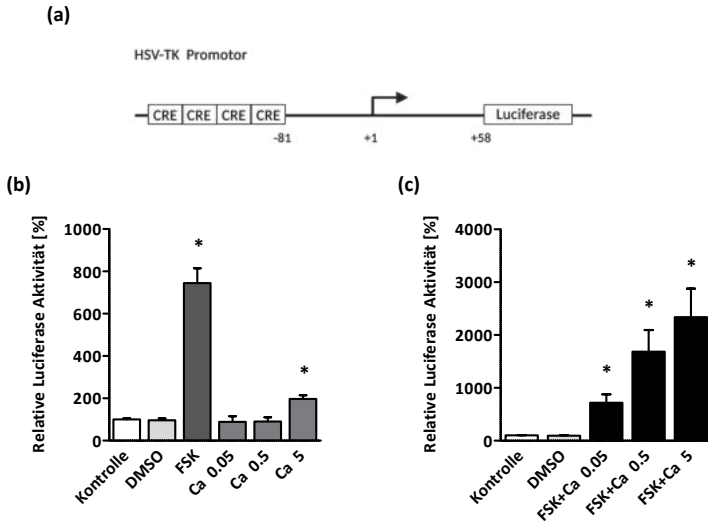


Abbildung 2.23.: CRE-abhängige Transkription in HEK293T Zellen durch Forskolin und Calcimycin.

(a) Ein Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle des Herpes-Simplex-Virus-Thymidin-Kinase (HSV-TK) Genpromotors (-81 bis +58 bp) und vier Kopien des CRE Ratten-Somatostatinpromotors wurde zusammen mit dem Expressionsplasmid für das Grün-fluoreszierende-Protein (GFP) transient in HEK293T Zellen kotransfiziert. Die Zellen wurden 6 Stunden vor der Ernte mit Forskolin (FSK; Endkonzentration 10 μ M) und/oder mit Calcimycin (Ca; Endkonzentration 50 nM, 500 nM und 5 μ M) behandelt. Zur Kontrolle dienten unbehandelte (Kontrolle) beziehungsweise mit dem Lösungsmittel (DMSO) behandelte Zellen. (b, c) Quantitative Auswertung zeigt die relative Luciferase Aktivität zur Lichtintensität von GFP bezogen auf die Kontrolle. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM von jeweils drei unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmungen. * $p < 0,05$ vs. DMSO; Student t-Test.

(*secreted alkaline phosphatase*, SeAP) unter Kontrolle des konstitutiv aktiven Cytomegalievirus (CMV) Promotors. Die Zellen wurden mit Forskolin und Calcimycin behandelt. Da die Gaussia Luciferase zu über 95 % sezerniert wird [14], können mehrmals Proben von demselben Well entnommen werden, da die Zellen nicht abgeschabt werden müssen. Eine Stunde nach Behandlungsbeginn konnte eine erhöhte Luciferase Aktivität bei der Behandlung mit S1P gemessen werden. Nach sechs Stunden war die Luciferase Aktivität nach der Behandlung mit Calcimycin erhöht (Abbildung 2.25).

2. Ergebnisse

(a)



(b)

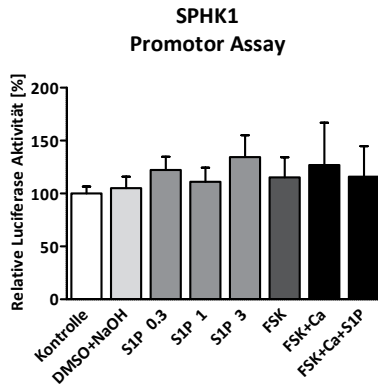


Abbildung 2.24.: *SPHK1* Promotoraktivität.

(a) Ein Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle des Sphingosin Kinase 1 (*SPHK1*) Promotors [8] wurde zusammen mit dem Expressionsplasmid für das Grün-fluoreszierende-Protein (GFP) transient in HEK293T Zellen kotransfiziert. Die Zellen wurden 6 Stunden vor der Ernte behandelt mit Sphingosin-1-phosphat (S1P; Endkonzentration 0,3 μ M, 1 μ M und 3 μ M), mit Forskolin (FSK; Endkonzentration 10 μ M) oder mit Calcimycin (Ca; Endkonzentration 5 μ M). Zur Kontrolle dienten unbehandelte (Kontrolle) beziehungsweise mit dem Lösungsmittel (DMSO+NaOH) behandelte Zellen. (b) Quantitative Auswertung zeigt die relative Luciferase Aktivität zur Lichtintensität von GFP bezogen auf die Kontrolle. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM von jeweils drei unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmungen.

(a)



(b)

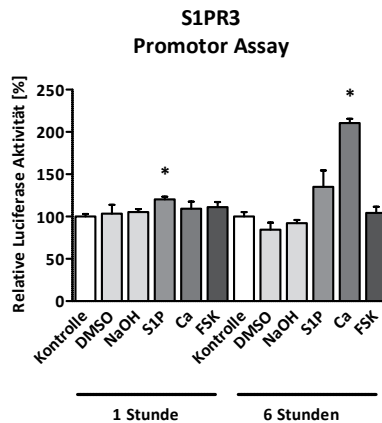


Abbildung 2.25.: S1PR3 Promotoraktivität.

(a) Ein Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle des humanen S1P Rezeptor 3 (S1PR3) Promotors (-1274 bis +158 bp) wurde transient in HEK293T Zellen transfiziert. Die Zellen wurden 1 und 6 Stunden vor der Ernte mit Sphingosin-1-phosphat (S1P; Endkonzentration 1 μ M), mit Forskolin (FSK; Endkonzentration 10 μ M) oder mit Calcimycin (Ca; Endkonzentration 5 μ M) behandelt. Zur Kontrolle dienten unbehandelte Kontrolle. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM von jeweils drei unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmungen. * $p < 0,05$ S1P vs. NaOH; entspr. Ca vs. DMSO; Student t-Test.

Chromatin-Immunpräzipitation

Durch eine Chromatin-Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen CRTC1 und CREB wurde die Bindung von endogenem CRTC1 und CREB an die Promotoren der Sphingosinkinase 1 (kodiert durch *Sphk1*) und des S1P Rezeptor 3 (kodiert durch *S1pr3*) in Mausherzen untersucht. Da IgG weder an den *Sphk1* Promotor noch an den *S1pr3* Promotor bindet, wurde IgG als Negativkontrolle verwendet.

Eine anschließende PCR mit entsprechenden Primern zeigte keine Bindung von CRTC1 oder CREB an die Promotoren von *Sphk1* oder *S1pr3* im murinen Herzen (Abbildung 2.26 und 2.27).

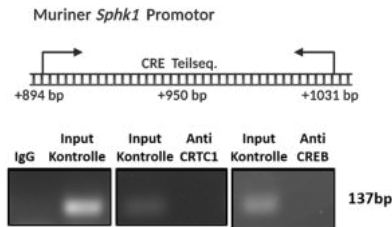


Abbildung 2.26.: Rekrutierung von CRTC1 und CREB an den murinen *Sphk1* Promotor.

An Herzgewebe von Wildtypmäusen wurde eine Chromatin-Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen CRTC1, CREB sowie mit IgG als Negativkontrolle durchgeführt. Die erhaltene DNA wurde mittels PCR und Primern für den *Sphk1* Promotor amplifiziert.

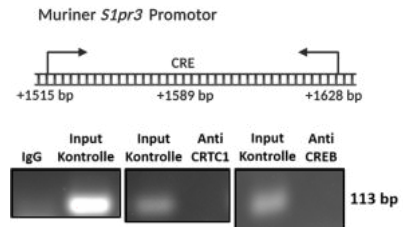


Abbildung 2.27.: Rekrutierung von CRTC1 und CREB an den murinen *S1pr3* Promotor.

An Herzgewebe von Wildtypmäusen wurde eine Chromatin-Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen CRTC1, CREB sowie mit IgG als Negativkontrolle durchgeführt. Die erhaltene DNA wurde mittels PCR und Primern für den *S1pr3* Promotor amplifiziert.

2.4. Kardialer Phänotyp

Crtc1^{-/-} Mäuse wurden von Morhenn et al. [127] bezüglich ihres kardialen Phänotyps untersucht. Ergänzend zur echokardiographischen Auswertung wurde in dieser Arbeit die Kontraktilität und das Ca²⁺-Handling der Kardiomyozyten untersucht. Zudem wurde auch in den für diese Arbeit untersuchten Mauserzen die CRTC Expression sowie phänotypische Marker für eine kardiale Hypertrophie überprüft.

2.4.1. Kontraktilität

Ergänzend zur bereits bekannten eingeschränkten kardialen Funktion [127] wurde die Kontraktilität isolierter Kardiomyozyten von *Crtc1*^{-/-} Mäusen und Wildtypgeschwistertieren im Alter von 13 bis 16 Wochen gemessen. Dies wurde in Kooperation mit der Gruppe von Prof. Christoph Maack (Universitätsklinikum Würzburg, Deutschland) untersucht. Dazu wurden im vorher bereits beschriebenen Stressprotokoll (Kapitel 2.2.3 und siehe auch Beschreibung im Methodenteil, Kapitel 5.2.2) die Sarkomerlänge gemessen und jeweils die diastolische und die systolische Sarkomerlänge sowie die fraktionelle Sarkomerverkürzung, die Zeit bis zur maximalen Sarkomerverkürzung, die Zeit bis zur 50 %igen Sarkomerrelaxation sowie die Zeit bis zur 90 %igen Sarkomerrelaxation errechnet und verglichen. Die Kardiomyozyten von *Crtc1*^{-/-} Mäusen zeigten keine veränderte Kontraktilität im Vergleich zu ihren Wildtypgeschwistertieren. Unter Isoprenalin-einfluss war die Verkürzung der Sarkomere beider Genotypen in gleichem Ausmaß verstärkt (Abbildung 2.28).

Zur Überprüfung der Erholung der Kardiomyozyten nach dem Stressprotokoll oder ob sich Arrhythmien entwickeln, wurde im Anschluss die Anzahl der Kontraktionen gemessen die auf einen Impuls folgen. Sowohl bei den *Crtc1*^{-/-} als auch bei Wildtypmäusen wurde keine arrhythmische Kontraktion festgestellt (Abbildung B.1 im Anhang).

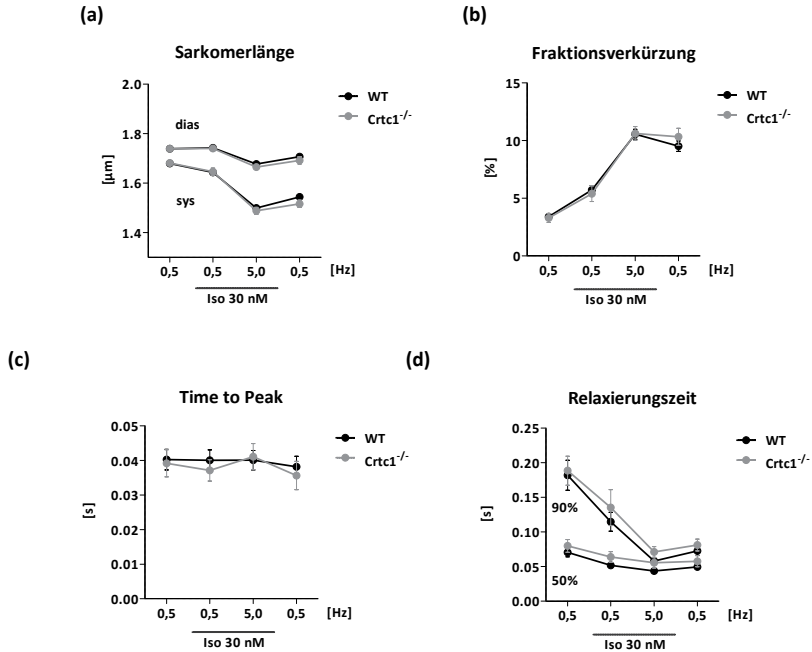


Abbildung 2.28.: Kontraktilität isolierter Kardiomyozyten von *Crtc1*^{-/-} Mäusen.

Kardiomyozyten von *Crtc1*^{-/-} und Wildtypmäusen (WT) zu Beginn unter Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz; anschließend Einwaschen von Isoprenalin (Iso 30 nM); Erhöhung der Frequenz auf 5 Hz und zuletzt Auswaschen von Isoprenalin und Senkung der Frequenz auf 0,5 Hz (Erholungsphase). (a) Diastolische (oben) und systolische (unten) Sarkomerlänge. (b) Fraktionelle Sarkomerverkürzung prozentual des Basalwertes. (c) Zeit bis zur maximalen Sarkomerverkürzung. (d) Zeit bis zur 90 beziehungsweise 50%igen Sarkomerrelaxation. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; Anzahl der Mäuse n=4.

2.4.2. Calcium-Handling

Bei der Entwicklung der hypertrophen Kardiomyopathie (HCM) spielt die diastolische Dysfunktion eine entscheidende Rolle. Sie ist gekennzeichnet durch eine erhöhte myokardiale Aktivierung bei niedrigen diastolischen Ca^{2+} -Konzentrationen [162]. Ein abnormales Ca^{2+} -Handling bei diastolischer Dysfunktion kann durch β -adrenerge Stimulation verschlechtert werden [190].

In Kooperation mit der Gruppe von Prof. Christoph Maack (Universitätsklinikum Würzburg, Deutschland) wurde im Stressprotokoll (siehe Kapitel 2.4.1) die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration mit dem ratiometrischen Farbstoff Indo-1 gemessen. Es wurde die diastolische Ca^{2+} -Konzentration, die systolische Ca^{2+} -Konzentration, sowie die Amplituden der zytosolischen Ca^{2+} -Transienten der Kardiomyozyten beider Gruppen berechnet und verglichen. Zwischen *Crtc1*^{-/-} und Wildtypmäusen wurde kein Unterschied festgestellt (Abbildung 2.29).

Bei einem gestörten Ca^{2+} -Handling scheint insbesondere eine erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie der HCM zu spielen [162]. Das Verhältnis von Sarkomerlänge zu intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration beziehungsweise Fraktionsverkürzung zu Ca^{2+} -Amplitude kann einen Aufschluss über die Reaktivität der Myofilamente bei entsprechender Ca^{2+} -Konzentration geben. *Crtc1*^{-/-} Mäuse zeigen im Vergleich zu ihren Wildtypgeschwistertieren keine veränderte Ca^{2+} -Sensitivität (Abbildung 2.30).

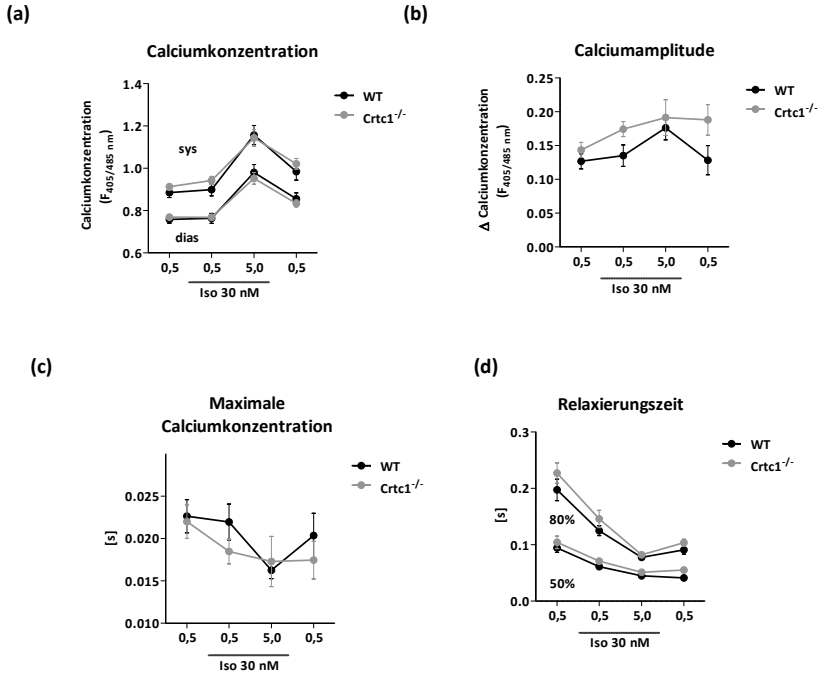


Abbildung 2.29.: Calciumkonzentration in isolierten Kardiomyozyten von *Crtc1*^{-/-} Mäusen. Kardiomyozyten von *Crtc1*^{-/-} und Wildtypmäusen (WT) zu Beginn unter Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz; anschließend Einwaschen von Isoprenalin (Iso 30 nM); Erhöhung der Frequenz auf 5 Hz und zuletzt Auswaschen von Isoprenalin und Senkung der Frequenz auf 0,5 Hz (Erholungsphase). (a) Systolische (oben) und diastolische (unten) Calciumkonzentration. (b) Calciumamplitude (systolische Calciumkonzentration – diastolische Calciumkonzentration). (c) Zeit bis zur 80 beziehungsweise 50 %igen Absenkung der Calciumkonzentration. Dargestellt als Mittelwert ± SEM; Anzahl der Mäuse n=2.

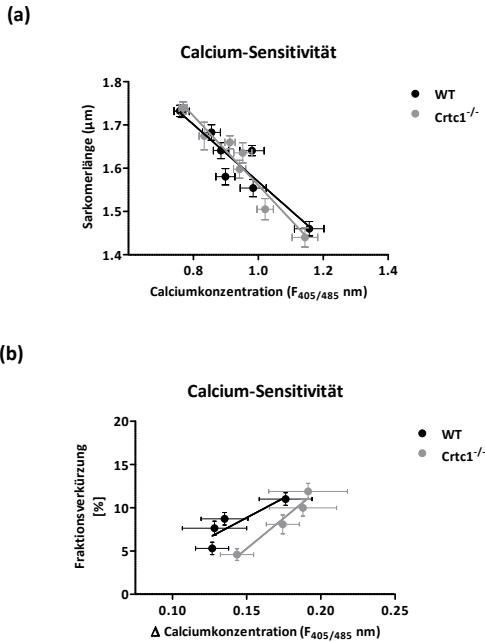


Abbildung 2.30.: Calciumsensitivität isolierter Kardiomyozyten von *Crtc1*^{-/-} Mäusen. Verhältnis von Sarkomerlänge zu intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration beziehungsweise Fraktionsverkürzung zu Ca^{2+} -Amplitude (vgl. Abbildungen 2.28 und 2.29) als Maß für die Calciumsensitivität der Sarkomere von *Crtc1*^{-/-} und Wildtypmäusen (WT). (a) Sarkomerlänge gegen intrazelluläre Calciumkonzentration. (b) Fraktionsverkürzung gegen Calciumamplitude. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; n=2.

2.4.3. Kardiale CRTC Expression

Zur Überprüfung der kardialen CRTC Ausstattung wurde insbesondere die *Crtc* mRNA Expression in Herzen von *Crtc1*^{-/-} und *Mybpc3*^{ki} Mäusen gemessen sowie die CRTC1 und CRTC2 Proteinmenge. In den für diese Arbeit untersuchten Herzen der *Mybpc3*^{ki} Mäuse wurde eine erhöhte Menge an CRTC1 Protein gefunden (Abbildung 2.31).

Bei der Überprüfung der anderen *Crtc* Isoformen in den Herzen der *Mybpc3*^{ki} Mäusen wurde eine erhöhte *Crtc1* und *Crtc3* Menge auf Transkriptionsebene gemessen (Abbildung 2.32). Anders als in vorherigen Ar-

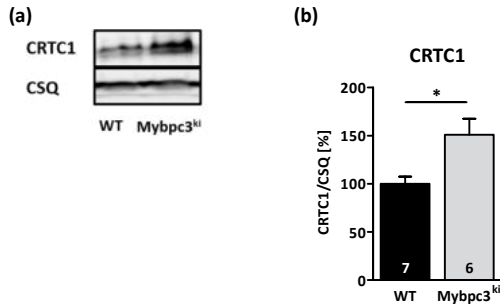


Abbildung 2.31.: CRTC1 Proteinmenge in den Herzen von *Mybpc3^{ki}* Mäusen. CRTC1 Proteinmenge wurde mit einem Antikörper gegen CRTC1 im Immunoblot von Proben der Proteinlysate aus den Herzen von *Mybpc3^{ki}* und Wildtypmäusen (WT) untersucht. (a) Repräsentativer Immunoblot. (b) Quantitative Auswertung bezogen auf die Calsequestrin (CSQ) Menge. Dargestellt als Mittelwert±SEM; * $p < 0,05$; Student t-Test; die Anzahl der Mäuse ist in den Balken angegeben.

beiten wurde in den Herzen von *Crtc1^{-/-}* Mäusen eine erhöhte Menge an *Crtc2* und *Crtc3* auf Transkriptionsebene im Vergleich zu ihren Wildtypgeschwistertieren gemessen (Abbildung 2.33).

Die Proteinmenge von CRTC2 in den Herzen der Mäuse war unverändert (Abbildung 2.34).

Die mRNA Expression von *Crtc2* und *Crtc3* in den Herzen der *Crtc1^{-/-}* Mäuse und ihrer Wildtypgeschwistertiere wurde in Mäusen verschiedenen Alters überprüft um altersabhängige Unterschiede messen zu können (Abbildung 2.35). Bezogen auf die jeweils jüngere Gruppe an Tieren war die *Crtc3* mRNA Expression in den Wildtypmäusen im Alter von 10-13 Wochen erhöht und die *Crtc2* und *Crtc3* mRNA Expression vermindert in den 25-30 Wochen alten Mäusen. Im Alter von 45-52 Wochen war die *Crtc3* Expression erhöht. In den Herzen der *Crtc1^{-/-}* Mäuse bezogen auf die jeweils jüngere Gruppe an Tieren war die *Crtc2* mRNA Expression bei den 25-30 Wochen alten Mäusen vermindert und die *Crtc3* mRNA Expression in den 45-52 Wochen alten Mäusen erhöht. Die *Crtc2* und die *Crtc3* Expression war erhöht in den *Crtc1^{-/-}* Mäusen im Vergleich zu ihren Wildtypgeschwistertieren im Alter von 5-6 Wochen. Im Alter von 45-52 Wo-

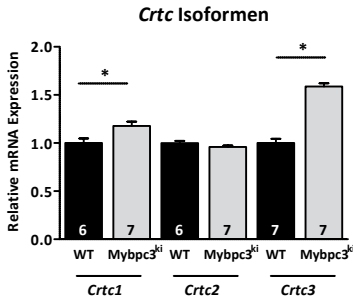


Abbildung 2.32.: Crtc mRNA Expression in den Herzen von Mybpc3^{ki} Mäusen.

Quantitative *Crtc1*, *Crtc2* und *Crtc3* mRNA Expression bezogen auf *Gnas* im Herzgewebe von *Mybpc3^{ki}* Mäusen verglichen mit Wildtypmäusen (WT) wurde mittels RT-qPCR gemessen und mit der $\Delta\Delta Ct$ -Methode berechnet. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$; Student t-Test; die Anzahl der Mäuse ist in den Balken angegeben.

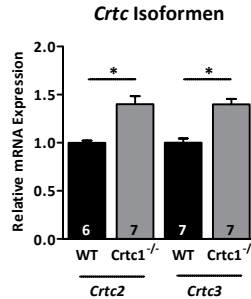


Abbildung 2.33.: Crtc2 und Crtc3 mRNA Expression in den Herzen von Crtc1^{-/-} Mäusen.

Quantitative *Crtc2* und *Crtc3* mRNA Expression bezogen auf *Gnas* im Herzgewebe von *Crtc1^{-/-}* Mäusen verglichen mit ihren Wildtypgeschwistertieren (WT) wurde mittels RT-qPCR gemessen und mit der $\Delta\Delta Ct$ -Methode berechnet. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$; Student t-Test; die Anzahl der Mäuse ist in den Balken angegeben.

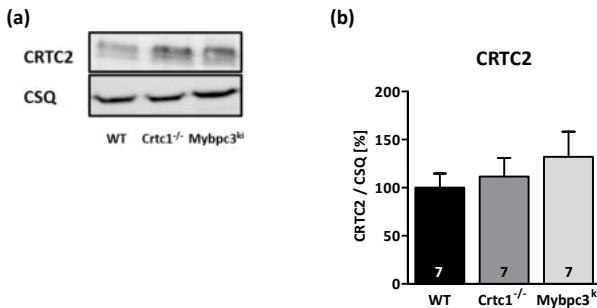


Abbildung 2.34.: CRTC2 Proteinmenge in den Herzen von Crtc1^{-/-} und Mybpc3^{ki} Mäusen.

CRTC2 Proteinmenge wurde mit einem Antikörper gegen CRTC2 im Immunoblot von Proben der Proteinsylate aus den Herzen von *Crtc1^{-/-}*, *Mybpc3^{ki}* und Wildtypmäusen (WT) untersucht. (a) Repräsentativer Immunoblot. (b) Quantitative Auswertung bezogen auf die Calsequestrin (CSQ) Menge. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; die Anzahl der Mäuse ist in den Balken angegeben.

chen war die *Crtc2* Expression in den Herzen der *Crtc1*^{-/-} vermindert im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtypgeschwistertieren.

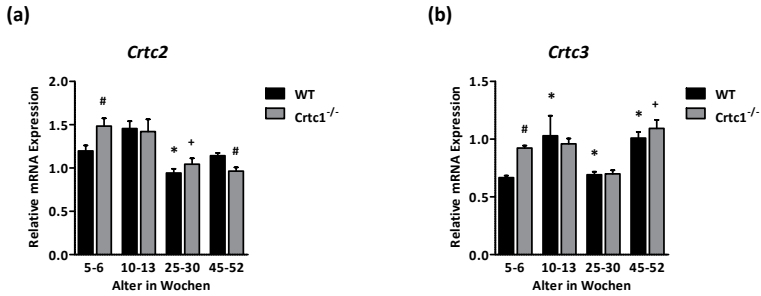


Abbildung 2.35.: *Crtc2* und *Crtc3* mRNA Expression in den Herzen von *Crtc1*^{-/-} und Wildtypmäusen verschiedenen Alters.

Quantitative (a) *Crtc2* und (b) *Crtc3* mRNA Expression bezogen auf *Gnas* im Herzgewebe von *Crtc1*^{-/-} Mäusen verglichen mit ihren Wildtypgeschwistertieren (WT) wurde mittels RT-qPCR gemessen und mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; n=5-8; *p<0,05 vs. jeweils jüngere WT Gruppe; +p<0,05 vs. jeweils jüngere *Crtc1*^{-/-} Gruppe; ANOVA und Bonferroni-Test; #p<0,05 vs. jeweils gleichaltrige WT Gruppe; Student t-Test.

2.4.4. Herz- und Körpergewicht

In dieser Arbeit sollte der Einfluss von CRTC1 auf die Veränderungen des kardialen Stoffwechsels in Mausmodellen mit erhöhter CRTC1 Menge (*Mybpc3*^{ki} Mäuse) mit den Auswirkungen eines totalen CRTC1 Mangels (*Crtc1*^{-/-} Mäuse) verglichen werden. Zur phänotypischen Beschreibung dieser beiden Mausmodelle wurde Körpergewicht, Herzgewicht und Tibiallänge gemessen. Bei 5-6 Wochen alten Mäusen ist eine kardiale Hypertrophie in *Mybpc3*^{ki} Mäusen bereits vorhanden (Abbildung 2.36a und 2.36b). Sie haben zudem ein höheres Körpergewicht als Wildtypmäuse (Abbildung 2.36c). Bei *Crtc1*^{-/-} Mäusen ist dagegen noch keine Hypertrophie messbar durch Vergleich der Koeffizienten aus Herzgewicht zu Körpergewicht beziehungsweise Herzgewicht zu Tibiallänge (Abbildung 2.36a und 2.36b). *Crtc1*^{-/-} Mäuse zeigen kein erhöhtes Körperge-

wicht (Abbildung 2.36c).

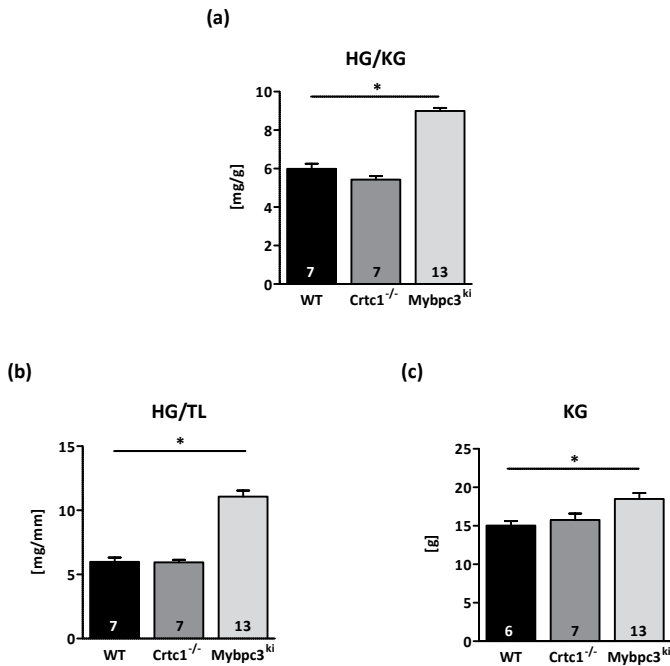


Abbildung 2.36.: Kardiale Hypertrophie von *Crtc1*^{-/-} und *Mybpc3*^{ki} Mäusen.

(a) Herzgewicht (HG) bezogen auf Körpergewicht (KG) beziehungsweise (b) bezogen auf die Tibialänge (TL) und (c) Körpergewicht (KG) von 5-6 Wochen alten *Crtc1*^{-/-} und *Mybpc3*^{ki} Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen (WT) wurde als Maß für eine kardiale Hypertrophie bestimmt. Dargestellt als Mittelwert±SEM; * $p < 0,05$; ANOVA- und Tukey-Test; die Anzahl der Mäuse ist in den Balken angegeben.

Bei der Organentnahme für unter anderem die spätere mRNA- und Proteinextraktion wurden ebenfalls das Körpergewicht, Herzgewicht und die Tibialänge gemessen. So konnte die Hypertrophieentwicklung überprüft werden.

Bei den für diese Arbeit älteren untersuchten Mäusen wurden bei den Koeffizienten für das Maß der kardialen Hypertrophie keine Unterschiede gemessen (Abbildung 2.37).

Andere Arbeitsgruppen beobachteten ein erhöhtes Körpergewicht bei

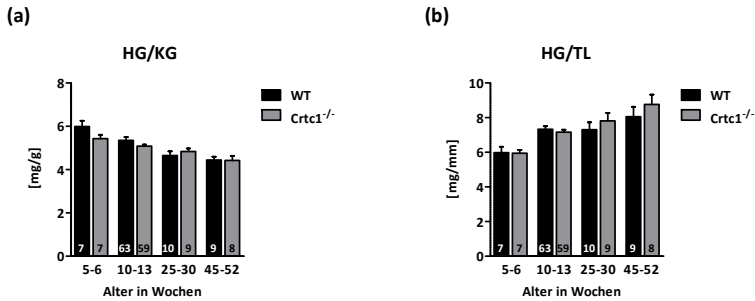


Abbildung 2.37.: Kardiale Hypertrophie von *Crct1*^{-/-} Mäusen verschiedenen Alters. (a) Herzgewicht (HG) bezogen auf Körpergewicht (KG) beziehungsweise (b) bezogen auf die Tibiallänge (TL) von 5-6, 10-13, 25-30 und 45-52 Wochen alten *Crct1*^{-/-} Mäusen und ihren Wildtypgeschwistertieren (WT) wurde als Maß für eine kardiale Hypertrophie bestimmt. Dargestellt als Mittelwert±SEM; die Anzahl der Mäuse ist in den Balken angegeben.

Crct1^{-/-} Mäusen im Vergleich zu ihren Wildtypgeschwistertieren [5] [22] beziehungsweise eine erhöhte Gewichtszunahme [154]. Zur Überprüfung wurden die Körpergewichte der geopferten Mäuse verglichen. Im Vergleich von *Crct1*^{-/-} Mäusen zu ihren gleichaltrigen Wildtypgeschwistertieren wurden keine Unterschiede im Körpergewicht gemessen (Abbildung 2.38a). Auch bei der Überprüfung der Veränderung der Gewichtszunahme (Δ Gewichtszunahme) sind keine Unterschiede erkennbar (Abbildung 2.38b).

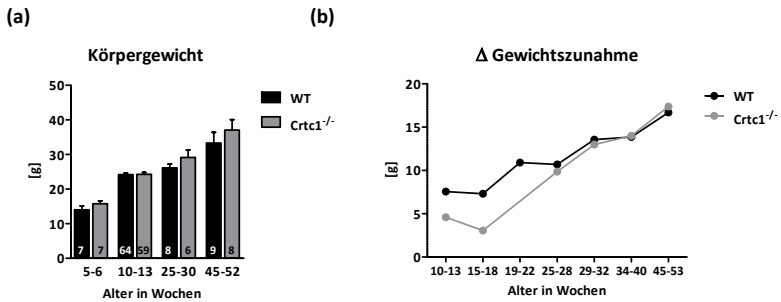


Abbildung 2.38.: Körpergewicht von *Crtc1*^{-/-} Mäusen verschiedenen Alters.

(a) Körpergewicht der *Crtc1*^{-/-} Mäuse und ihrer Wildtypgeschwister (WT). Dargestellt als Mittelwert±SEM; die Anzahl der Mäuse ist in den Balken angegeben. (b) Δ der Gewichtszunahme (Körpergewichtszunahme verglichen mit der jüngsten Gruppe) der *Crtc1*^{-/-} Mäuse und ihrer Wildtypgeschwister (WT). Dargestellt als Mittelwert±SEM; n=5-16.

3. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von CRTC1 im murinen Herzen untersucht. Im Besonderen wurde der Effekt eines CRTC1 Mangels auf den kardialen Stoffwechsel und die Mitochondrienbiogenese bei der Entwicklung einer Hypertrophie untersucht. Global *Crtc1*-defiziente (*Crtc1*^{-/-}) Mäuse wurden mit *Mybpc3* Knock-in (*Mybpc3*^{ki}) Mäusen, die erhöhte CRTC1-Proteinmengen im Herzen zeigen, verglichen. Die hypertrophe Kardiomyopathie der *Mybpc3*^{ki} Mäuse wurde von Nicolas Vignier und Saskia Schlossarek et al. beschrieben [186]. Bei *Crtc1*^{-/-} Mäusen im Alter von 10-13 Wochen fanden Morhenn et al. eine kardiale Hypertrophie, gemessen durch ein erhöhtes Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht sowie Herzgewicht zu Tibialänge [127]. Der transkriptionelle Stoffwechselstatus beider Mauslinien wurde im Alter von 5-6 Wochen verglichen.

Die mRNA Expression von Genen den Metabolismus betreffend war in Herzen von *Crtc1*^{-/-} Mäusen größtenteils unverändert im Vergleich zu ihren Wildtypgeschwistertieren. Die Phosphorylierung der Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) als indirektes Maß für die AMP-abhängige Proteinkinase (AMPK)-Aktivität war in den Herzen von *Crtc1*^{-/-} und *Mybpc3*^{ki} Mäusen nicht unterschiedlich. Den Fettsäurestoffwechsel betrachtend war die Carnitin-Palmitoyltransferase-1b (CPT-1b) Expression erhöht, obwohl CPT-1b unter anderem durch den Peroxisom Proliferator-aktivierten Rezeptor α (PPAR α) induziert wird und die *Ppara* Expression vermindert war, sowohl in *Mybpc3*^{ki} Mäusen im Alter von 5-6 Wochen als auch bei *Crtc1*^{-/-} Mäusen im Alter von 25-30 Wochen. In den Herzen der *Mybpc3*^{ki} Mäuse war die mRNA Expression von Genen den Glucosestoffwechsel betreffend, des Glucosetransporter 4 (GLUT4) und der Pyruvatdehydrogenase Phosphatase (PDP), verringert. Altersabhängig war zu beobachten, dass

die mRNA Expression einiger notwendiger Gene für einen höheren Energieumsatz (AMPK, GLUT4, Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor γ Koaktivator 1- α (PGC-1 α)) sowohl bei *Crtc1*^{-/-} als auch bei Wildtypmäusen im Alter von 10-13 Wochen am höchsten war. Der Sauerstoffverbrauch kardialer Mitochondrien von *Crtc1*^{-/-} Mäusen war im Vergleich zu ihren Wildtypgeschwistertieren unverändert, sowohl unter Citratzyklus-Antrieb als auch Fettsäure getriggert.

Die mRNA Expression von Genen essenziell für die Mitochondrienbiogenese waren in Herzen der *Mybpc3*^{ki} Mäuse verringert. Obwohl CRTC1 an den murinen PGC-1 α Promotor im Herzen rekrutiert wurde, wurde bei *Crtc1*^{-/-} Mäusen keine veränderte mRNA oder Protein Expression von PGC-1 α gemessen. Der mitochondriale Transkriptionsfaktor A (TFAM) wird durch PGC-1 α induziert und die kardiale *Tfam* mRNA Expression war bei *Crtc1*^{-/-} Mäusen erhöht. Die Expression der mitochondrialen NADH-Dehydrogenase 1 (MT-ND1) war in 45-52 Wochen alten *Crtc1*^{-/-} Mäusen vermindert. Marker für *fission* und *fusion* waren unverändert in den Herzen von *Crtc1*^{-/-} und *Mybpc3*^{ki} Mäusen. Die Morphologie der Mitochondrien aus linken Ventrikeln von *Crtc1*^{-/-} Mäusen war unauffällig. Ebenso wurde keine veränderte mitochondriale Funktion festgestellt.

Morhenn et al. stellten bei *Crtc1*^{-/-} Mäusen keine Fibrose bei gleichzeitiger Entwicklung einer kardialen Hypertrophie und Dysfunktion fest [127]. Kardiovaskuläres Remodeling betreffend wurde in einem zweiten Projektteil nach einer Gefäßverletzung von Carotisarterien eine verminderte *Crtc* mRNA Expression in den Carotisarterien gemessen. Untersuchungen zur Regulation des Sphingosin-1-phosphat (S1P)-Systems zeigten eine unveränderte mRNA Expression der S1P-Rezeptoren sowohl in den Herzen als auch in den thorakalen Aorten von *Crtc1*^{-/-} Mäusen verglichen mit ihren Wildtypgeschwistertieren. Im Promotor-Luciferase-Reporter Assay konnte gezeigt werden, dass Forskolin und Calcimycin die CRE-abhängige Gentranskription in HEK Zellen erhöhen. HEK Zellen wurden daraufhin als geeignetes Modell für die Untersuchung der CRE-abhängigen Gentranskription betrachtet. Eine Behandlung mit Calcimycin aktiviert den humanen S1P-Rezeptor 3 Promotor (S1PR3), aber weder CREB

noch CRTC1 wurden in Mausherzen an die Promotoren von S1PR3 oder der Sphingosinkinase 1 (SPHK1) rekrutiert.

Bei der Überprüfung der Kontraktionsfunktion wurde keine veränderte Kontraktilität der Kardiomyozyten von *Crtc1*^{-/-} Mäusen gemessen. Das Ca²⁺-Handling und die Ca²⁺-Sensitivität der *Crtc1*^{-/-} Kardiomyozyten zeigten keine Veränderungen im Vergleich mit Kardiomyozyten der Wildtypgeschwistertiere. Anders als in vorherigen Arbeiten wurde in den Herzen der *Crtc1*^{-/-} Mäuse erhöhte *Crtc2* und *Crtc3* mRNA Expression gemessen. Im Alter von 45 bis 52 Wochen zeigten *Crtc1*^{-/-} Mäuse hingegen eine verminderte *Crtc2* mRNA Expression. In den Herzen von *Mybpc3*^{ki} Mäusen wurden erhöhte CRTC1 Proteinmengen sowie eine erhöhte mRNA Expression gemessen. *Mybpc3*^{ki} Mäuse entwickeln sehr früh eine Hypertrophie während *Crtc1*^{-/-} Mäuse im Alter von 5-6 Wochen noch keine Hypertrophie zeigten. Anders als in einer vorherigen Arbeit wurde hier auch zu späteren Zeitpunkten keine Hypertrophie festgestellt. Die von anderen Gruppen beobachtete stärkere Gewichtszunahme der *Crtc1*^{-/-} Mäuse konnte hier nicht bestätigt werden.

3.1. Kardialer Stoffwechsel

Das Herz ist ein flexibles Omnivor, welches sowohl Fettsäuren als auch Kohlenhydrate zur ATP-Gewinnung verwenden kann, anders als zum Beispiel das Gehirn, welches ausschließlich Glucose als Substrat nutzen kann [29]. Dennoch werden im gesunden, erwachsenen Herzen hauptsächlich Fettsäuren als Substrat und die Sauerstoff-abhängige β -Oxidation zur Energiegewinnung verwendet [90]. In verschiedenen Zuständen des gestressten Herzens, zum Beispiel unter Hypoxie, Ischämie, Hypertrophie oder Atrophie wird eine verstärkte Nutzung anaerober Stoffwechselwege mit Glucose als hauptsächlichem Energielieferanten beobachtet [148]. Dies geht einher mit einer Änderung des Expressionsmusters verschiedener für den Stoffwechsel relevante Gene, zum Teil zurück zu einem fetalen Expressionsmuster [175]. Rajabi et al. zeigen, dass ein transkriptioneller

Regulationsmechanismus an der Re-Induktion eines fetalen Stoffwechselprogramms während verschiedener Krankheitszustände des Myokards beteiligt sein muss [148]. CRTC1 reguliert den Energiestoffwechsel im Gehirn, und es gibt Hinweise auf eine CRTC1-abhängige Regulation des Stoffwechsels in Blut und Fettgewebe [152]. In dieser Arbeit wurde ein möglicher Effekt von CRTC1 auf den kardialen Stoffwechsel und der Einfluss auf die Entwicklung der Hypertrophie untersucht.

Ein möglicher Grund für eine Verschlechterung der Herzfunktion ist das aus dem Energiegleichgewicht gebrachte hypertrophe Herz. Die verminderte Nutzung von Fettsäuren als Energielieferant wird als möglicher Grund für eine verringerte Energiebereitstellung des Herzmuskels und damit als Pathomechanismus in der Entwicklung der Herzinsuffizienz diskutiert. Kurzfristig scheint die Umstellung auf eine anaerobe Glucosebasierte Energiebereitstellung als Reaktion auf zum Beispiel einen Myokardinfarkt schützende Effekte zu haben, möglicherweise durch eine verminderte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und eine moderate Kardiomyozytenproliferation [27]. Bezogen auf den Sauerstoffverbrauch ist die Effizienz der Energiegewinnung größer bei Verwendung von Kohlenhydraten als Substraten als bei der Nutzung von Lipiden [93]. Bei Hypertrophie ist zudem das Verhältnis von Phosphokreatin (PCr) zu ATP verringert, was mit einer schlechteren Prognose verbunden ist [132]. Eine physiologische Herzfunktion ist mit ausgeglichenem Phosphokreatin zu ATP Verhältnis verbunden [94]. Die L-Arginin:Glycin-Amidino-transferase (AGAT) katalysiert den ersten Schritt der Kreatinsynthese. *Agat*-defiziente Mäuse zeigen im Herzen signifikante Unterschiede in der Expression von Genen, die den kardialen Energiestoffwechsel, die kardiale Hypertrophie und Fibrose, die Immunantwort und das Reizleitungssystem des Herzens beeinflussen [75]. Crilley et al. untersuchten energetische Anomalien bei Patienten mit genetischen Mutationen in den Genen für β -Myosin schwere Kette, kardiales Troponin T oder MYBPC3. Die Autoren fanden bei allen Patienten, unabhängig von der jeweiligen Mutation, ein vermindertes PCr/ATP Verhältnis im Herzmuskel; selbst ohne phänotypische Ausbil-

derung einer Hypertrophie [40]. Die Autoren sehen darin eine Bestätigung der Verbindung zwischen verändertem kardialen Energiehaushalt und der Entwicklung der hypertrophen Kardiomyopathie (HCM). Unklar blieb allerdings, ob der Phänotyp sich tatsächlich noch ausprägt. *Crtc1*^{-/-} Mäuse zeigten keine veränderte *Agat* mRNA Expression im Herzen; im Hippocampus von *Crtc1*^{-/-} Mäusen beobachteten Cherix et al. ein verringertes Verhältnis von Phosphokreatin zu Kreatin [35]. Die *Crtc1* Deletion könnte, ähnlich wie andere HCM-auslösende Mutationen, Anomalien im Energiehaushalt hervorrufen die möglicherweise zur phänotypischen Ausbildung einer HCM beitragen.

Eine AMPK-induzierte Phosphorylierung führt zur Retention von CRTAC1 im Zytosol [144]. Die AMPK dient als Energiesensor der Zelle; das Enzym wird aktiviert durch erhöhte AMP-Spiegel und aktiviert verschiedene Stoffwechselwege um die ATP-Synthese zu steigern. Die AMPK ist ein heterotrimeres Protein, bestehend aus je einer α -, β - und γ -Untereinheit. Während die α -Untereinheit die katalytische Untereinheit darstellt und die β -Untereinheit vermutlich regulatorische Funktionen hat, ist die γ -Untereinheit der Ort der AMP-Bindung [197]. Dabei gibt es für jede Untereinheit verschiedene Isoformen, die zum Teil gewebsspezifisch exprimiert werden [172] [179] [36]. Eine konstitutiv aktive AMPK durch Mutationen im Gen der γ 2-Untereinheit verursacht eine Glykogenspeicherkrankheit, die eine HCM imitiert [9]. Roberts et al. schließen daraus, dass sich die Pathogenese und der pathologische Phänotyp bei sarkomerischer und nicht-sarkomerischer HCM unterscheiden, obwohl der Brutto-Herz-Phänotyp ähnlich erscheint [151]. Kim et al. beobachteten ebenfalls eine hypertrophe Kardiomyopathie aufgrund einer γ 2-Mutation, allerdings unabhängig vom Glykogenvorkommen [87]. Bei Mäusen ist die γ 2-Untereinheit stark exprimiert im fetalen Herzen, die Expression nimmt nach der Geburt ab und steigt bei Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz an [88]. Diese Beobachtung stimmt mit der Theorie der Rückkehr zu einem fetalen Expressionsmuster überein. Mutationen im Gen der γ 2-Untereinheit der AMPK treten bei HCM Patienten auf und unterstützen die These, dass HCM-Myokard eine veränderte AMPK-Sensitivität aufweist [101] und dadurch

eine ausreichende Versorgung mit ATP nicht erfolgen kann [19]. Aufgrund der besonderen Relevanz der γ 2-Untereinheit für die Entwicklung der HCM wurde diese für die mRNA-Expressionsuntersuchungen als Ziel ausgewählt. Die mRNA Expression der γ 2-Untereinheit der AMPK (*Prkg2*) war in den Herzen der *Crtc1*^{-/-} und *Mybpc3*^{ki} Mäuse unverändert, während in den Herzen der *Mybpc3*^{ki} Mäuse konsistent mit anderen Studien eine Tendenz zu einer erhöhten AMPK-Aktivität, gemessen als Phosphorylierung von ACC, beobachtet wurde ($p=0,0589$). Möglicherweise könnte eine erhöhte AMPK-Aktivität in den Herzen der *Mybpc3*^{ki} Mäuse vermehrt CRTC1 hemmen und so eine verstärkte CRTC1-Wirkung durch die erhöhte CRTC1 Menge ausgleichen.

Mitochondriale ROS können ebenfalls die AMPK aktivieren, welche durch Phosphorylierung von PGC-1 α eine antioxidative Reaktion auslöst, die die Produktion mitochondrialer ROS begrenzt [146]. Möglicherweise erhält eine AMPK-Aktivierung so nicht nur die Energiehomöostase, sondern verbessert über PGC-1 α auch die Mitochondrienfunktion [189]. Bei beeinträchtigter Glucoseverwertung, zum Beispiel bei diabetischer Kardiomyopathie, scheint die AMPK-Aktivierung für eine Anpassung der Energiegewinnung zu sorgen [84]. Insgesamt könnte die AMPK-Aktivierung im erkrankten Herzen ein Kompensationsmechanismus sein, der vor Energiemangel schützt. Möglich ist gleichzeitig, dass eine dauerhaft erhöhte Fettsäureoxidation bei kardialen Stress, ausgelöst durch die aktive AMPK und die damit verbundene verminderte Glucoseverwertung, auch negative Effekte auf die Entwicklung einer Hypertrophie und die kardiale Funktion haben kann [44].

Bei dem Übergang des kardialen Stoffwechsels von der fetalen zur adulten Form spielt PPAR α eine entscheidende Rolle [104]. Langkettige Fettsäuren binden und aktivieren PPAR α welches die Expression mehrerer Gene reguliert, welche die Fettsäureaufnahme und -oxidation kontrollieren, unter anderen CPT-1b. PPAR α ist außerdem ein Schlüsselfaktor bei der transkriptionellen Regulierung der Substratpräferenz im Herzen [175]. Wie in anderen Untersuchungen zu kardialer Hypertrophie [157] war die *Ppara*

mRNA Expression in Herzen der *Mybpc3^{ki}* Mäuse verringert. Paradoxerweise war aber die *Cpt1b* Expression erhöht. Dies war ebenfalls der Fall bei älteren *Crtc1^{-/-}* Mäusen (25-30 Wochen). Sharma et al. konnten zeigen, dass in diabetischen Rattenherzen die Bindung von PPAR α an den CPT-1b Promotor erhöht war und dadurch ebenfalls die CPT-1b Expression, obwohl die Proteinmenge von PPAR α unverändert war [163]. Die Menge von PPAR α entspricht also nicht zwingend der Aktivität und eine Rekrutierung an den Promotor unabhängig von der totalen Menge könnte die erhöhte *Cpt1b* mRNA Expression in den Herzen der *Crtc1^{-/-}* und *Mybpc3^{ki}* Mäuse erklären. Auch möglich wäre eine PPAR α -unabhängige Steigerung der Transkription durch andere Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) [191]. Während eine verstärkte CPT-1b-Aktivität grundsätzlich die Substratverfügbarkeit für die β -Oxidation erhöht, kann sie abhängig von der HCM-Form negative Auswirkungen auf die Herzfunktion haben. Eine Hemmung der CPT-1b-Aktivität verbessert zum Beispiel die kardiale Funktion bei lipotoxischer Kardiomyopathie in adipösen Mäusen [201].

Im gestressten beziehungsweise erkrankten Myokard sind sowohl Gene für den Fettsäurestoffwechsel als auch für den Glucosestoffwechsel herunterreguliert [148]. Für den aeroben Glucosestoffwechsel und den Übergang von der Glycolyse zum Citratzyklus ist die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase (PDH) notwendig. Sie wird durch die PDP aktiviert. Eine erhöhte PDP-Aktivität führt zu verminderter mitochondrialer Funktion [68]. Da die regulatorische Untereinheit der PDP in einer mRNA-Seq-Analyse der *Crtc1^{-/-}* Mäuse erhöht war (unveröffentlicht), wurde in dieser Arbeit die Expression der *Pdpr* untersucht. Bei 5-6 Wochen alten *Crtc1^{-/-}* Mäusen wurde die im Vergleich zu den Wildtypgeschwistertieren höhere mRNA Expression bestätigt. Bei älteren Mäusen wurden keine Unterschiede festgestellt, lediglich bei den 25-30 Wochen alten *Crtc1^{-/-}* Mäusen war eine Tendenz zu einer erhöhten *Pdpr* Expression erkennbar ($p=0,0587$). Bei Herzinsuffizienz im Endstadium konnten Sheeran et al. eine erhöhte PDH-Aktivität beobachten, ausgelöst durch eine stärkere Expression von PDH-Proteinen und eine verminderte Expression der Pyruvatdehydrogenase

Kinase 4 (PDK4) [164]. Sie vermuten darin eine Erleichterung des Glucosestoffwechsels angesichts anderer versagender bioenergetischer Pfade bei Herzversagen. Diese Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass eine Regulation der PDH-Aktivität eher abhängt von einer verminderten PDK-Aktivität als von einer erhöhten PDP-Aktivität. Der Einfluss von CRTC1 auf die PDP könnte dementsprechend weniger relevant sein als die Regulation der PDK-Aktivität für den Glucosestoffwechsel.

Die Glucoseaufnahme im Herzen wird insbesondere reguliert durch den Insulin-unabhängigen Glucosetransporter GLUT1 und den Insulin-abhängigen Glucosetransporter GLUT4. Die mRNA Menge von *Glut4* sinkt in kranken Herzen verglichen mit gesunden, adulten Herzen auf ein ähnliches Level wie im fetalen Herzen [150]. Für die Expression von *Glut1* gibt es widersprüchliche Veröffentlichungen, die eine gleichbleibende [148] oder ebenfalls verringerte *Glut1* Expression zeigen [150] in erkrankten und fetalen Herzen verglichen mit gesunden, adulten Herzen. Möglicherweise spielt eine unterschiedliche Insulinsensitivität bei der GLUT-Ausstattung eine Rolle. Insulin steigert die Expression von GLUT1, allerdings bleibt der Effekt aus bei erhöhter Glucoseverfügbarkeit [103]. Bei Typ-2-Diabetes, gekennzeichnet durch erhöhte Insulinspiegel und eine periphere Insulinresistenz, ist die GLUT1- und GLUT4-Menge im Herzen reduziert [78]. HCM-Patienten zeigen erhöhte Insulinspiegel und eine Insulinresistenz [128]. Auswirkungen einer sinkenden Insulinsensitivität und eines erhöhten kardialen Energiebedarfs könnten, je nach Stadium, entgegengesetzte oder sich verstärkende Effekte auf die GLUT-Ausstattung haben. Dabei bleibt offen, ob die Entwicklung einer HCM direkten Einfluss auf die GLUT-Ausstattung hat und diese zur Entwicklung eines Typ-2-Diabetes beiträgt oder andersherum. In den Herzen der *Mybpc3^{ki}* Mäuse wurde eine verringerte *Glut4* und eine gleichbleibende *Glut1* Expression gemessen. Bei Herzinsuffizienz wird die kardiale Funktion und der Glucosestoffwechsel verbessert durch die Aktivierung von AMPK und Hochregulierung von GLUT1. Ein *knockdown* von GLUT1 hingegen beeinträchtigt die systolische und diastolische Funktion isolierter Kardiomyozyten [76]. In murinen embryonalen Stammzellen wird die GLUT1 Expression PKA-

abhängig erhöht, durch Bildung des CREB/CBP/CRTC2 Komplexes [89]. Auch in der Sequenz des GLUT4 Promotors gibt es eine CRE-Sequenz, die Expression ist durch CREB aktivierbar [7]. In Adipozyten wird GLUT4 durch CRTC2 und CRTC3 reguliert (CRTC1 wurde nicht untersucht) [67]. Cherix et al. beobachteten im Hippocampus von *Crtc1*^{-/-} Mäusen einen verringerten Glucose-Verbrauch allerdings ohne basale Änderung der *Glut1* oder *Glut4* mRNA Expression. Diese Mäuse zeigen nach 18 Wochen sozialer Isolation eine verringerte mRNA Expression von *Glut4* im Vergleich zu Wildtypmäusen, aber unveränderte *Glut1* und *Glut3* mRNA Mengen [35]. Das Hirn ist glucosepflichtig mit GLUT1 und GLUT3 als vorherrschenden Glucosetransportern [174]. Bei depressivem Verhalten und Fettleibigkeit tritt aber eine verringerte Aktivierung von GLUT4 im Gehirn auf, vermutlich durch eine verminderte Insulin-Sensitivität [60]. Einen ähnlichen Phänotyp beobachten andere Gruppen bei CRTC1-Deletion: depressiv-ähnliches Verhalten, erhöhtes Körpergewicht und eine erhöhte Leptin-Konzentration, Insulin-Resistenz und Glucose-Intoleranz [5] [22] [23] [86] [35]. Trotz der Modulation des peripheren Glucosstoffwechsels durch CRTC1 [85] und Hinweisen auf eine CRTC-abhängige GLUT Regulierung, war die kardiale mRNA Expression von *Glut1* und *Glut4* in *Crtc1*^{-/-} Mäusen unverändert. Ein Ausgleich der Transkriptionsaktivierung durch kompensatorische Hochregulation von CRTC2 oder CRTC3 im Herzen wäre möglich.

In murinen Muskelzellen induzierte eine Überexpression mit CRTC1, CRTC2 oder CRTC3 die basale Zellatmung [192]. Ebenso wurde die mitochondriale Maximalkapazität erhöht. Bei CRTC1 Mangel ist die Zellatmung im Hippocampus nicht verändert [35]. Durch CRTC2 und CRTC3 steigt die β -Oxidationsrate in Muskelzellen, eine CRTC1-Überexpression erhöht die β -Oxidation nicht [192]. Kim et al. beobachteten in der Leber von *Crtc1*^{-/-} Mäusen eine stark beeinträchtigte Fettsäureoxidation [86]. Unabhängig vom Substratangebot war die Zellatmung in den Kardiomyozyten der *Crtc1*^{-/-} Mäuse unverändert im Vergleich mit ihren Wildtypgeschwistertieren. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass eine lokale Wirkung von CRTC1 auf den Stoffwechsel Organ-abhängig ist. Außerdem könnten CRTC2 und CRTC3 einen CRTC1-Mangel ausgleichen, da die Funktionen

sich zum Teil überschneiden oder CRTC2 und CRTC3 sogar größeren Einfluss haben. Im Herzen scheint CRTC1 keine wesentlichen Funktionen für den Stoffwechsel zu regulieren, die nicht von CRTC2 oder CRTC3 kompensiert werden können.

3.2. Mitochondrienphysiologie

Die mitochondriale Biogenese ist ein komplexer Prozess zur Initialisierung der Replikation mitochondrialer DNA (mtDNA) und der Expression mitochondrialer Proteine, die sowohl vom nukleären als auch vom mitochondrialen Genom kodiert werden. Daher spielt die mitochondriale Biogenese eine zentrale Rolle bei der Optimierung der zellulären mitochondrialen Funktion [188]. PGC-1 α wird als ein zentraler Regulator der mitochondrialen Biogenese angesehen [193] [189]. PGC-1 α transaktiviert den nukleären Respirationsfaktor 1 (NRF-1), der seinerseits den mtDNA-Transkriptionsfaktor A (TFAM) aktiviert, der die mtDNA-Transkription und -Replikation reguliert [198] [204]. Eine Überexpression von TFAM in Mäusen mit transversaler Aortenverengung (TAC) reduziert pathologisches kardiales Remodeling durch Hemmung einer Aktivierungskaskade der Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP9) [99]. Bei Herzversagen ist TFAM vermindert [70]. Heterozygote TFAM *knockout*-Tiere haben eine reduzierte mtDNA-Kopienzahl, eine verminderte mitochondriale Transkription und eine Störung der Atmungskette im Herzen [102]. Bei 25-30 Wochen alten *Crtc1*^{-/-} Mäusen war die *Tfam* mRNA Expression verglichen mit ihren Wildtypgeschwistertieren erhöht.

Ratten mit Herzinsuffizienz durch Aortenstenose zeigen keine Änderung des mtDNA-Gehalts, obwohl PGC-1 α und TFAM runterreguliert sind [53]. In TAC Mäusen sind PGC-1 α und durch PGC-1 α regulierte Gene runterreguliert. Bei TAC und gleichzeitigem Fehlen von PGC-1 α ist die Entwicklung der kardialen Dysfunktion beschleunigt [10]. Mäuse mit kardialer PGC-1 α *knockout* entwickeln eine Kardiomyopathie mit Herzdilatation, die zu Herzversagen führt [96]. Bei Patienten mit Herzinsuffizienz beobachteten

Karamanlidis et al. jedoch einen verminderten Gehalt an mtDNA bei erhöhter PGC-1 α -Proteinmenge [80]. Dabei ist zu beachten, dass diese Patienten bereits therapiert wurden und Medikamente erhielten die einen Einfluss auf die PGC-1 α Expression haben können, zum Beispiel Betablocker.

β_1 -adrenerge Signale verringern die PGC-1 α Menge [165]. Eine Hemmung des β_1 -Adrenozeptors andererseits vermindert die Belegung von PGC-1 α an die Promotoren der Zielgene [163]. PGC-1 α wird unter anderem über PKA-CREB-CRTC1 reguliert [139] [178] [198]. Ebenso kann CRTC1 die Transkription von PGC-1 α auch Ca²⁺-abhängig über Calcineurin erhöhen [160] [192]. In Muskelzellen erhöhen auch CRTC2 und CRTC3 die PGC-1 α Expression [192]. In neuronalen Zellen reduziert ein CRTC1 *knockout* PGC-1 α und die mtDNA Menge [30]. Ebenso in *Crtc1*^{-/-} murinen embryonalen Fibroblasten, was zu einer vermehrten mitochondrialen Dysfunktion führt [86]. CREB aktiviert nicht nur die Transkription von PGC-1 α , sondern bindet auch an mitochondriale DNA und reguliert unter anderem Proteine des Komplex I der Atmungskette, insbesondere mt-Nd1 [139]. Ob CRTC1 ebenfalls in die Mitochondrienmatrix und damit an mitochondriale DNA binden kann ist nicht bekannt. Bei HCM-Patienten war die Menge und die Aktivität des Komplex I erhöht [108]. In den meisten Untersuchungen zu Herzversagen bei Tiermodellen war die PGC-1 α mRNA Expression vermindert, in einigen unverändert und bei wenigen humanen Proben erhöht (wobei ein möglicher Medikamenteneinfluss beachtet werden sollte). Bei Untersuchungen zu den mitochondrialen Genen und Genen für Stoffwechselprozesse die von PGC-1 α reguliert werden, waren diese in Menschen vermindert [136]. Wie erwartet, waren Marker für die Mitochondrienbiogenese bei *Mybpc3*^{ki} Mäusen vermindert. Obwohl in vorherigen Arbeiten und auch in dieser bestätigt werden konnte, dass CRTC1 an der Regulierung von PGC-1 α beteiligt ist, wurden in *Crtc1*^{-/-} Mauserzen keine Hinweise auf eine veränderte Expression oder eingeschränkte Mitochondrienbiogenese gefunden. Allerdings zeigte CRTC1 positive wie auch negative Effekte auf die Mitochondrienbiogenese, möglicherweise abhängig vom Gewebe und der

Spezies. Im Herzen sind auch CRTC2 und CRTC3 exprimiert, die ebenfalls an der Regulierung von PGC-1 α beteiligt sind. Es ist nicht auszuschließen, dass es zu einer lokalen Kompensation kommt.

Das Gleichgewicht von *fission* und *fusion* ist entscheidend für die Förderung oder Verhinderung einer Kardiomyozytenhypertrophie [140]. Bei einem Ungleichgewicht kann es zu einer Akkumulation defekter Mitochondrien oder einer erhöhten Mitophagie und dadurch Verlust von Mitochondrien kommen [170]. Zwei wesentliche Mediatoren des Gleichgewichts von mitochondrialer Spaltung und Vereinigung sind DNM1L (DRP1 beim Menschen) und MFN2. Während DRP1 insbesondere die mitochondriale Spaltung (*fission*) reguliert, ist MFN2 beteiligt an der mitochondrialen Vereinigung (*fusion*) und der Aufrechterhaltung des mitochondrialen Netzwerkes. Die mitochondriale Fusion in adulten Kardiomyozyten ist notwendig, um eine normale mitochondriale Morphologie aufrechtzuerhalten und defekte mtDNA mit intakter mtDNA auszutauschen [33]. In verschiedenen Modellen linksventrikulärer Hypertrophie ist MFN2 runterreguliert [45] [62]. Eine Anreicherung von mutierter mtDNA führt zu hypertropher Kardiomyopathie in Mäusen [199]. Um die Akkumulation defekter Mitochondrien zu verhindern muss im ausgewogenen Verhältnis Mitophagie stattfinden. Aber auch bei der Entwicklung des adulten Stoffwechsels ist MFN2-vermittelte Mitophagie notwendig, um fetale Mitochondrien auszutauschen durch adulte Mitochondrien, die eher auf den Fettstoffwechsel spezialisiert sind [61]. Die übermäßige Aktivierung der mitochondrialen Spaltung (durch Aktivierung von DRP1) hat negative Effekte auf die mitochondriale Funktion und die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie [140] [64]. In Zellmodellen mit Phenylephrin-induzierter Kardiomyozytenhypertrophie ist DRP1 hochreguliert [74] [57]. DRP1 hat allerdings auch Funktionen bei der mitochondrialen Atmung, der Bioenergetik und der ROS-Signalisierung in adulten Kardiomyozyten unabhängig von morphologischen Veränderungen [200]. Dies lassen auch Untersuchungen vermuten, bei denen die Vergrößerung oder Verkleinerung der Mitochondrien nicht die Ursache des kardialen Phänotyps war, welcher durch eine ge-

netische Deletion der mitochondrialen *fission* und *fusion* Faktoren hervorgerufen wurde [169]. Song et al. kommen zu dem Schluss, dass eine verminderte mitochondriale Dynamik in Mauserherzen weniger schädlich ist als ein Ungleichgewicht von *fission* und *fusion* [169].

DRP1 wird durch α_1 -adrenerge Signale über Ca^{2+} -Calcineurin aktiviert [140] während MFN2 durch den AMPK-CREB-PGC-1 α -Signalweg reguliert wird [105] [106]. Über beide Signalwege wird auch CRTC1 aktiviert beziehungsweise greift in die Regulierungsmechanismen mit ein. In den hier untersuchten Mäusen gab es keine unterschiedliche Regulation von DRP1 oder MFN2, wobei in *Crtc1*^{-/-} Mäusen eine Tendenz ($p=0,0723$) zu erhöhter *Dnm1l* mRNA Expression erkennbar war, wie in Formen von α_1 -induzierter Hypertrophie [74] [57]. Bei einem Einfluss von CRTC1 in der Aktivierung von DRP1 über Ca^{2+} -Calcineurin würde bei *Crtc1*^{-/-} Mäusen jedoch eine Verminderung von DRP1 erwartet werden.

Eine Veränderung der Morphologie könnte Hinweise liefern auf ein Ungleichgewicht zwischen *fission* und *fusion* oder beitragen zur kardiovaskulären Pathogenese. Bei Herzinsuffizienz und HCM kann es zu morphologischen Veränderungen der Mitochondrien kommen [47] [182], allerdings ist der Zusammenhang zwischen morphologischen Veränderungen und funktionellem Status oder Prognose bei Menschen nicht abschließend geklärt [13]. Nach ischämischen Episoden treten vermehrt kleine, runde Mitochondrien auf [137]. In Rattenherzen nach Myokardinfarkt sahen Campos et al. eine Zunahme des Verhältnisses von Anzahl zu Größe der Mitochondrien und eine Anhäufung von kleineren, kugelförmigeren Mitochondrien bei gleichbleibendem Membranpotential [25]. Einzelne Patienten mit HCM und Mutationen der mitochondrialen DNA weisen eine erhöhte Anzahl von Mitochondrien auf, sowie eine Zunahme ihrer Größe und eine veränderte Morphologie mit konzentrischen und abnormal angeordneten Cristae [11], andere Untersuchungen gehen von einer verringerten Anzahl der Cristae der inneren Mitochondrienmembran (IMM) bei Herzinsuffizienz aus [161]. Bei einer Palmitat-induzierten Kardiomyozytenhypertrophie in neonatalen Ratten fanden Xue et al. gelockerte, fragmentierte und lysierte Cristae. Dies ging einher mit einer Abnah-

me des mitochondrialen Netzwerks und Überproduktion mitochondrialer ROS [194]. Morphologische Veränderungen der Mitochondrien beeinflussen die Protonenleitfähigkeit, was einen Effekt auf die ATP-Synthese und ROS-Produktion haben kann und schließlich das Membranpotential destabilisieren kann [34]. Allerdings ist die Morphologie nicht zwingend verändert bei beeinträchtigter Funktionalität [149].

In *C. elegans* wird durch eine CRT1-Hemmung die Mitochondrienfunktion verbessert, während das mitochondriale Netzwerk in Muskelzellen durch konstitutiv aktives CRT1 fragmentiert [24] [101]. Dies spricht eher für eine negative Wirkung von CRT1 auf die Mitochondrienfunktion. In den linken Ventrikeln der untersuchten *Crtc1*^{-/-} Mäuse zeigen sich Tendenzen zu etwas vergrößerten Mitochondrien, ohne erkennbare veränderte Cristaedichte oder Form. Die *Crtc1*^{-/-} Mäuse wurden in einem Alter untersucht, in dem sie nach vorherigen Untersuchungen eine kardiale Dysfunktion ohne Zeichen einer kardialen Hypertrophie entwickelt hatten [127]. Zusammen mit der Beobachtung, dass die *Tfam* mRNA Expression in den Herzen von *Crtc1*^{-/-} Mäusen erhöht war, könnte dies eher auf eine Mitochondrien-protective Wirkung der *Crtc1*-Deletion hindeuten.

Eine entscheidende Funktion intakter Mitochondrien ist ihre Ca²⁺-Retentionskapazität. Ca²⁺ innerhalb der Mitochondrienmatrix stimuliert die Dehydrogenasen des Citratzyklus und trägt damit zu einer ausgeglichenen Reduktionslage der Kardiomyozyten bei. Ca²⁺ ist auch ein entscheidender Modulator der Mitochondrienpermeabilität. Eine mitochondriale Ca²⁺-Überlastung induziert eine anhaltende Öffnung der *permeability transition pore* (PTP) was zur Apoptose führen kann [16]. Durch die PTP-Öffnung wird die Erhaltung des Membranpotentials erschwert [41] und lokale Veränderungen des Potentials begünstigen Arrhythmien [16]. In versagenden Kardiomyozyten ist der Ca²⁺-Efflux aus der mitochondrialen Matrix beschleunigt [187] und die maximale Aufnahme von Ca²⁺ bis zur Öffnung der PTP, also die Ca²⁺-Retentionskapazität, ist verringert, was zu einer verstärkten ROS-Freisetzung aus den Mitochon-

drien führt [25] [41]. Nicht nur eine Zunahme der ROS-Bildung, sondern auch eine verminderte Fähigkeit der Mitochondrien ROS zu eliminieren, scheint den Überfluss an ROS aus den Mitochondrien bei Herzinsuffizienz zu erklären [187]. Die antioxidative Kapazität der Mitochondrien ist mit der mitochondrialen Ca^{2+} -Regulation verknüpft. Durch die Stimulation der Citratzyklus-Dehydrogenasen werden Reduktionsäquivalente (NADH und FAD) regeneriert. Ist diese Regeneration eingeschränkt, ist das NADH/NAD⁺ beziehungsweise FADH₂/FAD Verhältnis vermindert. Die Oxidation des mitochondrialen Redox-Zustandes beeinträchtigt die Abstimmung zwischen Energieangebot und -nachfrage [115]. Mitochondriale ROS aktivieren die AMPK und lösen damit eine PGC-1 α -abhängige antioxidative Reaktion aus, die die Produktion mitochondrialer ROS begrenzt [146]. Entsprechend der unveränderten Mitochondrienbiogenese und -morphologie zeigten *Crtc1*^{-/-} Mäuse keine veränderte Funktion der kardialen Mitochondrien. Dabei muss beachtet werden, dass C57BL/6-Mäuse von Jackson Laboratories (C57BL/6J) durch eine Funktionsverlustmutation der Nikotinamid-Nukleotid-Transhydrogenase (NNT) vor mitochondrialem oxidativem Stress geschützt sind [134]. Dies könnte ein Grund sein für die Erhaltung der Mitochondrienfunktion trotz der erwarteten Einschränkung durch Einfluss auf PGC-1 α durch den CRT1 Mangel. Allerdings sahen andere Wissenschaftler auch bei C57BL/6J Hintergrund eine mitochondriale Dysfunktion in *Crtc1*^{-/-} murinen embryonalen Fibroblasten [86]. Bei *Crtc1*^{-/-} Mäusen mit C57BL/6N Hintergrund hingegen zeigten Cherix et al. kürzlich ein unverändertes NADH/NAD⁺-Verhältnis im Hippocampus [35]. Die Autoren beobachteten ebenso wie in dieser Arbeit keine basal verminderte PGC-1 α Expression oder veränderte mtDNA Expression. Sie schließen daraus, dass die mitochondriale Aktivität nicht direkt durch die CRT1-Deletion beeinflusst wird. Dies deutet darauf hin, dass die Deletion von CRT1 unstimuliert keinen Effekt auf die Expression von PGC-1 α und seinen Zielgenen hat, obwohl es an den PGC-1 α -Promotor rekrutiert wird. Eine erhöhte *Tfam* mRNA Expression im Herzen, die Tendenzen zu leicht vergrößerten Mitochondrien und einer verbesserten Ca^{2+} -Retentionskapazität der *Crtc1*^{-/-} Mäuse könnten Hinweise

auf eine stabile Mitochondrienfunktion sein. Dies könnte zu einer Verbesserung der kardialen Funktion bei HCM beitragen. Offen bleibt, ob in dem Fall die *Crtc1*-Deletion selbst für den positiven Effekt verantwortlich wäre, wie es in *C. elegans* der Fall ist, oder ob im murinen (und humanen) Herzen eine vorteilhafte Kompensation durch CRTC2 und CRTC3 stattfindet.

3.3. Kardiales Remodeling

Die Entwicklung einer maladaptiven kardialen Hypertrophie geht einher mit der Umwandlung von kardialen Fibroblasten in Myofibroblasten sowie interstitieller Fibrose infolge übermäßiger Produktion von extrazellulärer Matrix [153]. *Crtc1*^{-/-} Mäuse entwickeln keine Fibrose bei kardialer Hypertrophie [127]. Allerdings soll die Funktionsverlustmutation des NNT beim C57BL/6J Stamm vor pathologischem Remodeling schützen [134]. CRTC1 bindet an den *tissue inhibitor of metalloproteinases 4* (TIMP4) Promotor und *Timp4* mRNA ist in den Herzen der *Crtc1*^{-/-} Mäuse vermindert [126]. Unveröffentlichte Ergebnisse der AG Oetjen zeigen, dass nach Isoprenalin-Behandlung die mRNA Expression von *Timp2* in Herzen von Wildtypmäusen erhöht ist, nicht aber bei *Crtc1*^{-/-} Mäusen. CRTC1 greift also möglicherweise in die Regulation des Remodeling ein. TIMPs inhibieren Matrix-Metalloproteinasen (MMP) [177], die zum Gefäßumbau beitragen und beim Umbau von Arterien hochreguliert werden [52]. Kardiales Remodeling ist mit einer Deregulierung der Matrix-Metalloproteinasen verbunden [49]. MMP2 und MMP9, die eine Schlüsselrolle in Umbauprozessen spielen [52], werden TIMP-abhängig durch S1P beziehungsweise SPHK1 gehemmt [120] [195] [12]. S1P ist ein bioaktives Lipid, welches unter anderem essenziell für die Revaskularisierung nach Gefäßverletzungen ist. SPHK1 wird in Läsionen der Atherosklerose exprimiert [83] und ein *S1PR3 knockout* in Mäusen verursacht größere Läsionen nach Carotisarterien-Ligatur [83] [166]. *S1pr3*^{-/-} Mäuse sind vor einer SPHK1-vermittelten Fibrose geschützt [176]. Überexpression von SPHK1 löst eine Kardiomyozytendegeneration und Fibrose aus, hat allerdings nach Myo-

kardinfarkt kardioprotektive Auswirkungen [176] [116]. Takuwa et al. beobachteten zudem erhöhte Werte der Marker für oxidativen Stress und vermuten unter anderem eine verstärkte ROS-Produktion als Auslöser der Fibrose durch SPHK1-Überexpression [176]. Eine Deletion des SPHK1 Gens schützt nicht vor Fibrose, aber vor einer Angiotensin II-induzierten Hypertrophie [167]. Nach S1P-Behandlung zeigen Mäuse eine kardiale Myozytenhypertrophie [20] und die kontinuierliche Verabreichung von S1P bei Ratten wie auch bei Wildtypmäusen führt zu Bluthochdruck, nicht jedoch bei *S1pr3^{-/-}* Mäusen [48]. S1P beeinflusst die Herzmuskelkontraktion, bei Mäusen wurden negativ inotrope und negativ chronotrope Effekte beobachtet [77]. Darüber hinaus verhinderte eine S1P-Behandlung die Entwicklung der TAC-induzierten kardialen Hypertrophie [196]. Andererseits vermindert die Hemmung von S1PR-vermittelten Signalen bei HCM die Ca^{2+} -Reaktivität der Myofilamente und verbessert die diastolische Funktion [155]. Im Allgemeinen werden S1P kardioprotektive Eigenschaften zugeschrieben, da die meisten Studien zeigten, dass S1P die Lebensfähigkeit der Kardiomyozyten verbessert, vor ischämischen Schädigungen schützt und bei Herzinsuffizienz vorteilhaft sein könnte. Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass S1P auch pro-hypertrophe Eigenschaften besitzt [77]. In dieser Arbeit wurden Hinweise auf wechselseitige Regulation von SPHK1 beziehungsweise S1PR3 und CRTC1 beziehungsweise CREB gesucht. Bereits bekannt ist, dass S1P CREB aktiviert [121], welches wiederum selber die SPHK2 reguliert [125]. Während Ca^{2+} den humanen S1PR3 Promotor aktivierte, wurde in dieser Arbeit keine Regulation von *Sphk1* oder *S1pr3* durch CREB oder CRTC1 im murinen Herzen festgestellt. Entsprechend war die mRNA Expression der *S1pr* weder in den Herzen noch in den thorakalen Aorten der *Crtc1^{-/-}* Mäuse verändert. Nach einer Ligation der Arteria carotis war die mRNA Expression aller *Crtc* Isoformen verringert, in Wildtypmäusen ebenso wie in *S1pr3^{-/-}* Mäusen. Die S1P Signalweiterleitung in der Carotisarterie über den S1PR3 scheint also keinen Einfluss auf die *Crtc* Expression zu haben. Dies deutet auf unabhängige Mechanismen bei Gefäßverletzung und Fibroseentwicklung von CRTC1 beziehungsweise S1PR3 hin. Möglicherweise bleibt die Fibroseent-

wicklung bei den hier untersuchten *Crtc1*^{-/-} Mäusen aus, da sie einerseits durch die NNT Mutation vor pathologischem Remodeling und oxidativem Stress geschützt sind und der CRTC1 *knockout* eine S1P-unabhängige TIMP-Hemmung verursacht. Die Senkung der *Crtc* mRNA Expression in Gefäßen nach Ligation wirft die Frage auf, ob CRTC eine aktive Rolle bei der Gefäßreparatur übernimmt oder die Verminderung ein unbeteiligtes Phänomen ist.

3.4. Phänotyp der *Crtc1*^{-/-} Mäuse

Vorherige Arbeiten in der AG Oetjen zeigten in *Crtc1*^{-/-} Mäusen eine konzentrische linksventrikuläre Hypertrophie ohne Fibrose, vermutet durch konstitutiv erhöhte Gα_q Signale durch eine Verminderung des *regulator of G-protein signaling 2* (RGS2) [127]. In anderen Modellen von HCM und Aortenstenose ist die CRTC1-Menge hochreguliert. Morhenn et al. beobachten bei *Crtc1*^{-/-} Mäusen im Alter von 8 bis 9 Wochen bereits eine kardiale Dysfunktion, gekennzeichnet durch verminderte Ejektionsfraktion, *fractional shortening* und Herzzeitvolumen, ohne Zeichen einer kardialen Hypertrophie. Diese wird erst bei Mäusen im Alter von 10 bis 13 Wochen erkennbar, beim Vergleich der Koeffizienten aus Herzgewicht zu Körpergewicht beziehungsweise Tibialänge [127]. Kontraktionsveränderungen, insbesondere diastolische Dysfunktion kann bei genetischer HCM ohne beziehungsweise vor Entwicklung einer Hypertrophie auftreten [119] [107] [130] [129] [124]. Allerdings sahen Morhenn et al. bei isolierten Muskelstreifen der *Crtc1*^{-/-} Mäuse keine unterschiedliche isoprenalininduzierte Kraftentwicklung und keine veränderte Phosphorylierung von Phospholamban (PLN), Troponin I (Tnl) und MYBPC3 durch Isoprenalin in isolierten Kardiomyozyten [127]. Daraus leiteten die Autoren ab, dass das Fehlen von CRTC1 in Kardiomyozyten die Kontraktilität nicht beeinträchtigt, sondern der globale CRTC1-Mangel zur kardialen Dysfunktion beiträgt. Diese Theorie unterstützend zeigten die isolierten Kardiomyozyten von den für diese Arbeit untersuchten

Crtc1^{-/-} Mäusen keine veränderte Kontraktilität. Ebenso wurden keine Hinweise auf ein beeinträchtigtes Ca²⁺-Handling beobachtet. Während *Mybpc3*^{ki} Mäuse die für HCM und Herzinsuffizienz typische erhöhte Ca²⁺-Sensitivität zeigen [50], war die Kopplung von Erregung und Kontraktion, die bei Herzinsuffizienz beeinträchtigt ist [16] [58], in *Crtc1*^{-/-} Mäusen unverändert. Möglicherweise war die zuvor beobachtete kardiale Hypertrophie der *Crtc1*^{-/-} Mäuse eher physiologisch als maladaptiv und damit auch potenziell reversibel. Das könnte erklären warum die *Crtc1*^{-/-} Mäuse keine Fibrose zeigten, welche bei pathologischer Hypertrophie auftritt, nicht aber bei der physiologischen Form.

Vorherigen Untersuchungen entsprechend wurden erhöhte CRTC1 Proteinmengen in den Herzen der *Mybpc3*^{ki} Mäuse gemessen. Allerdings war auch die *Crtc3* mRNA Expression erhöht. In den Herzen von 5-6 Wochen alten *Crtc1*^{-/-} Mäusen war die mRNA Expression von *Crtc2* und *Crtc3* erhöht, anders als vorher und in dieser Arbeit bei älteren Mäusen beobachtet [127]. Die CRTC2 Proteinmenge war unverändert im Vergleich zu Wildtypmäusen. Dennoch bleibt die Frage offen, ob einige erwartete Effekte des CRTC1 Mangels (zum Beispiel die Regulation von PGC-1 α) ausblieben aufgrund einer kompensatorischen Hochregulation von *Crtc2* und *Crtc3*. Auch CRTC2 und CRTC3 erhöhen die PGC-1 α Expression in Muskelzellen [192]. Da CRTC1 eine höhere Affinität zu inhibierenden 14-3-3 Proteinen aufweist als CRTC2 und CRTC3, ist die cAMP-abhängige Induktion von CRTC1 schwächer [171]. CRTC3 ist zudem basal aktiv, da es im Zellkern vorliegt und die CREB-Aktivierung dadurch effektiver verstärken kann als CRTC1 oder CRTC2 [160]. CRTC1 wird am stärksten im Gehirn exprimiert und ist mit dem Energiehaushalt und Stimmungsstörungen assoziiert [6] [23]. CRTC2 fördert die Glucosehomöostase und wird vorwiegend in der Leber exprimiert [92]. CRTC3 wird im weißen und braunen Fettgewebe stark exprimiert und ist an der Energiebilanz beteiligt [39] [6]. Die unterschiedliche Expression und Funktion der Isoformen unterstreichen die Hypothese, dass CRTC1 weniger lokale Wirkungen auf den kardialen Stoffwechsel und Funktion hat, sondern eher periphere Effek-

te durch Wirkung im Gehirn. Kim et al. vermuten periphere Auswirkungen auf die Glucoseaufnahme ins Herz durch CRTG1-vermittelte Leptin-Signale im Gehirn [85]. Altarejos et al. beobachteten in *Crtc1*^{-/-} Mäusen eine erhöhte Leptinkonzentration und Glucose-Intoleranz. Außerdem zeigten sie, dass *Crtc1*^{-/-} Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen hyperphagisch sind, dadurch ein erhöhtes Körpergewicht aufweisen und unfruchtbar sind. Im Vergleich zu den Kontrollen fraßen *Crtc1*^{-/-} Mäuse im Alter von 12-14 Wochen mehr und verbrauchten weniger Energie [5]. Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Weder waren *Crtc1*^{-/-} Mäuse unfruchtbar, noch wurden sie fettleibig. Im Gegenteil, mRNA Expression von Genen für einen höheren Energieumsatz (*Ampk*, *Glut4*, *Pgc-1α*) bei Mäusen im Alter von 10-13 Wochen war erhöht. Allerdings ist nicht klar, welchen exakten genetischen Hintergrund die von Altarejos et al. verwendeten C57BL/6 Mäuse haben. Hwijn Kim beobachtete schon vor einer Gewichtszunahme Glucoseintoleranz und eine Insulin-Resistenz bei *Crtc1*^{-/-} Mäusen mit C57BL/6J Hintergrund [86], die aufgrund der NNT-Funktionsverlustmutation bereits anfälliger für Glukoseintoleranz und die Entwicklung von Diabetes mellitus sind [156] [180]. Allerdings beschrieb er lediglich Symptome von Fettleibigkeit, einschließlich erhöhter Gewichtszunahme (nicht erhöhtes Körpergewicht) und viszeraler Adipositas, ohne die Daten zu zeigen. Da wir kein erhöhtes Körpergewicht bei den *Crtc1*^{-/-} Mäusen mit C57BL/6J Hintergrund im Vergleich zu ihren Wildtypgeschwistertieren sehen, stellt sich die Frage, ob die durch *Crtc1*-Deletion verursachte Adipositas von weiteren Faktoren abhängt, die durch den genetischen Hintergrund auftreten oder ausbleiben können. Breuillaud et al. erzeugten mit derselben Strategie wie Altarejos et al. *Crtc1*^{-/-} Mäuse auf einem C57BL/6N Hintergrund, die fruchtbar sind und ab 16 Wochen Alter ein höheres Körpergewicht haben als ihre Wildtypgeschwistertiere [22]. Im Zeitraum der Anfertigung der vorliegenden Arbeit veröffentlichten Mitarbeiter derselben Arbeitsgruppe Ergebnisse, die geschlechtsabhängige Unterschiede bei der kumulativen Gewichtszunahme zeigen, allerdings ohne das absolute Körpergewicht zu vergleichen [154]. Lu et al. zeigen insbesondere bei Frauen einen Zu-

sammenhang zwischen CRTC1-Polymorphismus und einer Zunahme des Körperfettanteils [112]. Eine weitere Studie zeigte die stärkste Assoziation von CRTC1 Polymorphismen mit der Fettmasse bei prämenopausalen Frauen [37]. In einer anderen Kohorte wurde ein Zusammenhang beobachtet bei Patienten mit einer schweren depressiven Störung zwischen CRTC1-Polymorphismen und einem erhöhten Body-Mass-Index und einer erhöhten Fettmasse, nicht jedoch bei gesunden Patienten [145]. Diese Assoziationen zeigen die Bedeutung von CRTC1 für das Körpergewicht und lässt die These aufstellen, dass ein CRTC1 Mangel basal keine Auswirkungen auf das Körpergewicht hat, jedoch im Zusammenhang mit dem Geschlecht oder Depressionen. Weltweit leiden über 264 Millionen Menschen an Depressionen, Frauen sind stärker betroffen als Männer [73]. Depressionen erhöhen das Risiko für die Entwicklung von Adipositas und andersrum erhöht Adipositas das Risiko einer Depression [113]. Sowohl Depressionen als auch Adipositas erhöhen das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen [1] [141] und kardiovaskuläre Erkrankungen gehen häufig einher mit Adipositas und Depressionen [181].

Zusammengenommen können die Ergebnisse dieser Arbeit die Hypothese, dass CRTC1 an der Regulation des kardialen Stoffwechsels beteiligt sei, nicht bestätigen. Unter unstimulierten Bedingungen scheint eine *Crtc1*-Deletion nicht zwingend einen Effekt zu haben. Zur Ausprägung eines Phänotyps tragen bei Mäusen der weitere genetische Hintergrund und bei Menschen andere Faktoren oder Ko-Morbiditäten dazu bei. Allerdings sind kardiovaskuläre Erkrankungen, Adipositas und Depression miteinander verbunden und veränderte CRTC1-Signale spielen bei diesen Krankheitsbildern eine Rolle. CRTC1 könnte zum schädlichen Zusammenspiel dieser Krankheiten beitragen.

4. Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine Relevanz von CRTC1 bei der Entwicklung von verschiedenen Volkskrankheiten wie Herz-Kreislaufkrankungen und Adipositas hin. Es gibt jedoch keine Anhaltspunkte für weitere Untersuchungen zum Effekt von CRTC1 auf den kardio-myozytären Metabolismus. Eine Überprüfung vorheriger Ergebnisse wie der Entwicklung der Hypertrophie und der kardialen Dysfunktion ergab Unstimmigkeiten. Zuvor wurde die spontane Entwicklung einer Hypertrophie bei globalem *Crtc1* knockout beobachtet. Die einhergehende kardiale Dysfunktion ist ein Zeichen für eine pathologische und damit irreversible Hypertrophie. Das Fehlen einer Fibrose spricht eher für eine physiologische, reversible Hypertrophie. In dieser Arbeit wurde keine spontane Hypertrophie beobachtet. Nähere Untersuchungen zur Hypertrophie-Entwicklung sollten sowohl klären, ob sich durch *Crtc1*-Deletion spontan eine pathologische oder eine physiologische Hypertrophie entwickelt, als auch den Einfluss der Deletion auf die induzierte Entwicklung einer Hypertrophie. Das Modell der transversalen Aortenkonstriktion kann darüber Auskunft geben, ob *Crtc1*^{-/-} Mäuse durch einen Stimulus eine stärkere Hypertrophie entwickeln, CRTC1 also eher positive Effekte auf die kardiale Funktion hat oder eine Hemmung vorteilhaft wäre.

Im Gegensatz zu dieser Methode bietet eine Behandlung mit Angiotensin II den Vorteil, den Hypertrophie-auslösenden Stimulus nur für einen definierten Zeitraum zu applizieren. Dadurch kann nach der Behandlung festgestellt werden, ob die Hypertrophie sich zurückbildet, also reversibel ist, oder pathologisch, falls sie bestehen bleibt. Ein besonderes Augenmerk sollte auf die Fibrose-Entwicklung gelegt werden, da diese sowohl Hinweise liefern kann welche Art der Hypertrophie sich entwickelt als auch

einen möglichen Schutzmechanismus darstellen. Sollte sich keine Fibrose bei einer irreversiblen Hypertrophie entwickeln, sollte dieser Prozess näher untersucht werden. In dieser Arbeit wurde kein Zusammenhang zwischen CRTC1 und dem S1P-System gezeigt, sodass der Fokus weiter auf der direkten Regulation von TIMPs liegen könnte.

Konsistent mit vorherigen Ergebnissen wurden auch in dieser Arbeit nur wenige Effekte der *Crtc1*-Deletion ohne externe Stimulation auf Kardiomyozyten direkt beobachtet. Dennoch wäre eine Untersuchung einer zentralen Auswirkung einer *Crtc1*-Deletion interessant. Vorherige Untersuchungen deuteten bereits einen erhöhten Sympathikotonus an. Erste Untersuchungen von Morhenn et al. zeigen einen erhöhten Blutdruck und eine Steigerung der Herzfrequenz. Das bietet ein interessantes Feld für weitere Untersuchungen.

Diese Arbeit zeigt, dass CRTC nach einer Gefäßverletzung runterreguliert wird. Noch ist nicht klar, welche Bedeutung dies hat, ob zum Beispiel CRTC bei der Angiogenese eine Rolle spielt. Dies ist ein interessanter Punkt für weitere Untersuchungen. Eine Untersuchung der Läsionsgröße nach Ligation der Arteria carotis in *Crtc1*-defizienten Mäusen verglichen mit ihren Wildtypgeschwistertieren könnte erste Hinweise dazu geben. Dabei sollte auch die mRNA Menge von *Crtc2* und *Crtc3* per qPCR untersucht werden, da diese bei Ligation der Arteria carotis in Wildtypmäusen ebenfalls verringert waren. Anschließend wäre es sinnvoll, Schlüsselfaktoren der Angiogenese in *Crtc1*-defizienten Mäusen per qPCR oder Immunoblot zu untersuchen, wie Fibroblast Growth Factor (FGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Platelet Derived Growth Factor (PDGF) und Hypoxie-induzierbarer Faktor (HIF). Sinnvoll wäre eine Differenzierung der verschiedenen Zelltypen bei dieser Untersuchung.

Analysen zu Polymorphismen zeigten Geschlechts-abhängige Unterschiede bei Menschen. Dies deutet daraufhin, dass auch bei tierexperimentellen Untersuchungen auf das Geschlecht geachtet werden sollte.

5. Material und Methoden

5.1. Material

5.1.1. Chemikalien

Tabelle 5.1.: Chemikalien

Stoff	H- und P-Sätze	Hersteller
Acrylamide/Bis-Lösung 37,5:1 30%	H: 302, 312, 315, 317, 319, 340, 350, 361, 372 P: 260, 280, 281, 305+351+338, 405, 501	Bio-Rad, München, Deutschland
Adenosintriphosphat (ATP) Dinatriumsalz	H: / P: /	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agar-Agar, bakteriologisch	H: / P: /	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose, Standard	H: / P: /	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Albumin Fraktion V (BSA)	H: / P: /	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	H: 272, 302, 315, 317, 319, 334, 335 P: 261, 280, 302+352, 305+351+338, 332+313, 337+313	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin-Natriumsalz	H: 317, 334 P: 261, 280, 342+311	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Bromphenolblau	H: / P: /	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Calcimycin A23187	H: 315, 319, 335 P: 261, 264, 280, 302+352, 304+340, 305+351+338, 312, 332+313, 337+313, 362	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Calciumchlorid Dihydrat (CaCl ₂ x H ₂ O)	H: 319 P: 305+351+388	Merck, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	H: 302, 315, 319, 331, 351, 361d, 372 P: 202, 260, 302+352, 304+340, 305+351+338, 308+313	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
cOmplete, Mini, EDTA-freier Protease Inhibitor Cocktail	H: 315, 319 P: 264, 280, 302+352, 332+313, 337+313, 362+364	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Coomassie Brillantblau G 250	H: / P: /	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Desoxycholsäure, Natriumsalz	H: 302 P: 301+312, 330	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	H: / P: /	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
1,4-Dithiothreitol (DTT)	H: 302, 315, 319, 412 P: 264, 270, 273, 280, 337+313, 501	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DNA-Ladefarbstoff (6x)	H: / P: /	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
dNTP Mix, 10 mmol/L	H: / P: /	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Hoch-Glucose</i>	H: / P: /	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) ohne Calcium und Magnesium</i>	H: / P: /	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Essigsäure 100%	H: 226, 290, 314 P: 210, 280, 303+361+353, 305+351+338, 310	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol, absolut	H : 225, 319 P: 210, 240, 305+351+338, 403+233	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol 99%, vergällt	H : 225, 319 P: 210, 240, 305+351+338, 403+233	Th. Geyer, Renningen, Deutschland
Ethidiumbromid	H: 331, 341 P: 261, 280, 304+340, 311, 403+233	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	H: 319 P: 305+351+338	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	H: / P: /	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum (FBS) Superior	H: / P: /	Biochrom, Berlin, Deutschland
Formaldehyd 37%	H: 301+311+331, 314, 317, 335, 341, 350, 370 P: 303+361+353, 304+340, 305+351+338, 308, 310	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

5. Material und Methoden

Forskolin (FSK)	H: 312 P: 280	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
D(+)-Glucose, wasserfrei	H: / P: /	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol	H: / P: /	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	H: / P: /	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycylglycin	H: / P: /	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glykogen 10 µg/µL	H: / P: /	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Hefeextrakt	H: / P: /	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	H: / P: /	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	H: / P: /	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	H: / P: /	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kohlenstoffdioxid (CO ₂)	H: 280 P: 202, 261, 262, 280.3, 410+403	TMG, Krefeld, Deutschland
Lithiumchlorid (LiCl)	H: 302, 315, 319 P: 280, 302+352, 305+351+338	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
D-Luciferin, Kaliumsalz	H: / P: /	Promega, Mannheim, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	H: / P: /	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumsulfat (MgSO ₄ x H ₂ O)	H: / P: /	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Mangandichlorid-Tetrahydrat ($\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$)	H: 302, 318, 373, 411 P: 273, 280, 301+312, 330, 305+351+338, 310, 391, 501	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
2-Mercaptoethanol	H: 301+331, 310, 315, 317, 318, 373, 410 P: 270, 280, 302+352, 330, 304+340, 305+351+338, 310	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Metafectene PRO	H: / P: /	Biontex, München, Deutschland
Methanol	H: 225, 301+311+331, 370 P: 210, 240, 280, 302+352, 304+340, 308, 310, 403+233	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	H: / P: /	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	H: / P: /	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxidlösung 1 mol/L (NaOH)	H: 314 P: 280, 303+361+353, 304+340, 310, 305+351+338	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumlaurylsulfat (SDS)	H: 228, 302+332, 315, 318, 335, 412 P: 210, 261, 280, 302+352, 305+351+338, 312	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	H: 302+312+332 P: 280	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

5. Material und Methoden

Nonidet P40	H: 302, 318, 411 P: 280, 301+312, 305+351+338	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Nuklease-freies dH ₂ O	H: / P: /	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Penicillin/Streptomycin (10,000 U/10 mg/mL)	H: 317, 334, 360, 371 P: 302+352, 304+340, 201, 260, 333+313, 261	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
1,4- Piperazindiethansulfonsäure (PIPES)	H: / P: /	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor	H: 302 P: 264, 270, 301+312, 330, 501	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Ponceau 2R	H: / P: /	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
2-Propanol (Isopropanol)	H: 225, 319, 336 P: 210, 261, 305+351+338	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Protein A-Agarose, schnell fließend 50% (v/v)	H: / P: /	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Proteinase K (20 µg/µL)	H: 334 P: 304+340, 261, 342+311, 284	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Protein A-Sepharose CL-4B	H: / P: /	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Deutschland
Restore PLUS Western Blot Stripping Puffer	H: 290 P: 390, 234	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
RNAprotect Tissue Reagent	H: / P: /	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland

Sphingosin-1-Phosphat	H: / P: /	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Salzsäure (HCl) 1 mol/L	H: 290 P: /	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Stickstoff, flüssig (N ₂)	H: 281 P: 282, 336+315, 403	TMG, Krefeld, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	H: 225, 332, 302, 314 P: 210, 233, 280, 301+330+331, 305+351+338, 308, 310	Merck, Darmstadt, Deutschland
Triton X 100	H: 302, 318, 411 P: 273, 280, 305+351+338	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trizma base (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	H: / P: /	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin-EDTA-Lösung 10X 0.5% Trypsin, 0.2% EDTA	H: / P: /	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypton	H: / P: /	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	H: / P: /	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

5.1.2. Kits

Tabelle 5.2.: Kits

Kit mit H- und P-Sätzen	Hersteller
Amersham ECL Western Blotting Analysis System	GE Healthcare, Little Chalfont, UK

Bradford Protein Assay	BioRad Laboratories, München, Deutschland
FastGene Plasmid Mini Kit	NIPPON Genetics
H: 226, 315, 319, 334	EUROPE GmbH, Düren, Deutschland
P: 210, 261, 280, 304+340, 342+311	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	
H: 360, 351	
P: 201, 202, 308+313, 314, 280	
Hot FirePol DNA Polymerase	SolisBioDyne, Tartu, Estland
KAPA Mouse Genotyping Hot Start Kit	KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA
H: 301, 370	
P: 270, 264, 310, 312, 330	
NucleoBond Xtra Maxi kit for transfection-grade plasmid DNA	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
H: 226, 315, 319, 334	
P: 210, 261, 280, 304+340, 342+311	
Pierce BCA protein assay kit	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
H: 400, 411	
P: 273, 391, 501	
qPCRBIO SyGreen Mix Hi-ROX (2x)	NIPPON Genetics
H: 319	EUROPE GmbH, Düren, Deutschland
RNAzol B	WAK-Chemie Medical GmbH, Steinbach, Deutschland
H: 302, 312+332, 314, 341, 373, 411	
P: 201, 280, 303+361+353, 304+340, 310, 305+351+338, 501	
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
H: 225, 226, 302, 312, 314, 318, 319, 332, 412	
P: 210, 264, 280, 305+351+338+310	

5.1.3. Geräte und Software

Tabelle 5.3.: Geräte

Gerätename	Hersteller
ABI Prism 7900HT sequence detection system	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Bio Rad PowerPac basic	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Bio Rad T100 (Thermocycler)	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Bioruptor Plus sonication device (Ultraschallgerät)	Diagenode, Seraing (Ougrée), Belgien
Centro LB 960 Luminometer	Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland
ChemiDoc Touch Imaging System	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Chirurgische Instrumente	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Digitale Präzisionsschieblehre (0-100 mm)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Eismaschine	Pollin Electronic, Pförring, Deutschland
Eppendorf BioPhotometer	Hoshizaki, Amsterdam, Niederlande
Eppendorf Zentrifuge 5424R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Referenz 2 Pipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Thermomixer comfort 1,5 mL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
EVO 120 Autoklav	Mediatech, Henstedt-Ulzburg, Deutschland
FiveEasy pH FE20	Mettler-Toledo, Giessen, Deutschland

FluoroCount Microplate Fluorometer, Halogen-Lichtquelle, 485 nm, 530 nm	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr, Biberach an der Riß, Deutschland
Gefriertruhe (-80 °C)	Kryotec, Hamburg, Deutschland
GFL Hin- und Her-Schüttler 3006	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
Kühlschrank, 4 °C	Liebherr, Biberach an der Riß, Deutschland
Heraeus Function Line Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Heraeus Heracell Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Heraeus Multifuge X3R Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
HeraSafe Sterilbank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Horizontal gel system	PeqLab Technologies, Erlangen, Deutschland
Innova 4000 Incubator shaker	New Brunswick Scientific, Nürtingen, Deutschland
NanoDrop ND-1000 spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pipettierer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
RCT Basis-Magnetrührer	IKA-Werke GmbH, Staufen im Breisgau, Deutschland
Rotina 35R Zentrifuge	Hetterich, Tuttlingen, Deutschland
RS-TRO5 Rollenmischer	Phoenix Instrument, Garbsen, Deutschland

Sartorius Laborwaage BP 610	Sartorius laboratory, Göttingen, Deutschland
Sartorius Laborwaage MC 210 P	Sartorius laboratory, Göttingen, Deutschland
Ultra-pure water system Milli-Q	Merck-Millipore, Darmstadt, Deutschland
UltraTurrax T8	IKA-Werke GmbH, Staufen im Breisgau, Deutschland
VacuGene Pumpe	Pharmacia fine chemicals, Piscataway, NJ, USA
Wasserbad	GFT, Burgwedel, Deutschland Julabo, Seelbach, Deutschland

Tabelle 5.4.: Software und Online-Tools

Software name	Hersteller
ABI 7900HT SDS 2.4.1 Software	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Benchling	Benchling, Inc., San Francisco, CA, USA
BioRender	BioRender, Toronto, ON, Kanada
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
ImageJ	National Institute of Health, USA
Image Lab 5.2.1 Software	BioRad Laboratories, München, Deutschland

5.1.4. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5.5.: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
10 cm Agar-Platte	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
96-well Platte, weiß	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
384-well Platte, klar	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Bioruptor Microtubes 0,65 mL	Diagenode, Seraing (Ougrée), Belgien
Cellstar 6-well Zellkulturplatte	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar Tube 15 mL	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar Tube 50 mL	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Deckgläser 24 x 60 mm	Assistent, Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim v. d. Rhön, Deutschland
Eppendorf-Reaktionsgefäße 0,2 mL; 0,5 mL; 1,5 mL; 2 mL	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Gel-Ladespitzen, Multiflex 1-200 µL	A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Glasware	Brand, Wertheim, Deutschland Schott, Mainz, Deutschland
Handschuhe, Nitril	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Kanülen 20 G; 27 G; 30 G	Braun, Melsungen, Deutschland
Kunststoffküvetten 1 cm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Low DNA-binding tube	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Manual Phase Lock Gel(R) tubes	5 Prime, Hilden, Deutschland
Nitrocellulose-Membran	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Parafilm	American National Can™, Greenwich, CA, USA
Pipettenspitzen 10 µL; 20 µL; 200 µL; 1 mL	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten 5 mL; 10 mL; 25 mL	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spritzen 2 mL; 5 mL; 10 mL	Braun, Melsungen, Deutschland
Whatmanpapier (Filterpapier)	Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland
Zählkammer Fuchs-Rosenthal	Assistent, Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim v. d. Rhön, Deutschland
Zählkammer Neubauer 0,1 mm; 0,0025 mm ²	Marienfeld Superior, Lauda Königshofen, Deutschland
Zellkulturschalen 15 cm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

5.1.5. Primer

Tabelle 5.6.: Primerpaare

Name	Primersequenz (5'→3')	erwartete Fragmentlänge [bp]
CPT 1b forw	TGTGAGTGACTGGTGGGAAG	194
CPT 1b rev	CCATGACCGGCTTGATCTCT	
Crtc1 forw	AGACAGACAAGACCCTTTCTAAGCA	67
Crtc1 rev	CAGGACTTGGGCCTGGAA	

5. Material und Methoden

Crtc2 forw	GGCCTTCGAGGAGGTGATG	71
Crtc2 rev	TATAAGCCAGTCGCAGTTTTTGG	
Crtc3 forw	ACACCTGTGGGAGAGCAAGG	216
Crtc3 rev	CAAAGAGGTGGTCGCTGGT	
Dnm1l forw	GCCTCAGATCGTCGTAGTGG	192
Dnm1l rev	TTCCATGTGGCAGGGTCATT	
G α_5 forw	CAAGGCTCTGTGGGAGGAT	147
G α_5 rev	CGAAGCAGGTCTGGTCACT	
GLUT1 forw	ATGGATCCCAGCAGCAAGAAGG	157
GLUT1 rev	CGTAGCGGTGGTTCCATGTT	
GLUT4 forw	CAGCGCCTGAGTCTTTTCTTCT	201
GLUT4 rev	GTAGCTCTGTTCAATCACCTTCTG	
Mfn2 forw	ACCAGCTAGAAACTTCTCCTCT	144
Mfn2 rev	CTTGACGGTGACGATGGAGT	
mt-Nd1 forw	TCCGAGCATCTTATCCACGC	134
mt-Nd1 rev	GTATGGTGGTACTCCCGCTG	
Pdpr forw	CCTGAAAATACACAGCCCTCA	166
Pdpr rev	CCCGTGTGCGTCATACTCAT	
PGC-1 α forw	TCTCAGTAAGGGGCTGGTTG	151
PGC-1 α rev	AGCAGCACACTCTATGTCACTC	
PPAR α forw	GTATCTCACGGGAGGCGT	200
PPAR α rev	AGATGGGGCTCTCTGTGTCC	
Prkag2 forw	TTGACCCTATCAGTGGGAACG	129
Prkag2 rev	CGATTCCAAGCTCATCCAGGT	
S1pr1 forw	ATCATGGGCTGGAAGTGCATCA	158
S1pr1 rev	CGAGTCCTGACCAAGGAGTAGAT	
S1pr2 forw	CAGACGCTAGCCCTGCTCAAGA	137
S1pr2 rev	TAGTGGGCTTTGTAGAGGA	
S1pr3 forw	ACAACCGCATGTACTTTTTTCAT	141
S1pr3 rev	TACTGCCCTCCCTGAGGAACCA	

S1pr3 Promotor forw	ATCTGGTCAGTGTCTAGTCTGCC	113
S1pr3 Promotor rev	CAAATGGCTTCGGGGAAATGCT	
Sphk1 Promotor forw	TTCATGATCCGGTCAGGCTGTC	137
Sphk1 Promotor rev	CCCCGACCGAGTTTCTCAGTAT	
Tfam forw	CCCCTCGTCTATCAGTCTTGTGTC	190
Tfam rev	TTCTGGTAGCTCCCTCCACA	

5.1.6. Antikörper

Tabelle 5.7.: Primäre Antikörper

Antikörper	Anwendung	Spezies	Klon	Hersteller
pACC	WB 1:1000	Kaninchen	Polyklonal	Cell Signaling
ACC	WB 1:1000	Kaninchen	Polyklonal	Cell Signaling
Calsequestrin	WB 1:10000	Kaninchen	Polyklonal	Thermo Fisher
CRTC1	WB 1:1000	Kaninchen	Polyklonal	Cell Signaling
CRTC2	WB 1:1000	Kaninchen	Polyklonal	Thermo Fisher
Maus IgG	ChIP	Maus	Polyklonal	Sigma-Aldrich
PGC-1 α	WB 1:6000	Kaninchen	Polyklonal	Santa Cruz
TORC1 (CRTC1)	ChIP	Kaninchen	Monoklonal	Abcam

Tabelle 5.8.: Sekundäre Antikörper, HRP-konjugiert

Antikörper	Anwendung	Spezies	Klon	Hersteller
Anti-Kaninchen	WB: 1:20000	Ziege	Polyklonal	Dianova
Anti-Maus	WB: 1:20000	Schaf	Polyklonal	Dianova

5.1.7. Plasmide

Tabelle 5.9.: Plasmide

Name	Promotor	Referenz
4xSomCRE- Luc GFPTpz	Herpes Simplex Virus-Thymidin Kinase (HSV-TK), -81 bis +58 bp CMV	Oetjen et al., 1994 [135] Canberra-Packard, Dreieich, Deutschland
SPHK1	humane Sphingosin Kinase 1 (SPHK1), -3000 bp	Anelli et al., 2008 [8]
S1PR3	humaner S1P Rezeptor 3 (S1PR3), -1274 bis +158 bp	GeneCopoeia, Rockville, USA

5.1.8. Restriktionsenzyme

Tabelle 5.10.: Restriktionsenzyme

Enzym	Hersteller
Kpn I	Fermentas
Hind III	Thermo Fisher
Nde I	Thermo Fisher
Xba I	Thermo Fisher

5.1.9. DNA- und Proteinmolekulargewichtsmarker

DNA- und Proteinmolekulargewichtsmarker für die DNA-Analyse auf Agarosegelen und für die Proteinanalyse auf SDS-PAGE von Thermo Scientific,

Waltham, MA, USA:

GeneRuler 100 bp DNA Ladder

GeneRuler 1 kb DNA Ladder

GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder

PageRuler Prestained Protein Ladder (10 kDa - 170 kDa)

PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (10 kDa - 250 kDa)

5.1.10. Vorratslösungen

APS 10%

APS 1 g
dH₂O ad 10 mL

SDS 10%

SDS 10 g
dH₂O 100 mL

TRIS 0,5 M

Tris 60,6 g
dH₂O ad 1 L

TRIS 1,5 M

Tris 181,7 g
dH₂O ad 1 L

5.1.11. Zellen

Bakterien

Für die Plasmidamplifikationen wurde der hitzekompetente *Escherichia coli* One Shot Stbl3-Stamm von Invitrogen verwendet.

Zelllinien

Für die Promotor-Luciferase-Reportergen Analysen wurden humane embryonale Nierenzellen (HEK293T) von Cell Biolabs verwendet. Die Zellen wurden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) Hoch-Glucose mit 1% Pe-

nicillin/Streptomycin und 10 % fetalem Rinderserum (FBS) (DMEM Komplettmedium) bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 9 % CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich durch einen 3- bis 5-minütigen Aufschluss mit Trypsin/EDTA bei 37 °C von der Zellkulturschale gelöst. Die Zellen wurden von der Schale entnommen, 3 Minuten lang bei 140 x g zentrifugiert und mit DMEM-Komplettmedium gewaschen. Die Zellen wurden mit einer Dichte von maximal 10.000 Zellen/cm² ausgesät.

5.1.12. Tiermodelle

Alle Untersuchungen mit Versuchstieren wurden unter Einhaltung des Tierschutzgesetzes vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft durchgeführt. Die Mäuse wurden in der Forschungstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gezüchtet und unter Standardkäfigbedingungen in offenen Käfigen bei einem 12-stündigen Dunkel-Licht-Zyklus mit freiem Zugang zu Wasser und Standardfutter (Altromin GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland) bei 20 bis 24 °C und 45 bis 65 % Luftfeuchtigkeit gehalten.

***Crtc1*-defiziente Mäuse**

Global *Crtc1*-defiziente Mäuse (*Crtc1*^{-/-}) wurden in der Gruppe von Dr. Jean-René Cardinaux (Universität Lausanne, Schweiz) erzeugt und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt [22]. *Crtc1*^{-/-} Mäuse wurden in der Forschungstierhaltung des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf auf einem C57BL/6J-Hintergrund gehalten und seit mehreren Generationen in Hamburg gezüchtet. *Crtc1*^{-/-} Mäuse mit C57BL/6N-Hintergrund sind lebensfähig, fruchtbar und entwickeln einen depressiv-ähnlichen und hyperphagischen Phänotyp mit erhöhtem Körpergewicht im Alter von 16 Wochen [22]. Für die Experimente wurden männliche und weibliche *Crtc1*^{-/-} Mäuse und ihre Wildtypgeschwister verwendet.

***Mybpc3* Knock-in Mäuse**

Knock-in Mäuse mit einer humanisierten Punktmutation im *Mybpc3*-Gen (*Mybpc3^{ki}*) wurden in der Gruppe von Prof. Lucie Carrier (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Deutschland) erzeugt und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt [186]. *Mybpc3^{ki}* Mäuse wurden auf einem C57BL/6J-Hintergrund gehalten. *Mybpc3^{ki}* Mäuse zeigen eine Myozyten- und linksventrikuläre Hypertrophie, reduzierte kardiale Funktion und interstitielle Fibrose [186].

***S1pr3*-defiziente Mäuse**

cDNA aus Carotisarterien von *S1pr3*-defizienten Mäusen (*S1pr3^{-/-}*) wurde uns freundlicherweise von Dr. Günter Daum (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Deutschland) zur Verfügung gestellt [91].

5.2. Methoden

Wenn nicht anders angegeben wurde für Experimente autoklaviertes, deionisiertes Wasser (dH₂O) verwendet. Zur Einstellung des pH-Wertes von Puffern und Lösungen wurden 1 mol/L NaOH oder 1 mol/L HCl verwendet.

5.2.1. Tiere

Ligation der Arteria carotis

Die Zucht und Operation der *S1pr3^{-/-}* Mäuse und ihrer Wildtypgeschwister Tiere wurde durch die Arbeitsgruppe von Dr. Günter Daum (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Deutschland) durchgeführt. Die linke Arteria carotis communis wird frei präpariert und in der Nähe der Carotisbifurkation ligiert wie von Kumar und Lindner [98] beschrieben. Jeweils eine Gruppe von 10 Mäusen wird geopfert 4, 7 und 14 Tage nach der Operation. Die rechte Arteria carotis dient als

unoperierter Vergleich. Die mRNA wird in cDNA umgeschrieben und von jeweils 10 Mäusen zur Analyse gepoolt.

Organentnahme

Die Organentnahme für mRNA- und Protein-Analysen wurde von der Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg (ORG 664) genehmigt. Die Mäuse wurden nach einer CO₂-Anästhesie durch eine zervikale Dislokation geopfert und anschließend gewogen. Die Herzen wurden nach medianer Thorakotomie zügig entfernt und in 0,9 %iger NaCl-Lösung gespült, um restliches Blut auszuwaschen. Nach kurzer Trocknung auf Papier wurden die Herzen gewogen, bevor sie in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden. Das Gewebe wurde entweder ganz bei -80 °C gelagert oder mit einem Stahlmörser in flüssigem Stickstoff pulverisiert und bei -80 °C gelagert. Lunge, Leber und Gehirn wurden herausgeschnitten, gewogen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Das Schienbein wurde extrahiert und mit einem digitalen Präzisionsschieber gemessen. Für die Aortenentnahme wurden Mäuse nach CO₂-Anästhesie zur Tötung mindestens 10 Minuten in der CO₂-Kammer zur Beobachtung gelassen. Nach der medianen Thorakotomie wurde die Vena Cava eingeschnitten und die Aorta mit einer stumpfen Kanüle über den linken Ventrikel mit 20 mL eiskalter Ringerlösung gespült. Anschließend wurde das Gewebe um die Aorta entfernt und die thorakale Aorta entnommen. Die Aorta wurde erneut in Ringerlösung gewaschen und über Nacht in 800 µL RNAProtect Tissue Reagent bei Raumtemperatur fixiert. Am nächsten Tag wurde die Aorta bei -80 °C eingefroren und gelagert.

Histologie

Alle Arbeitsschritte für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden im Institut für Neuroanatomie in der Gruppe von Prof. Gabriele M. Rune (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Deutschland) durchgeführt. Zusammen mit Dr. Lepu Zhou wurden die linken Ventrikel der Mäu-

se entnommen und fixiert. Die Mäuse wurden durch CO₂ getötet und zur ersten Fixierung wurde eine Mischung aus 1 % Glutaraldehyd und 1 % Paraformaldehyd verwendet. Die anschließende Einbettung und Kontrastierung wurde von Barbara Holstermann wie bereits beschrieben durchgeführt [185][203]. Ultradünne Schnitte wurden ebenfalls von Barbara Holstermann mit dem Ultramikrotom Leica EM UC7 hergestellt. Untersucht wurden Schnitte von zwei unterschiedlichen Ebenen im Ventrikel. Die Aufnahmen wurden an einem Philips CM 100 von Barbara Holstermann gemacht.

Von jeder Maus wurden von zwei Ebenen im Ventrikel Aufnahmen gemacht. Von jeder Ebene wurden fünf Übersichtsbilder in einer 700fachen Vergrößerung an unterschiedlichen Stellen aufgenommen. Zu jedem Übersichtsbild wurde verblindet eine Nahaufnahme in 3900facher Vergrößerung zur Auswertung ausgewählt. Dabei wurde die Lage der Sarkomere als Kriterium herangezogen. Auf jeder Nahaufnahme wurden zehn Mitochondrien umrandet (links oben beginnend, nur vollständig aufgenommene Mitochondrien) und fünf Sarkomerlängen nachgezeichnet. Alle vollständig abgebildeten Mitochondrien wurden auf den zufällig zur Auswertung ausgewählten Nahaufnahmen gezählt. Die Bilder wurden mit dem Programm ImageJ [3] ausgewertet. Die Mitochondrien wurden umrandet und der Mitochondrienumfang, die Mitochondrienfläche und der Feret Durchmesser von ImageJ berechnet. Die Berechnung $4 \times \pi \times (A \div (2 \times \pi \times r)^2)$ wurde als Maß für die Nähe der Form der Mitochondrien an einen Kreis herangezogen und ebenfalls vom Programm berechnet. Die Cristaedichte wurde als relativer Grauwert innerhalb der umrandeten Mitochondrien bezogen auf den mittleren Grauwert eines Sarkomers derselben Aufnahme bezogen. Die Sarkomerlänge wurde als Linie von Z-Scheibe zu Z-Scheibe gezogen. Aus den Werten wurde je Parameter der Mittelwert pro Maus berechnet und am Ende vier Werte je Genotyp verglichen.

5.2.2. Zellen und Zellorganellen

Alle Experimente an isolierten Kardiomyozyten und Mitochondrien wurden am Universitätsklinikum Würzburg in der Gruppe von Prof. Christoph Maack von den Arbeitsgruppen von Dr. Alexander Nickel und Dr. Michael Kohlhaas durchgeführt wie bereits beschrieben [134].

Myozytenisolation

Kardiomyozyten wurden nach dem *AfCS Procedure Protocol (Isolation of Adult Mouse Cardiac Myocytes from One Heart, AfCS Procedure Protocol PPO0000125 Version 1, 11/05/02)* mithilfe einer Langendorff Perfusionsanlage isoliert.

Jeder Messvorgang an isolierten Kardiomyozyten begann mit einer 0,5 Hz Feldstimulation und sollte die Arbeitslast der Kardiomyozyte unter Ruhebedingungen darstellen. Nach 60 Sekunden wurde Isoprenalin mit einer finalen Konzentration von 30 nM eingewaschen zur β -adrenergen Stimulation der Kardiomyozyte. Sobald eine Zunahme der Kontraktionsamplitude beobachtet werden konnte, wurde die Feldstimulation für 180 Sekunden auf 5 Hz erhöht. Dies simuliert eine physiologische Arbeitslasterhöhung in einer Stresssituation, die Gabe von Isoprenalin steigert die Herzfrequenz auf das gleiche Niveau wie starke körperliche Betätigung. Anschließend wurde die Stimulationsfrequenz auf 0,5 Hz zurückgestellt und Isoprenalin ausgewaschen.

In den isolierten ventrikulären Kardiomyozyten wurden die Autofluoreszenzen von NAD(P)H und FAD^+ , die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration mittels Indo-1, das mitochondriale Membranpotential via TMRM⁺ und die Sarkomerlänge und deren Veränderung gemessen. Die Experimente wurden mit einem Auflichtfluoreszenzmikroskop der Firma Nikon sowie einer Anlage der Firma IonOptix durchgeführt. Dieses System ist in der Lage, während des Messprotokolls die Kontraktionsparameter von elektrisch stimulierten Kardiomyozyten mithilfe einer speziellen Kamera (MyoCam-S) simultan aufzuzeichnen.

Redoxstatus

Der Redoxstatus der Kardiomyozyten wurde über die autofluoreszierenden Moleküle NAD(P)H und FAD bestimmt. Die Absorptionsmaxima von NADH und NADPH sind identisch und liegen im ultravioletten Wellenlängenbereich bei 260 nm und 340 nm. Bei 340 nm zeigen die oxidierten Formen NAD^+ und NADP^+ keine signifikante Absorption. Dabei stammt die Mehrzahl der Fluoreszenzsignale des NAD(P)H kardialer Zellen aus den Mitochondrien und nur ein geringer Teil aus dem Zytosol. Bei dem oxidierten Coenzym FAD liegt ein Absorptionsmaximum bei 450 nm, während sein reduzierter Redoxpartner, FADH_2 in diesem Wellenlängenbereich kaum absorbiert. Das ratiometrische Verhältnis von NAD(P)H/FAD ist ein sensitiver Parameter des Oxidations/Reduktionsstatus, also „Redoxstatus“ der Zelle und verändert sich bei Änderung des metabolischen Zustandes und der Sauerstoffversorgung der Zelle. Durch die Bestimmung lassen sich Rückschlüsse auf die metabolische Aktivität der Zelle ziehen, wobei eine Verschiebung in Richtung Oxidation auf einen erhöhten Umsatz der Reduktionsäquivalente hindeutet.

Kontraktion

Während des gesamten Messprotokolls wurden die Kontraktionen der im Fokus liegenden Kardiomyozyte von der MyoCam-S erfasst. Im Nachhinein konnten so Kontraktionen gemittelt und daraus die folgenden Parameter bestimmt werden: diastolische und systolische Sarkomerlänge, die fraktionelle Sarkomerverkürzung, die Zeit bis zur maximalen Sarkomerverkürzung, die Zeit bis zur 50%igen Sarkomerrelaxation sowie die Zeit bis zur 90%igen Sarkomerrelaxation.

Calciumkonzentration

Zur Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wurde der ratiometrische Fluoreszenzfarbstoff Indo-1, AM verwendet. Indo-1 gehört zu den Ca^{2+} -Indikatoren mit hoher Ca^{2+} -Affinität. Das Absorptionsmaximum

liegt bei 346 nm, ungebundenes Indo-1 hat ein Emissionsmaximum bei 485 nm, durch die Ca^{2+} -Bindung verschiebt sich das Emissionsmaximum auf 410 nm. Um Veränderungen der Ca^{2+} -Konzentration sensitiv messen zu können wurden sowohl die Ca^{2+} -freie und Ca^{2+} -gebundene Form gemessen und zueinander ins Verhältnis gesetzt. Gleichzeitig mit der Messung der Fluoreszenz von Indo-1 wurde auch das mitochondriale Membranpotential beziehungsweise dessen Veränderungen mittels TMRM⁺ gemessen.

Membranpotential

TMRM⁺ ist ein Rhodamin-Fluoreszenzfarbstoff der aufgrund seiner positiven Ladung in den negativ geladenen Mitochondrien akkumuliert. Veränderungen des Membranpotentials wurden mittels TMRM⁺ gleichzeitig mit der Messung der Fluoreszenz von Indo-1 zur Ca^{2+} -Bestimmung gemessen.

Mitochondrienisolation

Kardiale Mitochondrien wurden in den Gruppen von Prof. Christoph Maack nach der Methode von Mela und Seitz [123] isoliert. Die anschließende Proteinbestimmung erfolgte mittels Bio-Rad Dc Protein Assay nach Lowry et al. [111].

Mitochondriale Atmung

Die mitochondriale Atmung wurde als Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien unter Verwendung einer Clark-Elektrode gemessen. Die Clark-Elektrode besteht meist aus einer Platin-Kathode und einer Silber-Anode, die beide von einer semipermeablen Membran bedeckt sind und über eine Elektrolytlösung in Verbindung stehen. Durch angelegte Spannung wird an der Kathode Sauerstoff reduziert und an der Anode Silber oxidiert. Der entstehende Elektronenfluss ist proportional zum Sauerstoffverbrauch und kann mit einem Nanoamperemeter gemessen werden.

Zu Beginn des Versuchs wurde die Respiration von isolierten ventrikulären Mitochondrien bei ausreichend vorhandenem Sauerstoff (O_2) durch die Verfügbarkeit von Substrat und ADP limitiert. Dieser Zustand wird als Stufe 1 bezeichnet. Als nächstes wurden Pyruvat und Malat als Substrate für die Mitochondrien in die Messkammer hinzugefügt und abgewartet, bis sich Stufe 2 etabliert hatte. In Stufe 2 wird die Atmung bei ausreichend O_2 und ADP durch die Verfügbarkeit von Substrat begrenzt. Anschließend erfolgte eine steigende Zugabe von ADP bis zur stabilen Stufe 3. Dabei ist die Elektronentransportkette und die ATP-Produktion an der F_1F_0 -ATPase am Ende der Atmungskette maximal stimuliert, da es keine Begrenzung durch O_2 , ADP oder Substrat mehr gibt. Am Ende des Messprotokolls wurde Oligomycin, ein Hemmstoff der F_1F_0 -ATPase in die Messkammer hinzugefügt. Durch Hemmung der F_1F_0 -ATPase wurde Stufe 4 herbeigeführt. Dies soll den Zustand, in dem die Respiration in Abwesenheit von ADP gemessen wird, simulieren. Stufe 4 ist kein physiologischer Zustand und dient ausschließlich zur Beurteilung der mitochondrialen Integrität. Die Restatmung, auch als *Leak*-Atmung bezeichnet, gibt Aufschluss über die Funktion der inneren Mitochondrienmembran, über die bei defekten Mitochondrien ein Protonenfluss stattfindet und die *Leak*-Atmung verursacht. Bei intakten Mitochondrien nimmt der Sauerstoffverbrauch in Stufe 4 Werte in der Größenordnung der Atmung in Stufe 2 an. Rechnerisch wurde der respiratorische Kontrollindex (RCR) bestimmt, der aus dem Verhältnis von Stufe 3 und Stufe 4 beziehungsweise Stufe 2 gebildet wird und ein weiteres Maß für die Kopplung und korrekte Funktion von Mitochondrien darstellt. Ein kleiner RCR-Wert deutet auf geschädigte Mitochondrien hin.

Calciumretentionskapazität

Zur Messung der Ca^{2+} -Retentionskapazität der isolierten Mitochondrien wurde ein nach Chen et al. [31] adaptierter PTP-Assay durchgeführt. Der Injektor des Messgerätes gab während des Versuchsprotokolls zehnmal Ca^{2+} in einer Endkonzentration von $10 \mu M$ in einem Abstand von jeweils 120 Sekunden ab. Die extramitochondriale Ca^{2+} -Konzentration wurde bei

37 °C mit dem Farbstoff Calcium Green-5N (C3737) gemessen. Cyclosporin A (CsA) inhibiert die PTP und eine Inkubation des Reaktionsansatzes mit CsA diente als Positivkontrolle.

5.2.3. Proteine

Tabelle 5.12.: Puffer und Lösungen für Immunoblot

Lysepuffer

Tris	40 mmol/L	
Glycerol	13 % (v/v)	
EDTA	5 mmol/L	
Na ₃ VO ₄	1 mmol/L	
SDS	4 % (w/v)	
DTT	1 mmol/L	
Protease Inhibitoren	1 x	(frisch vor Gebrauch zugegeben)
Phosphatase Inhibitoren	1 x	(frisch vor Gebrauch zugegeben)
in dH ₂ O		

Ladepuffer

Tris	130 mmol/L
SDS	4 % (w/v)
Bromphenolblau	0,02 % (w/v)
Glycerol	50 % (v/v)
in dH ₂ O	

Laufpuffer

Tris	25 mmol/L
Glycin	192 mmol/L
SDS	3,5 mmol/L
in dH ₂ O	

Transferpuffer

Tris	25 mmol/L
Glycin	192 mmol/L
Methanol	20 % (v/v)
in dH ₂ O	

TBS Puffer

Tris	50 mmol/L
NaCl	150 mmol/L
in dH ₂ O	

TBS-T Puffer

TBS Puffer	99,9 % (v/v)
Tween 20	0,1 % (v/v)

Sammelgel

Acrylamid/Bis 30 %	37,5:1	400 µL
Tris 0,5 mol/L		750 µL
SDS 10 %		30 µL
TEMED		3 µL
APS 10 %		30 µL
dH ₂ O		1,8 mL

Trenngel

		8 %	10 %
Acrylamid/Bis 30 %	37,5:1	1,33 mL	1,67 mL
Tris 1,5 mol/L		1,25 mL	1,25 mL
SDS 10 %		50 µL	50 µL
TEMED		5 µL	5 µL
APS 10 %		50 µL	50 µL
dH ₂ O		2,3 mL	2 mL

Proteinextraktion

Gesamtprotein aus dem Herzgewebe der Mäuse wurde durch Zugabe von 50 bis 500 μL Lysepuffer, abhängig von der Menge des Gewebes, und Homogenisierung mit dem UltraTurrax extrahiert. Proteinlösungen wurden aliquotiert bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

BCA Test

Für die Immunoblot-Analysen wurde der Gesamtproteingehalt mit dem Pierce BCA-Protein-Assay-Kit gemäß den Anweisungen des Herstellers bestimmt. Beim ersten Teil des BCA-Tests wird Cu^{2+} durch die Peptidbindungen der Proteine in einem alkalischen Milieu quantitativ zu Cu^{+} reduziert (basierend auf der Biuret-Reaktion, wie im ersten Teil des Lowry-Test). Zwei Bicinchoninsäuremoleküle bilden durch die Chelatierung von einem Cu^{+} -Ion einen violett gefärbten Komplex. Im Bereich von 20 bis 2000 $\mu\text{L}/\text{mL}$ Protein verläuft die Absorption des Komplexes bei einer Wellenlänge von 562 nm bei zunehmender Proteinkonzentration linear. Das Hintergrundsignal wurde unter Verwendung einer Probe mit Lysepuffer anstelle einer Proteinprobe gemessen.

Immunoblot

Um den Gehalt eines bestimmten Proteins zu quantifizieren, können denaturierte Proteine in einem elektrischen Feld auf einem Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gel nach Größe getrennt werden. SDS überdeckt die eigentliche Ladung des Proteins und es entsteht eine negative Gesamtladung des Proteins, die zur Migration der Proteine zur Anode führt. Größere Proteine migrieren dabei langsamer als kleine Proteine. Nach der Auftrennung nach Größe können die Proteine in einem elektrischen Feld auf eine Membran übertragen und durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Ein primärer Antikörper ist gegen das nachzuweisende Antigen gerichtet, während ein sekundärer Antikörper gegen den ersten Antikörper gerichtet ist. Der sekundäre

5. Material und Methoden

Antikörper ist mit einer Meerrettichperoxidase (HRP, von engl. *horse-radish peroxidase*) konjugiert. Die Zugabe von ECL-Detektionsreagenz (ECL von engl. *enhanced chemiluminescence*) führt zu einem Chemilumineszenzsignal, das mit einer lichtempfindlichen CCD-Kamera (CCD von engl. *charge-coupled device*) detektiert werden kann (Abbildung 5.1).

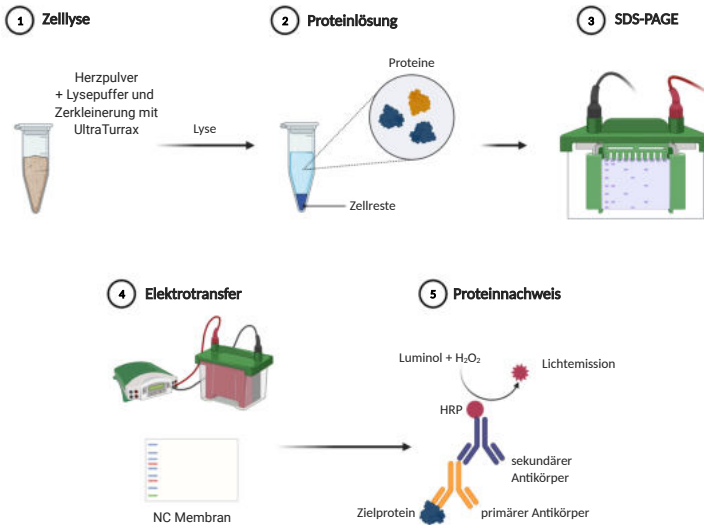


Abbildung 5.1.: Schematische Darstellung und Prinzip des Proteinnachweises per Immunoblot.

Proteine können nach Zellyse per SDS-PAGE nach Größe getrennt und in einem elektrischen Feld auf eine Membran übertragen werden. Der Nachweis geschieht mit einem primären Antikörper der gegen das nachzuweisende Antigen gerichtet ist, während ein sekundärer Antikörper gegen den ersten Antikörper gerichtet ist. Der sekundäre Antikörper ist mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert. Die HRP katalysiert die Reaktion von Luminol mit H₂O₂ unter Lichtemission, die mit einer Kamera gemessen werden kann. Abbildung adaptiert und erstellt mit BioRender [4].

Gleiche Proteinmengen (30 oder 200 µg) wurden mit Lysepuffer auf gleiche Volumina eingestellt. 10 µL Ladepuffer mit frisch hinzugefügten 0,57 µL 2-Mercaptoethanol wurden zugegeben und die Proben zur Denaturierung der Proteine 5 Minuten bei 95 °C erhitzt. Zur Auftrennung wurden abhängig von der Größe des Zielproteins ein 8%- oder 10%iges Polyacrylamidgel in Laufpuffer verwendet (siehe Tabelle 5.13).

Tabelle 5.13.: Antikörper Anwendung für Immunoblot

Antikörper	Proteinmenge	Polyacrylamidgel	Lösung
pACC	30 µg	8%	5 % BSA
ACC	30 µg	8%	5 % BSA
CRTC1	200 µg	10%	5 % BSA
CRTC2	200 µg	10%	5 % Milch
PGC-1α	30 µg	8%	5 % Milch

Die Proteine wurden bei 80 V (Bio Rad PowerPac) bis zum Erreichen des Trenngels, gefolgt von 100 V bis zum Ende des Laufs entsprechend ihrer molekularen Größe aufgetrennt. Zur Größenabschätzung wurde der PageRuler oder der PageRuler Plus-Proteinmolekulargewichtsmarker verwendet. Die Proteine wurden bei 400 mA für 2 Stunden in Transferpuffer auf eine Nitrocellulose (NC)-Membran übertragen. Nach drei 5-10 minütigen Waschschritten mit TBS-Puffer wurde die Membran in 5%iger Milch in TBS-T-Puffer für 2 Stunden bei Raumtemperatur geblockt, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T-Puffer wurde der jeweilige primäre Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde nach drei Waschschritten mit TBS-T-Puffer der entsprechende sekundäre Antikörper für 2 Stunden bei Raumtemperatur aufgetragen, gefolgt von drei Waschschritten mit TBS-T-Puffer. Zur Detektion der Chemilumineszenz wurde das Amersham ECL Western Blotting Analysis System mit dem ChemiDoc Touch (BioRad) den Herstellerangaben entsprechend verwendet. Die Quantifizierung der optischen Dichte der Signale wurde mit der Image Lab 5.2.1 Software durchgeführt. Der quantifizierte Proteingehalt wurde auf Calsequestrin oder das Gesamtprotein als Beladungskontrolle normalisiert. Zur Quantifizierung des Gesamtproteingehalts von ACC nach der Quantifizierung des phosphorylierten Proteins (pACC) wurde der Antikörper durch 3-minütige Inkubation mit 2 mL Restore PLUS Western Blot Stripping Puffer von der Membran entfernt. Die Membran wurde dreimal in TBS-Puffer gewaschen und in 5%iger Milch in TBS-T-Puffer für 2 Stunden geblockt. Nach drei Waschschritten mit TBS-T-Puffer wurde mit dem

primären Antikörper für das Gesamtprotein inkubiert und der Nachweis wie oben beschrieben fortgesetzt.

5.2.4. Nucleinsäuren

RNA Isolierung

RNA wurde mit dem RNAzol B-Kit gemäß den Herstelleranweisungen aus Herzpulver der Mäuse extrahiert. 1 mL RNAzol wurde zu 30 bis 50 mg Herzgewebe gegeben und mit einem UltraTurrax homogenisiert. Die wässrige und die organische Phase wurden durch Zugabe von 0,2 mL Chloroform pro 1 mL RNAzol getrennt. DNA und Proteine blieben in der organischen Phase, während RNA durch Isopropanol aus der wässrigen Phase ausgefällt werden konnte. Nach zwei Waschschrritten mit eiskaltem 75%igem Ethanol wurde die RNA in 15 bis 30 μL nukleasefreiem dH_2O gelöst.

RNA aus Aorten wurde zusammen mit Dr. Markus Geißen in der Arbeitsgruppe von Dr. Günter Daum mit dem RNeasy Mini Kit gemäß den Herstelleranweisungen isoliert.

Bestimmung der RNA Konzentration

RNA-Konzentration, Reinheit und Qualität wurden mit dem NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer bestimmt. Die RNA-Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm und die Annahme, dass 1 Einheit Absorption der RNA 40 $\text{ng}/\mu\text{L}$ entspricht, wurde zur Konzentrationsbestimmung herangezogen. Die Absorption wurde auch bei einer Wellenlänge von 230 nm und 280 nm bestimmt. Je weiter entfernt das Verhältnis von A_{260}/A_{280} von 2 entfernt ist, umso eher könnten noch Proteine oder Phenol vorhanden sein. Das Verhältnis von A_{260}/A_{230} ist ein Maß für die RNA-Reinheit und liegt üblicherweise im Bereich von 1,8 bis 2,2.

Reverse Transkription

RNA wurde mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, welches Zufallsprimer enthält, gemäß den Anweisungen des Herstellers revers-transkribiert. 10 µL Probe mit 0,5 bis 1 µg Gesamt-RNA wurde mit einer gleichen Menge 10x RT-Mastermix gemischt. Die Reverse Transkription wurde bei 25 °C für 10 Minuten, 37 °C für 120 Minuten und 85 °C für 5 Minuten durchgeführt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Quantitative PCR

Die quantitative PCR (qPCR) wurde auf dem ABI Prism 7900HT Sequenzdetektionssystem unter Verwendung des 2x qPCR BIO SyGreen Mix Hi-ROX Kits gemäß den Herstelleranweisungen durchgeführt. Das Fluoreszenzsignal des DNA-Doppelstrang (dsDNA) interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs steigt proportional zur cDNA-Konzentration. Der passive ROX-Referenzfarbstoff dient als interne Referenz zur Normalisierung des SYBR-Fluoreszenzsignals (Abbildung 5.2).

cDNA aus revers transkribierter RNA wurde in dH₂O verdünnt und mit den in Tabelle 5.6 angegebenen Primerpaaren amplifiziert. Für jede Probe wurden Triplikate gemessen. Das verwendete PCR-Programm ist in Tabelle 5.14 aufgeführt.

5. Material und Methoden

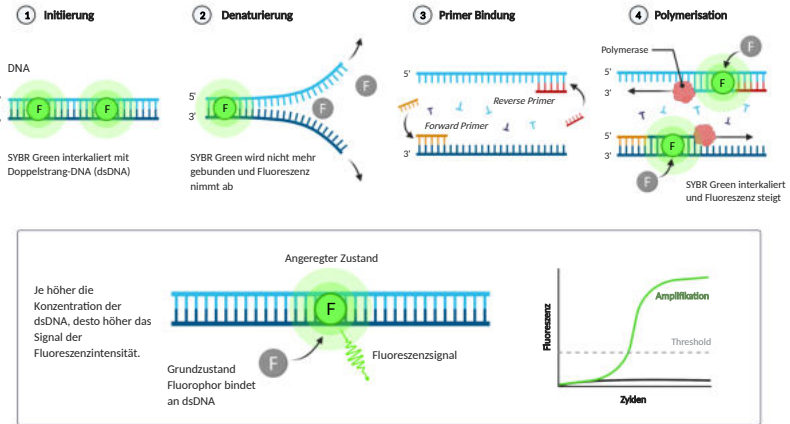


Abbildung 5.2.: Schematische Darstellung und Prinzip der quantitativen PCR mit Fluoreszenzfarbstoff. Das Fluoreszenzsignal des DNA-Doppelstrang (dsDNA) interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green wird höher, je höher die Konzentration von doppelsträngiger, amplifizierter DNA ist. Abbildung adaptiert und erstellt mit BioRender [4].

Tabelle 5.14.: Programm für qPCR

Temperatur	Zeit
95 °C	2 Minuten
40 Zyklen:	
95 °C	5 Sekunden
65 °C	15 Sekunden
95 °C	15 Sekunden
Dissoziationskurve:	
60 °C	1 Minute
95 °C	15 Sekunden

Bei jedem Experiment wurde eine Dissoziationskurvenanalyse durchgeführt um Nebenprodukte (zum Beispiel Primer-Dimere) zu detektieren. Darüber hinaus wurden die Proben nach der qPCR auf einem Agarosegel mit 0,04 % Ethidiumbromid untersucht, um mögliche Nebenprodukte der

Amplifikation nachzuweisen. Normalisiert wurde auf die endogene Kontrolle α_s ; eine Leer-Kontrolle ohne cDNA und eine Kontrolle ohne Reverse Transkriptase-Schritt, bei der das RT-Enzym fehlte, wurden in alle Versuchsläufe einbezogen. Zur Auswertung der relativen mRNA-Expression wurde der Ct-Wert (Ct von engl. *cycle threshold*, der Zyklus ab dem das Fluoreszenzsignal den definierten Schwellenwert übersteigt und den Beginn der exponentiellen Fluoreszenz-Zunahme anzeigt) mit der Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$ verwendet. Für die Berechnungen wurde der mittlere Ct-Wert der Triplet-Messungen gebildet. ΔCt wurde durch Subtraktion des mittleren Ct-Wertes des endogenen Kontrollgens vom mittleren Ct-Wert des zu untersuchenden Gens erhalten. $\Delta\Delta Ct$ wurde erhalten, indem der Mittelwert von ΔCt aus der Referenzgruppe berechnet und vom ΔCt Wert jeder Probe subtrahiert wurde. Unter der Annahme, dass sich die Amplikonkonzentration bei jedem Zyklus verdoppelt, liefert die Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$ die relative Menge an mRNA in jeder Probe, bezogen auf die Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde. Vor der Anwendung wurde die Effizienz des Primerpaares getestet. Fünf 1:5-Schritt-Verdünnungen von anfänglich 500 ng cDNA wurden mit einer Primerkonzentration von 400 nmol/L amplifiziert. Primer mit einer Effizienz von mehr als 90 % und weniger als 110 % und einem Korrelationskoeffizienten (R^2) von mehr als 0,95 wurden für den experimentellen Einsatz verwendet. Die Analyse wurde mit der Software ABI 7900HT SDS 2.4 durchgeführt.

Genotypisierung

Um zwischen $Crtc1^{-/-}$, Wildtyp- und heterozygoten Mäusen zu unterscheiden, wurde die DNA von Schwanzspitzen mittels PCR analysiert.

Um die DNA aus dem Gewebe zu extrahieren, wurde das KAPA Mouse Genotyping Hot Start Kit gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet. Das Gewebe wurde mit KAPA Express Extraktions-Enzym und KAPA Express-Extraktions-Puffer bei 75 °C für 10 Minuten verdaut; das Verdauungsenzym wurde bei 95 °C für 5 Minuten inaktiviert. Die PCR-Proben wurden unter Verwendung der folgenden Komponenten pro Reaktion mit

den in der Tabelle 5.16 aufgeführten Primern verwendet:

DNA aus Verdau	1 µL
KAPA2G Fast Genotyping Mix	12,5 µL
dH ₂ O	9,875 µL
DMSO	1,25 µL
Primer a „Intron 4-5 gen new“ 100 mmol/L	0,125 µL
Primer b „TORC1 Exon 5-3“ 100 mmol/L	0,125 µL
Primer c „GT-Beta-gal“ 100 mmol/L	0,125 µL

Tabelle 5.16.: Primer für Genotypisierung

Name	Primersequenz (5'→3')
Primer a „Intron 4-5 gen new“	GGCAGTACATAGCTTCTCTGGTGA
Primer b „TORC1 Exon 5-3“	TGCAGGGCAGAGTCAGACTTGGT
Primer c „GT-Beta-gal“	GACAGTATCGGCCTCAGGAAGATCG

Die PCR wurde im Bio Rad T100 Thermocycler unter Verwendung des in Tabelle 5.17 aufgeführten Programms durchgeführt.

Tabelle 5.17.: Programm für Genotypisierung

Temperatur	Zeit
94 °C	3 Minuten
11 Zyklen:	
94 °C	15 Sekunden
65 °C	15 Sekunden
-0,5 °C/Zyklus	
72 °C	30 Sekunden
24 Zyklen:	
94 °C	15 Sekunden
60 °C	15 Sekunden

72 °C	30 Sekunden
72 °C	10 Minuten

Die PCR-Produkte wurden in einem elektrischen Feld auf einem 1%igen Agarosegel mit 0,04 % Ethidiumbromid nach Größe getrennt. Als Molekulargewichtsmarker wurde der GeneRuler 1 kb DNA Ladder verwendet. Die Primer a „Intron 4-5 gen new“ und b „TORC1 Exon 5-3““ amplifizieren ein 670 bp Fragment aus dem Wildtyp-Allel, die Primer a „Intron 4-5 gen new“ und c „GT-Beta-gal“ amplifizieren ein 1197 bp Fragment aus dem *Crtc1*-defizienten Allel. Bei heterozygoten Mäusen werden beide Fragmente amplifiziert.

Herstellung Plasmid DNA

Tabelle 5.18.: Puffer und Lösungen für Herstellung Plasmid DNA

Transformationspuffer

MnCl ₂ x 4 H ₂ O	55 mmol/L
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	15 mmol/L
KCl	250 mmol/L
PIPES	10 mmol/L
in dH ₂ O	

SOB Medium

Trypton	2 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	8,56 mmol/L
KCl	2,5 mmol/L
MgCl ₂	10 mmol/L
in dH ₂ O	

SOC Medium

D-Glucose	20 mmol/L
-----------	-----------

MgSO ₄	10 mmol/L
in SOB	

LB Medium

NaCl	85,6 mmol/L
Trypton	1 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
in dH ₂ O	

TE Puffer

Tris	10 mmol/L
EDTA	1 mmol/L
in dH ₂ O	

E. coli One Shot Stbl3 wurden in 25 mL SOB-Medium bei 37 °C für 6 bis 8 Stunden unter ständigem Schütteln inkubiert. Von dieser Kultur wurden jeweils 2 mL, 4 mL und 10 mL mit 250 mL SOB-Medium gemischt und über Nacht bei 18 °C unter ständigem Schütteln bebrütet. Bei Erreichen einer maximalen optischen Dichte von 0,6 A₆₀₀ Einheiten/mL wurde die Kultur weiter verwendet. Die Lösung wurde 10 Minuten lang auf Eis gekühlt, bevor sie 10 Minuten lang bei 1000 x g bei 4 °C zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde in 20 mL eiskaltem Transformationspuffer und 1,5 mL DMSO resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis aufbewahrt. Die Bakterienlösung wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Für die Transformation wurden die chemisch kompetenten *E. coli* auf Eis aufgetaut und mit der Plasmid-DNA gemischt. 30 Minuten Inkubation auf Eis führen zu einer Aufnahme der DNA in die Bakterien. Ein Hitzeschock von 90 Sekunden bei 42 °C erhöht die Effizienz. Die Mischung wurde 60 bis 120 Sekunden auf Eis gehalten, bevor 500 µL SOC-Medium hinzugefügt wurden. Anschließend wurde 45 Minuten lang bei 37 °C erhitzt, damit die Bakterien mit dem aufgenommenen Plasmid das erhaltene Antibiotika-

resistenzgen exprimieren konnten. Nach Zentrifugation bei 1000 x g für 1 Minute bei Raumtemperatur wurde der Überstand durch leichtes Kippen bis auf etwa 100 µL verworfen. Das Pellet wurde im verbleibenden Überstand resuspendiert, auf eine Ampicillin- oder Kanamycin-haltige Agarplatte (50 µg/mL) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Ein isoliert gewachsener Klon wurde geerntet und in 3 mL LB-Medium mit 0,1% Ampicillin oder Kanamycin in einem 15 mL-Reaktionsröhrchen bei 22 °C unter leichter Bewegung über Nacht kultiviert, bis eine Dichte von 2 bis 6 A₆₀₀ Einheiten/mL erreicht war.

Mini-Präparationen wurde mit dem FastGene Plasmid Mini Kit entsprechend den Herstelleranweisungen durchgeführt. Pelletierte Bakterien wurden in 200 µL Resuspensionspuffer gevortext, 200 µL Lysepuffer hinzugefügt und für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 300 µL Neutralisationspuffer wurde zugegeben, vorsichtig gemischt und anschließend 2 Minuten bei 13.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Filtrerröhrchen überführt und bei 13.000 x g für 30 Sekunden zentrifugiert. 400 µL Waschpuffer I wurden hinzugefügt, erneut zentrifugiert und 600 µL Waschpuffer II hinzugefügt. Nach 2 Minuten Zentrifugation wurden 30 µL Elutionspuffer hinzugefügt und der Filter für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zentrifugation bei 13.000 x g für 2 Minuten wurde das eluierte Plasmid bei -20 °C gelagert.

Maxi-Präparationen wurden mit dem NucleoBond Xtra Maxi Kit gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Pelletierte Bakterien wurden in 18 mL Resuspensionspuffer aufgenommen, 18 mL Lysepuffer hinzugefügt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 12 mL Neutralisationspuffer wurden zugegeben und vorsichtig gemischt bis zur Entfärbung der Mischung. Das Lysat wurde auf einen vorher äquilibrierten NucleoBond Xtra Column Filter gegeben. Nach dem Hinzufügen von 15 mL Äquilibrierungspuffer wurde der Filter verworfen und die Säule mit 25 mL Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde das Plasmid mit 15 mL Elutionspuffer von der Säule eluiert. Zur Ausfällung wurden 10,5 mL Isopropanol zugegeben und die Probe bei 15.000 x g für 30 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das Plasmid-DNA-Pellet wurde mit 4 mL 70 %igem Ethanol ge-

waschen und nach Zentrifugation in 100 μ L TE-Puffer resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

Bestimmung der DNA Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde mit dem NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer unter der Annahme, dass 1 Einheit Absorption 50 ng/ μ L DNA entsprechen, bestimmt. Die DNA-Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen.

Restriktionsenzymverdau

Zur Bestätigung der korrekten Insertion der Konstrukt-DNA wurde die Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen in dem mitgelieferten Puffer nach Herstellerangaben verdaut. Die DNA wurde mit Enzymen für 2 Stunden bei 37 °C verdaut. SPHK1-Promotor-Plasmide wurden mit Kpn I und Hind III verdaut. S1PR3-Promotor-Plasmide wurden mit Nde I und Xba I verdaut. Die DNA wurde mit DNA-Ladefarbstoff gemischt und nach Größe auf einem 1%igen Agarosegel mit 0,04% Ethidiumbromid getrennt. Zur Größenbestimmung wurde der GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder verwendet.

Promotor-Luciferase-Reportergen Analysen

Tabelle 5.19.: Puffer und Lösungen für Promotor-Luciferase-Reportergen Analysen

Kratzpuffer

NaCl	150 mmol/L
EDTA	1 mmol/L
Tris	40 mmol/L
in dH ₂ O	

Kaliumphosphatpuffer

K_2HPO_4	100 mmol/L
KH_2PO_4	100 mmol/L
DTT	1 mmol/L

Glycylglycinpuffer

Glycylglycin	25 mmol/L
$MgSO_4$	15 mmol/L
EGTA	4 mmol/L
in dH_2O	

Luciferin Vorratslösung

DTT	10 mmol/L
D-Luciferin	1 mmol/L
in Glycylglycinpuffer	

Luciferase Assay Mix

Glycylglycinpuffer	7,8 mL
Kaliumphosphatpuffer	1,56 mL
ATP 200 mmol/L	104 μ L
DTT 1 mol/L	10,4 μ L

Luciferinpuffer

Glycylglycinpuffer	2 mL
Luciferin Vorratslösung	500 μ L
DTT 1 mol/L	20 μ L

Zur Untersuchung der CRE-abhängigen Gentranskription wurden HEK293T-Zellen transient mit Luciferase-Reportergenkonstrukten transfiziert. HEK293T-Zellen wurden in 6-Well-Kulturplatten kultiviert und

in einer Dichte von etwa 110.000 Zellen/cm² in 2 mL DMEM ausgesät. 0,5 µg/mL Luciferase-Reporter-gen-Vektor wurden mit 0,1 µg/mL des grün fluoreszierenden Protein (GFP)-Reporter-gen GFP-Topaz als Referenz für die Transfektionseffizienz kotransfiziert. Metafectene Pro (2 µg/mL) wurde als Transfektionsreagenz nach den Anweisungen des Herstellers verwendet. Die Zellen wurden für 48 Stunden in DMEM bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 9 % CO₂ kultiviert.

Transfizierte HEK293T-Zellen wurden 6 Stunden vor der Ernte mit Forskolin (10 µmol/L), einem Calcium-Ionophor (A23187, Calcimycin; 50 nmol, 500 nmol oder 5 µmol/L) oder S1P (300 nmol, 1 µmol/L oder 3 µmol/L) behandelt. Das Medium wurde verworfen, die Zellen wurden mit 2 mL PBS gewaschen und mechanisch mit einem Zellschaber in 1 mL Kratzpuffer geerntet. Die Zellen wurden bei 3380 x g für 3 Minuten bei 4 °C pelletiert und in 150 µL Kaliumphosphatpuffer resuspendiert. Um die Zellmembranen zu zerstören, wurden die Zellen dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37 °C in einem Wasserbad aufgetaut. Nach Zentrifugation bei 18.400 x g für 3 Minuten bei 4 °C wurde der Überstand weiter verwendet oder bei -80 °C gelagert.

Mit Hilfe von Luciferase-Reporter-gen-Assays kann die Promotoraktivität durch die Luciferase-Aktivität bestimmt werden. Die Erhöhung der Transkriptionsaktivität führt zu einer proportional erhöhten Expression des Reporterproteins Luciferase, dessen enzymatische Aktivität bestimmt werden kann. Die Luciferase ist ein Enzym, welches die Reaktion seines Substrats Luciferin zu einem instabilen Dioxetan unter Verwendung von O₂ und ATP katalysiert. Decarboxylierung führt zu einem angeregten Zustand, der bei Übergang in den Grundzustand Licht mit einer Wellenlänge von 560 nm emittiert. Um die Luciferase-Aktivität zu messen, wurden 20 µL der Probe mit 145 µL Luciferase Assay Mix auf einer weißen 96-Well-Platte gemischt. Nach Zugabe von 80 µL Luciferinpuffer wurde die Lichtemission bei 560 nm mit dem Centro LB 960 Luminometer für 10 Sekunden gemessen. Das Hintergrundsignal wurde mit Kaliumphosphatpuffer ohne Zellextrakte gemessen.

Zur Abschätzung der Transfektionseffizienz wurde eine Kotransfektion mit

einem GFP-Kontroll-vektor durchgeführt aufgrund der Annahme, dass HEK293T-Zellen unterschiedliche Plasmide mit gleicher Wahrscheinlichkeit aufnehmen. GFP enthält ein fluoreszierendes Chromophor. Die GFP-Variante GFP-Topas (GFPTpz) enthält 4 Punktmutationen, die zu einer Änderung des Emissionsspektrums auf 530 nm führen. GFPTpz unter Kontrolle eines CMV-Promotors (pGFPTpz-cmv) wurde kotransfiziert und die Fluoreszenz wurde in 30 μ L Proben für 1 Sekunde auf einer weißen 96-Well-Platte mit dem FluoroCount Microplate Fluorometer nachgewiesen. Das Hintergrundsignal wurde in 30 μ L Kaliumphosphatpuffer gemessen.

Chromatinimmunopräzipitation

Tabelle 5.20.: Puffer und Lösungen für Chromatinimmunopräzipitation

Zellkernlysepuffer

Tris	50 mmol/L
EDTA	10 mmol/L
SDS	1 % (w/v)
Protease Inhibitoren	1 x
in dH ₂ O	

Waschpuffer I

Tris	20 mmol/L
NaCl	150 mmol/L
EDTA	2 mmol/L
SDS	0,1 % (w/v)
Triton X 100	1 % (v/v)
in dH ₂ O	

Waschpuffer II

Tris	20 mmol/L
NaCl	500 mmol/L

EDTA	2 mmol/L
SDS	0,1 % (w/v)
Triton X 100	1 % (v/v)
in dH ₂ O	

Waschpuffer III

Tris	10 mmol/L
LiCl	250 mmol/L
EDTA	1 mmol/L
Nonidet P40	1 % (v/v)
Desoxycholsäure	1 % (w/v)
in dH ₂ O	

TE Puffer

Tris	10 mmol/L
EDTA	1 mmol/L
in dH ₂ O	

Elutionspuffer I

Tris	10 mmol/L
EDTA	1 mmol/L
SDS	1 % (w/v)
in dH ₂ O	

Elutionspuffer II

Tris	10 mmol/L
EDTA	1 mmol/L
SDS	0,67 % (w/v)
in dH ₂ O	

Um die Rekrutierung von CRTC1 oder CREB an die CRE-Sequenz einer Promotorregion zu untersuchen wurde eine Chromatinimmunopräzipita-

tion (ChIP) durchgeführt. Bei der ChIP werden Protein:DNA-Interaktionen quervernetzt und können durch spezifische Antikörper ausgefällt werden. Mittels PCR-Analyse mit spezifischen Primern können CRTC1- oder CREB-gebundene Promotorregionen identifiziert werden (Abbildung 5.3).

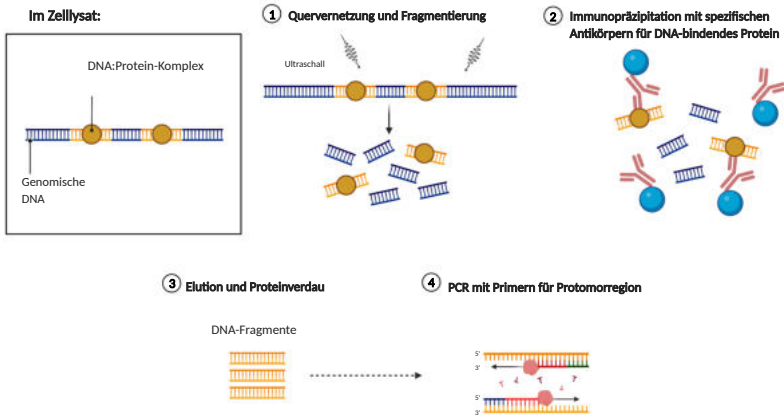


Abbildung 5.3.: Schematische Darstellung der Chromatinimmunopräzipitation.

Nach Quervernetzung von DNA:Protein-Komplexen im Zellsatz wird genomische DNA fragmentiert und mit spezifischen Antikörpern für die DNA-bindenden Proteine präzipitiert. Waschen, Eluieren und Proteinverdau liefert die zuvor gebundenen DNA-Fragmente welche anschließend per PCR mit Primern für die interessierenden Promotorregionen untersucht werden. Abbildung erstellt mit BioRender [4].

Die Chromatin-Immunpräzipitation wurde nach Heinrich et al. durchgeführt [65]. Ventrikuläres Herzgewebe von C57BL/6J-Wildtypmäusen wurde mit einem Skalpell in Stücke zerkleinert. Die Stücke wurden 20 Minuten in 1 mL 0,9%iger NaCl-Lösung mit 1% Formaldehyd gemischt. Die Quervernetzung durch Formaldehyd wurde durch Zugabe von 125 mmol/L Glycin und Rotation für 5 Minuten gestoppt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 1500 xg für 2 Minuten bei 4 °C pelletiert und in 800 µL Zellysepuffer aufgenommen. Die Zellen wurden durch drei Gefrier-(flüssiger Stickstoff) und Auftauzyklen (37 °C Wasserbad) lysiert. Nach Homogenisierung in einem 5 mL-Dounce-Homogenisator wurden die Zellpartikel 10 Minuten lang auf Eis gelegt, bevor sie 5 Minuten lang bei

4 °C bei 2350 x g zentrifugiert wurden. Die Zellkerne wurden lysiert durch Zugabe von 600 µL Zellkernlysepuffer zum Pellet. Die Proben wurden in Bioruptor Mikroröhrchen überführt und für 10 Minuten auf Eis gestellt. Durch Ultraschall im Bioruptor Plus Beschallungsgerät wurde die extrahierte DNA geschert (5 x 5 s; 30 s Pause, Stufe niedrig). Die Proben wurden in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und bei 15870 x g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Zur Vorreinigung wurden der Probe 2,4 %iges Protein A Sepharose CL-4B zugesetzt und 1 Stunde bei 4 °C rotiert. Anschließend wurden die Proben 2 Minuten bei 15870 x g bei 4 °C zentrifugiert. Eine Inputkontrolle wurde aus dem Überstand entnommen und in einem Low DNA-binding tube bei 4 °C über Nacht gelagert. Zum verbleibenden Überstand wurden 3 µg CRT1-Antikörper (0,618 µg/µL), 3 µg CREB-Antikörper (0,618 µg/µL) oder IgG-Antikörper, gebunden an 30 µL Protein A-Agarose (1 µg/µL), hinzugefügt und über Nacht auf einer rotierenden Plattform inkubiert. Die Proben wurden zweimal mit 1 mL Waschpuffer I, einmal mit 1 mL Waschpuffer II, einmal mit 1 mL Waschpuffer III und einmal mit 1 mL TE-Puffer gewaschen. Nach jedem Schritt wurden die Proben bei 1500 x g für 2 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, und der Überstand wurde verworfen. Die Proben wurden in Low DNA-binding tubes überführt, Protein:DNA-Komplexe wurden von der Agarose in 100 µL Elutionspuffer I für 15 Minuten bei 65 °C (Eppendorf Thermomixer comfort) eluiert und bei 15870 x g für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde mit 150 µL Elutionspuffer II für 15 Minuten bei 65 °C inkubiert und bei 15870 x g für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Die Überstände aus den beiden Zentrifugationsschritten wurden in einem Low DNA-binding tube zusammengeführt. Das Volumen der Inputkontrollen wurde durch Zugabe von 0,8 % SDS (w/v) und 200 µL TE-Puffer eingestellt. Alle Proben wurden über Nacht bei 65 °C inkubiert, um die Quervernetzung zu lösen. Um die Proteine in der Probe zu verdauen, wurden 100 µg Proteinase K und 250 µL TE-Puffer zugegeben und die Proben bei 37 °C für 2 Stunden inkubiert. Zur Präzipitation hochmolekularer RNA wurden 400 mmol/L LiCl zugegeben. Die DNA wurde durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion unter Verwendung von Manual Phase

Lock Gel-Röhrchen nach Herstelleranweisungen gereinigt. Die Probe und 500 μL Phenol wurden in das Röhrchen gegeben, gründlich gemischt und bei 15870 x g für 2 Minuten zentrifugiert. Die resultierende obere, flüssige Phase wurde wiederum mit 500 μL Phenol in einem Manual Phase Lock Gel-Röhrchen gemischt und bei 15870 x g für 2 Minuten zentrifugiert. Die obere Phase wurde mit 500 μL Chloroform gemischt und bei 15870 x g für 2 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Low DNA-binding tube überführt und die DNA wurde mit 1 μL Glykogen (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) in 900 μL 100 %igem Ethanol 35 Minuten lang bei 15870 x g bei 4 °C ausgefällt. Nach dem Waschen mit 500 μL 70 %igem Ethanol wurde die DNA in 20 μL TE-Puffer eluiert. Die Proben wurden mittels PCR analysiert oder bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Die aus der CHIP gewonnene DNA wurde mit promotorspezifischen Primern welche die CRE-Region flankieren amplifiziert (siehe Tabelle 5.6). Die PCR-Reaktion mit dem in Tabelle 5.22 aufgeführten Programm wurde unter Verwendung der Hot FirePol-DNA-Polymerase in einem T100-Thermocycler durchgeführt. Die PCR-Proben wurden unter Verwendung der folgenden Komponenten in dH_2O verwendet:

Hot FirePol DNA Polymerase	2,5 U
Hot FirePol BD Puffer	1 x
MgCl_2	1,25 mmol/L
dNTPs	200 $\mu\text{mol}/\text{L}$
<i>forward</i> Primer	250 nmol
<i>reverse</i> Primer	250 nmol
DNA	0,02 x

Tabelle 5.22.: Programm für PCR

Temperatur	Zeit
95 °C	12 Minuten
40 Zyklen:	
95 °C	15 Sekunden
50 °C	20 Sekunden
75 °C	15 Sekunden
75 °C	10 Minuten

Amplifizierte DNA wurde mit Ladefarbstoff gemischt und auf einem 2 %-Agarosegel mit 0,04 % Ethidiumbromid nach Größe aufgetrennt. Zur Größenabschätzung wurde der GeneRuler 100 bp DNA Ladder verwendet.

5.2.5. Statistische Analyse

Die Analyse wurde mit der Software Graph Pad Prism 5 durchgeführt. Die Daten wurden als Mittelwert \pm SEM ausgedrückt. Der Vergleich zweier Gruppen wurde durch den Student t-Test durchgeführt, für den multiplen Vergleich mehrerer Gruppen wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Tukey-Test durchgeführt. Für die Vergleiche der Gruppen verschiedenen Alters wurde eine ANOVA mit Bonferroni-Test durchgeführt. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

Literaturverzeichnis

- [1] Obesity and overweight (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>) abgerufen, 02.02.2021.
- [2] Sterbefälle sterbeziffer ränge anteile der häufigsten todesursachen ab 1998 (<https://www.gbe-bund.de/gbe/>) abgerufen, 2020.
- [3] Imagej (<https://imagej.nih.gov/ij/>) abgerufen, 25.04.2020.
- [4] Biorender (<https://biorender.com/>) abgerufen, 28.01.2021.
- [5] Judith Y. Altarejos, Naomi Goebel, Michael D. Conkright, Hiroshi Inoue, Jianxin Xie, Carlos M. Arias, Paul E. Sawchenko, and Marc Montminy. The creb1 coactivator crtc1 is required for energy balance and fertility. *Nature Medicine*, 14(10):1112–1117, 2008.
- [6] Judith Y. Altarejos and Marc Montminy. Creb and the crtc co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12(3):141–151, 2011.
- [7] Ana Barbara Alves-Wagner, Caio Yogi Yonamine, Luciana Alves de Fatima, William Festuccia, and Ubiratan Fabres Machado. Sympathetic regulation of slc2a4 gene expression: Participation of a putative camp responsive element (cre) site in the slc2a4 promoter. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 52(3):580–594, 2019.
- [8] Viviana Anelli, Christopher R. Gault, Amy B. Cheng, and Lina M. Obeid. Sphingosine kinase 1 is up-regulated during hypoxia in

- u87mg glioma cells. role of hypoxia-inducible factors 1 and 2. *The Journal of biological chemistry*, 283(6):3365–3375, 2008.
- [9] Michael Arad, D. Woodrow Benson, Antonio R. Perez-Atayde, William J. McKenna, Elizabeth A. Sparks, Ronald J. Kanter, Kate McGarry, J. G. Seidman, and Christine E. Seidman. Constitutively active amp kinase mutations cause glycogen storage disease mimicking hypertrophic cardiomyopathy. *The Journal of Clinical Investigation*, 109(3):357–362, 2002.
- [10] Zoltan Arany, Mikhail Novikov, Sherry Chin, Yanhong Ma, Anthony Rosenzweig, and Bruce M. Spiegelman. Transverse aortic constriction leads to accelerated heart failure in mice lacking ppar-gamma coactivator 1alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(26):10086–10091, 2006.
- [11] E. Arbustini, R. Fasani, P. Morbini, M. Diegoli, M. Grasso, B. Dal Bello, E. Marangoni, P. Banfi, N. Banchieri, O. Bellini, G. Comi, J. Narula, C. Campana, A. Gavazzi, C. Danesino, and M. Viganò. Coexistence of mitochondrial dna and beta myosin heavy chain mutations in hypertrophic cardiomyopathy with late congestive heart failure. *Heart*, 80(6):548–558, 1998.
- [12] Muhammad Yasir Asghar, Kati Kemppainen, Taru Lassila, and Kid Törnquist. Sphingosine 1-phosphate attenuates mmp2 and mmp9 in human anaplastic thyroid cancer c643 cells: Importance of s1p2. *PLOS ONE*, 13(5):e0196992, 2018.
- [13] U. Baandrup, R. A. Florio, F. Roters, and E. G. Olsen. Electron microscopic investigation of endomyocardial biopsy samples in hypertrophy and cardiomyopathy. a semiquantitative study in 48 patients. *Circulation*, 63(6):1289–1298, 1981.
- [14] Christian E. Badr, Jeffrey W. Hewett, Xandra O. Breakefield, and Bakhos A. Tannous. A highly sensitive assay for monitoring the secretory pathway and er stress. *PloS one*, 2(6):e571, 2007.

- [15] Robert S. Balaban, Shino Nemoto, and Toren Finkel. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, 120(4):483–495, 2005.
- [16] Edoardo Bertero and Christoph Maack. Calcium signaling and reactive oxygen species in mitochondria. *Circulation research*, 122(10):1460–1478, 2018.
- [17] Edoardo Bertero and Christoph Maack. Metabolic remodelling in heart failure. *Nature Reviews Cardiology*, 15(8):457–470, 2018.
- [18] Mark A. Bittinger, Elizabeth McWhinnie, Jodi Meltzer, Vadim Iourgenko, Brian Latario, Xiulin Liu, Chein Hwa Chen, Chuangzheng Song, Dan Garza, and Mark Labow. Activation of camp response element-mediated gene expression by regulated nuclear transport of torc proteins. *Current biology : CB*, 14(23):2156–2161, 2004.
- [19] E. Blair, C. Redwood, H. Ashrafian, M. Oliveira, J. Broxholme, B. Kerr, A. Salmon, I. Ostman-Smith, and H. Watkins. Mutations in the gamma(2) subunit of amp-activated protein kinase cause familial hypertrophic cardiomyopathy: evidence for the central role of energy compromise in disease pathogenesis. *Human molecular genetics*, 10(11):1215–1220, 2001.
- [20] Nouredine Brakch, Olivier Dormond, Soumeya Bekri, Dela Golshayan, Magali Correvon, Lucia Mazzolai, Beat Steinmann, and Frédéric Barbey. Evidence for a role of sphingosine-1 phosphate in cardiovascular remodelling in fabry disease. *European heart journal*, 31(1):67–76, 2010.
- [21] Eugene Braunwald. Heart failure. *JACC. Heart failure*, 1(1):1–20, 2013.
- [22] Lionel Breuillaud, Olivier Halfon, Pierre J. Magistretti, François P. Pralong, and Jean-René Cardinaux. Mouse fertility is not dependent on the creb coactivator *crtc1*. *Nature medicine*, 15(9):989–90; author reply 991, 2009.

- [23] Lionel Breuillaud, Clara Rossetti, Elsa M. Meylan, Christophe Mérinat, Olivier Halfon, Pierre J. Magistretti, and Jean-René Cardinaux. Deletion of creb-regulated transcription coactivator 1 induces pathological aggression, depression-related behaviors, and neuroplasticity genes dysregulation in mice. *Biological psychiatry*, 72(7):528–536, 2012.
- [24] Kristopher Burkewitz, Ianessa Morantte, Heather J. M. Weir, Robin Yeo, Yue Zhang, Frank K. Huynh, Olga R. Ilkayeva, Matthew D. Hirschey, Ana R. Grant, and William B. Mair. Neuronal crtc-1 governs systemic mitochondrial metabolism and lifespan via a catecholamine signal. *Cell*, 160(5):842–855, 2015.
- [25] Juliane C. Campos, Bruno B. Queliconi, Luiz H. M. Bozi, Luiz R. G. Bechara, Paulo M. M. Dourado, Allen M. Andres, Paulo R. Jannig, Kátia M. S. Gomes, Vanessa O. Zambelli, Cibele Rocha-Resende, Silvia Guatimosim, Patricia C. Brum, Daria Mochly-Rosen, Roberta A. Gottlieb, Alicia J. Kowaltowski, and Julio C. B. Ferreira. Exercise reestablishes autophagic flux and mitochondrial quality control in heart failure. *Autophagy*, 13(8):1304–1317, 2017.
- [26] Alessandro Cannavo, Daniela Liccardo, Klara Komici, Graziamaria Corbi, Claudio de Lucia, Grazia D. Femminella, Andrea Elia, Leonardo Bencivenga, Nicola Ferrara, Walter J. Koch, Nazareno Paolucci, and Giuseppe Rengo. Sphingosine kinases and sphingosine 1-phosphate receptors: Signaling and actions in the cardiovascular system. *Frontiers in Pharmacology*, 8:556, 2017.
- [27] Alisson C. Cardoso, Nicholas T. Lam, Jainy J. Savla, Yuji Nakada, Ana Helena M. Pereira, Abdallah Elnwasany, Ivan Menendez-Montes, Emily L. Ensley, Ursa Bezan Petric, Gaurav Sharma, A. Dean Sherry, Craig R. Malloy, Chalermchai Khemtong, Michael T. Kinter, Wilson Lek Wen Tan, Chukwuemeka George Anene-Nzelu, Roger Sik-Yin Foo, Ngoc Uyen Nhi Nguyen, Shujuan Li, Mahmoud Salama Ahmed, Waleed M. Elhelaly, Salim Abdisalaam, Aroumougame Asaithamby,

- Chao Xing, Mohammed Kanchwala, Goncalo Vale, Kaitlyn M. Eckert, Matthew A. Mitsche, Jeffrey G. McDonald, Joseph A. Hill, Linzhang Huang, Philip W. Shaul, Luke I. Szweda, and Hesham A. Sadek. Mitochondrial substrate utilization regulates cardiomyocyte cell cycle progression. *Nature metabolism*, 2(2):167–178, 2020.
- [28] Lucie Carrier, Giulia Mearini, Konstantina Stathopoulou, and Friederike Cuello. Cardiac myosin-binding protein c (mybpc3) in cardiac pathophysiology. *Gene*, 573(2):188–197, 2015.
- [29] Antoine H. Chaanine, Thierry H. LeJemtel, and Patrice Delafontaine. Mitochondrial pathobiology and metabolic remodeling in progression to overt systolic heart failure. *Journal of clinical medicine*, 9(11):3582, 2020.
- [30] Rajnish Kumar Chaturvedi, Thomas Hennessey, Ashu Johri, Shashi Kant Tiwari, Divya Mishra, Swati Agarwal, Yoon Seong Kim, and M. Flint Beal. Transducer of regulated creb-binding proteins (torcs) transcription and function is impaired in huntington’s disease. *Human molecular genetics*, 21(15):3474–3488, 2012.
- [31] Mai Chen, Priscila Y. Sato, J. Kurt Chuprun, Raymond J. Peroutka, Nicholas J. Otis, Jessica Ibeti, Shi Pan, Shey-Shing Sheu, Erhe Gao, and Walter J. Koch. Prodeath signaling of g protein-coupled receptor kinase 2 in cardiac myocytes after ischemic stress occurs via extracellular signal-regulated kinase-dependent heat shock protein 90-mediated mitochondrial targeting. *Circulation research*, 112(8):1121–1134, 2013.
- [32] Yeong-Renn Chen and Jay L. Zweier. Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation. *Circulation research*, 114(3):524–537, 2014.
- [33] Yun Chen, Yingqiu Liu, and Gerald W. Dorn. Mitochondrial fusion is essential for organelle function and cardiac homeostasis. *Circulation research*, 109(12):1327–1331, 2011.

- [34] Jiali Cheng, Gayani Nanayakkara, Ying Shao, Ramon Cueto, Luqiao Wang, William Y. Yang, Ye Tian, Hong Wang, and Xiaofeng Yang. Mitochondrial proton leak plays a critical role in pathogenesis of cardiovascular diseases. In Gaetano Santulli, editor, *Mitochondrial Dynamics in Cardiovascular Medicine*, Advances in Experimental Medicine and Biology, pages 359–370. Springer International Publishing, Cham and s.l., 2017.
- [35] Antoine Cherix. Deletion of *crtc1* leads to hippocampal neuroenergetic impairments associated with depressive-like behavior.
- [36] P. C. Cheung, I. P. Salt, S. P. Davies, D. G. Hardie, and D. Carling. Characterization of amp-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in amp binding. *Biochemical Journal*, 346 Pt 3(Pt 3):659–669, 2000.
- [37] Eva Choong, Lina Quteineh, Jean-René Cardinaux, Mehdi Gholam-Rezaee, Frederik Vandenberghe, Maria Dobrinias, Guido Bondolfi, Manuela Etter, Laurent Holzer, Pierre Magistretti, Armin von Gunten, Martin Preisig, Peter Vollenweider, Jacques S. Beckmann, François P. Pralong, Gerard Waeber, Zoltan Kutalik, Philippe Conus, Murielle Bochud, and Chin B. Eap. Influence of *crtc1* polymorphisms on body mass index and fat mass in psychiatric patients and the general adult population. *JAMA Psychiatry*, 70(10):1011–1019, 2013.
- [38] Eunhee Chung and Leslie A. Leinwand. Pregnancy as a cardiac stress model. *Cardiovascular research*, 101(4):561–570, 2014.
- [39] Michael D. Conkright, Gianluca Canettieri, Robert Sreaton, Ernesto Guzman, Loren Miraglia, John B. Hogenesch, and Marc Montminy. Torcs: transducers of regulated creb activity. *Molecular Cell*, 12(2):413–423, 2003.
- [40] Jenifer G. Crilley, Ernest A. Boehm, Edward Blair, Bheeshma Rajagopalan, Andrew M. Blamire, Peter Styles, William J. McKenna, Ingegerd Östman Smith, Kieran Clarke, and Hugh Watkins. Hyper-

- trophic cardiomyopathy due to sarcomeric gene mutations is characterized by impaired energy metabolism irrespective of the degree of hypertrophy. *Journal of the American College of Cardiology*, 41(10):1776–1782, 2003.
- [41] Samarjit Das, Djahida Bedja, Nathaniel Campbell, Brittany Dunkerly, Venugopal Chenna, Anirban Maitra, and Charles Steenbergen. mir-181c regulates the mitochondrial genome, bioenergetics, and propensity for heart failure in vivo. *PLOS ONE*, 9(5):e96820, 2014.
- [42] Renaud Dentin, Yi Liu, Seung-Hoi Koo, Susan Hedrick, Thomas Vargas, Jose Heredia, John Yates, and Marc Montminy. Insulin modulates gluconeogenesis by inhibition of the coactivator torc2. *Nature*, 449(7160):366–369, 2007.
- [43] Alexander Dietl and Christoph Maack. Targeting mitochondrial calcium handling and reactive oxygen species in heart failure. *Current Heart Failure Reports*, 14(4):338–349, 2017.
- [44] Jason R. B. Dyck and Gary D. Lopaschuk. Ampk alterations in cardiac physiology and pathology: enemy or ally? *The Journal of physiology*, 574(Pt 1):95–112, 2006.
- [45] Lu Fang, Xiao-Lei Moore, Xiao-Ming Gao, Anthony M. Dart, Ye-an Leng Lim, and Xiao-Jun Du. Down-regulation of mitofusin-2 expression in cardiac hypertrophy in vitro and in vivo. *Life sciences*, 80(23):2154–2160, 2007.
- [46] Robert F. Feissner, Jolanta Skalska, Winston E. Gaum, and Shey-Shing Sheu. Crosstalk signaling between mitochondrial ca^{2+} and ros. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 14:1197–1218, 2009.
- [47] V. J. Ferrans, A. G. Morrow, and W. C. Roberts. Myocardial ultrastructure in idiopathic hypertrophic subaortic stenosis. a study of operatively excised left ventricular outflow tract muscle in 14 patients. *Circulation*, 45(4):769–792, 1972.

- [48] M. Forrest, S-Y Sun, R. Hajdu, J. Bergstrom, D. Card, G. Doherty, J. Hale, C. Keohane, C. Meyers, J. Milligan, S. Mills, N. Nomura, H. Rosen, M. Rosenbach, G-J Shei, I. I. Singer, M. Tian, S. West, V. White, J. Xie, R. L. Proia, and S. Mandala. Immune cell regulation and cardiovascular effects of sphingosine 1-phosphate receptor agonists in rodents are mediated via distinct receptor subtypes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 309(2):758–768, 2004.
- [49] Alessia Frati, Barbara Ricci, Federica Pierucci, Silvia Nistri, Daniele Bani, and Elisabetta Meacci. Role of sphingosine kinase/s1p axis in ecm remodeling of cardiac cells elicited by relaxin. *Molecular Endocrinology*, 29(1):53–67, 2015.
- [50] Bodvaël Fraysse, Florian Weinberger, Sonya C. Bardswell, Friederike Cuello, Nicolas Vignier, Birgit Geertz, Jutta Starbatty, Elisabeth Krämer, Catherine Coirault, Thomas Eschenhagen, Jonathan C. Kentish, Metin Avkiran, and Lucie Carrier. Increased myofilament ca^{2+} sensitivity and diastolic dysfunction as early consequences of mybpc3 mutation in heterozygous knock-in mice. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 52(6):1299–1307, 2012.
- [51] Norbert Frey, Mark Luedde, and Hugo A. Katus. Mechanisms of disease: hypertrophic cardiomyopathy. *Nature Reviews Cardiology*, 9(2):91–100, 2011.
- [52] Zorina S. Galis and Jaikirshan J. Khatri. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis. *Circulation research*, 90(3):251–262, 2002.
- [53] A. Garnier, D. Fortin, C. Deloménie, I. Momken, V. Veksler, and R. Ventura-Clapier. Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. *The Journal of physiology*, 551(Pt 2):491–501, 2003.

- [54] T. K. Ghosh, J. Bian, and D. L. Gill. Intracellular calcium release mediated by sphingosine derivatives generated in cells. *Science (New York, N.Y.)*, 248(4963):1653–1656, 1990.
- [55] T. K. Ghosh, J. Bian, and D. L. Gill. Sphingosine 1-phosphate generated in the endoplasmic reticulum membrane activates release of stored calcium. *The Journal of biological chemistry*, 269(36):22628–22635, 1994.
- [56] Andrew A. Gibb and Bradford G. Hill. Metabolic coordination of physiological and pathological cardiac remodeling. *Circulation research*, 123(1):107–128, 2018.
- [57] Srikanth Givvimani, Charu Munjal, Neetu Tyagi, Utpal Sen, Naira Metreveli, and Suresh C. Tyagi. Mitochondrial division/mitophagy inhibitor (mdivi) ameliorates pressure overload induced heart failure. *PLOS ONE*, 7(3):e32388, 2012.
- [58] A. M. Gómez, H. H. Valdivia, H. Cheng, M. R. Lederer, L. F. Santana, M. B. Cannell, S. A. McCune, R. A. Altschuld, and W. J. Lederer. Defective excitation-contraction coupling in experimental cardiac hypertrophy and heart failure. *Science*, 276(5313):800–806, 1997.
- [59] Ira J. Goldberg, Chad M. Trent, and P. Christian Schulze. Lipid metabolism and toxicity in the heart. *Cell metabolism*, 15(6):805–812, 2012.
- [60] Katarzyna Głombik, Jan Detka, Joanna Górska, Anna Kurek, Bogdan Solnica, and Bogusława Budziszewska. Brain metabolic alterations in rats showing depression-like and obesity phenotypes. *Neurotoxicity research*, 37(2):406–424, 2020.
- [61] Guohua Gong, Moshi Song, Gyorgy Csordas, Daniel P. Kelly, Scot J. Matkovich, and Gerald W. Dorn. Parkin-mediated mitophagy directs perinatal cardiac metabolic maturation in mice. *Science*, 350(6265):aad2459, 2015.

- [62] Xiaoxiang Guan, Lu Wang, Zhenhong Liu, Xiaofei Guo, Yuan Jiang, Ying Lu, Yanli Peng, Tianhua Liu, Baofeng Yang, Hongli Shan, Yong Zhang, and Chaoqian Xu. mir-106a promotes cardiac hypertrophy by targeting mitofusin 2. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 99:207–217, 2016.
- [63] Pamela A. Harvey and Leslie A. Leinwand. The cell biology of disease: cellular mechanisms of cardiomyopathy. *The Journal of cell biology*, 194(3):355–365, 2011.
- [64] Prottoy Hasan, Masao Saotome, Takenori Ikoma, Keisuke Iguchi, Hideya Kawasaki, Toshihide Iwashita, Hideharu Hayashi, and Yuichiro Maekawa. Mitochondrial fission protein, dynamin-related protein 1, contributes to the promotion of hypertensive cardiac hypertrophy and fibrosis in dahl-salt sensitive rats. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 121:103–106, 2018.
- [65] Annette Heinrich. *Molecular mechanisms of the effect of the mood stabilizer lithium on cAMP-induced CREB transcriptional activity*. Dissertation, 2009.
- [66] Frank R. Heinzel, Felix Hohendanner, Ge Jin, Simon Sedej, and Frank Edelman. Myocardial hypertrophy and its role in heart failure with preserved ejection fraction. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 119(10):1233–1242, 2015.
- [67] Emma Henriksson, Johanna Säll, Amélie Gormand, Sebastian Wasserstrom, Nicholas A. Morrice, Andreas M. Fritzen, Marc Foretz, David G. Campbell, Kei Sakamoto, Mikael Ekelund, Eva Degerman, Karin G. Stenkula, and Olga Göransson. Sik2 regulates crtc3, hdac4 and glucose uptake in adipocytes. *Journal of Cell Science*, 128(3):472–486, 2015.
- [68] Hye Jin Heo, Hyoung Kyu Kim, Jae Boum Youm, Sung Woo Cho, In-Sung Song, Sun Young Lee, Tae Hee Ko, Nari Kim, Kyung Soo Ko,

- Byoung Doo Rhee, and Jin Han. Mitochondrial pyruvate dehydrogenase phosphatase 1 regulates the early differentiation of cardiomyocytes from mouse embryonic stem cells. *Experimental & Molecular Medicine*, 48(8):e254, 2016.
- [69] Joseph A. Hill and Eric N. Olson. Cardiac plasticity. *The New England journal of medicine*, 358(13):1370–1380, 2008.
- [70] T. Ide, H. Tsutsui, S. Hayashidani, D. Kang, N. Suematsu, K. Nakamura, H. Utsumi, N. Hamasaki, and A. Takeshita. Mitochondrial dna damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circulation research*, 88(5):529–535, 2001.
- [71] Nobuaki Igarashi, Taro Okada, Shun Hayashi, Toshitada Fujita, Saleem Jahangeer, and Shun-ichi Nakamura. Sphingosine kinase 2 is a nuclear protein and inhibits dna synthesis. *The Journal of biological chemistry*, 278(47):46832–46839, 2003.
- [72] Vadim Iourgenko, Wenjun Zhang, Craig Mickanin, Ira Daly, Can Jiang, Jonathan M. Hexham, Anthony P. Orth, Loren Miraglia, Jodi Meltzer, Dan Garza, Gung-Wei Chirn, Elizabeth McWhinnie, Dalia Cohen, Joanne Skelton, Robert Terry, Yang Yu, Dale Bodian, Frank P. Buxton, Jian Zhu, Chuazheng Song, and Mark A. Labow. Identification of a family of camp response element-binding protein coactivators by genome-scale functional analysis in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(21):12147–12152, 2003.
- [73] Spencer L. James, Degu Abate, Kalkidan Hassen Abate, Solomon M. Abay, Cristiana Abbafati, Nooshin Abbasi, Hedayat Abbastabar, Foad Abd-Allah, Jemal Abdela, Ahmed Abdelalim, Ibrahim Abdollahpour, Rizwan Suliankatchi Abdulkader, Zegeye Abebe, Semaw F. Abera, Olifan Zewdie Abil, Haftom Niguse Abraha, Laith Jamal Abu-Raddad, Niveen M. E. Abu-Rmeileh, Manfred Mario Kokou Accrombessi, Dilaram Acharya, Pawan Acharya, Ilana N. Ackerman, Abdu A.

Adamu, Oladimeji M. Adebayo, Victor Adekanmbi, Olatunji O. Adetokunboh, Mina G. Adib, Jose C. Adsuar, Kossivi Agbelenko Afanvi, Mohsen Afarideh, Ashkan Afshin, Gina Agarwal, Kareha M. Agesa, Rakesh Aggarwal, Sargis Aghasi Aghayan, Sutapa Agrawal, Alireza Ahmadi, Mehdi Ahmadi, Hamid Ahmadi, Muktar Beshir Ahmed, Amani Nidhal Aichour, Ibtihel Aichour, Miloud Taki Eddine Aichour, Tomi Akinyemiju, Nadia Akseer, Ziyad Al-Aly, Ayman Al-Eyadh, Hesham M. Al-Mekhlafi, Rajaa M. Al-Raddadi, Fares Alahdab, Khursheed Alam, Tahiya Alam, Alaa Alashi, Seyed Moayed Alavian, Kefyalew Addis Alene, Mehran Alijanzadeh, Reza Alizadeh-Navaei, Syed Mohamed Aljunid, Ala'a Alkerwi, François Alla, Peter Allebeck, Mohamed M. L. Alouani, Khalid Altirkawi, Nelson Alvis-Guzman, Azmeraw T. Amare, Leopold N. Aminde, Walid Ammar, Yaw Ampem Amoako, Nahla Hamed Anber, Catalina Liliana Andrei, Sofia Androudi, Megbaru Debalkie Animut, Mina Anjomshoa, Mustafa Geleto Ansha, Carl Abelardo T. Antonio, Palwasha Anwari, Jalal Arabloo, Antonio Arauz, Olatunde Aremu, Filippo Ariani, Bahroom Armoon, Johan Ärnlov, Amit Arora, Al Artaman, Krishna K. Aryal, Hamid Asayesh, Rana Jawad Asghar, Zerihun Ataro, Sachin R. Atre, Marcel Ausloos, Leticia Avila-Burgos, Euripide F. G. A. Avokpaho, Ashish Awasthi, Beatriz Paulina Ayala Quintanilla, Rakesh Ayer, Peter S. Azzopardi, Arefeh Babazadeh, Hamid Badali, Alaa Badawi, Ayele Geleto Bali, Katherine E. Ballesteros, Shoshana H. Ballew, Maciej Banach, Joseph Adel Mattar Banoub, Amrit Bantola, Aleksandra Barac, Miguel A. Barboza, Suzanne Lyn Barker-Collo, Till Winfried Bärnighausen, Lope H. Barrero, Bernhard T. Baurne, Shahrzad Bazargan-Hejazi, Neeraj Bedi, Ettore Beghi, Masoud Behzadifar, Meysam Behzadifar, Yannick Béjot, Abate Bekele Belachew, Yihalem Abebe Belay, Michelle L. Bell, Aminu K. Bello, Isabella M. Bensenor, Eduardo Bernabe, Robert S. Bernstein, Mircea Bauran, Tina Beyranvand, Neeraj Bhala, Suraj Bhattarai, Soumyadeep Bhaumik, Zulfiqar A. Bhutta, Belete Biadgo, Ali Bijani, Boris Bikbov, Ver Bilano, Nigus Billign, Muhammad Shahdaat Bin Sayeed, Donal

Bisanzio, Brigitte F. Blacker, Fiona M. Blyth, Ibrahim R. Bou-Orm, Soufiane Boufous, Rupert Bourne, Oliver J. Brady, Michael Brainin, Luisa C. Brant, Alexandra Brazinova, Nicholas J. K. Breitborde, Hermann Brenner, Paul Svitil Briant, Andrew M. Briggs, Andrey Nikolaevich Briko, Gabrielle Britton, Traolach Brugha, Rachele Buchbinder, Reinhard Busse, Zahid A. Butt, Lucero Cahuana-Hurtado, Jorge Cano, Rosario Cárdenas, Juan J. Carrero, Austin Carter, Félix Carvalho, Carlos A. Castañeda-Orjuela, Jacqueline Castillo Rivas, Franz Castro, Ferrán Catalá-López, Kelly M. Cercy, Ester Cerin, Yazan Chaiah, Alex R. Chang, Hsing-Yi Chang, Jung-Chen Chang, Fiona J. Charlson, Aparajita Chattopadhyay, Vijay Kumar Chattu, Pankaj Chaturvedi, Peggy Pei-Chia Chiang, Ken Lee Chin, Abdulaal Chitheer, Jee-Young J. Choi, Rajiv Chowdhury, Hanne Christensen, Devasahayam J. Christopher, Flavia M. Cicuttini, Liliana G. Ciobanu, Massimo Cirillo, Rafael M. Claro, Daniel Collado-Mateo, Cyrus Cooper, Josef Coresh, Paolo Angelo Cortesi, Monica Cortinovis, Megan Costa, Ewerton Cousin, Michael H. Criqui, Elizabeth A. Cromwell, Marita Cross, John A. Crump, Abel Fekadu Dadi, Lalit Dandona, Rakhi Dandona, Paul I. Dargan, Ahmad Daryani, Rajat Das Gupta, José Das Neves, Tamirat Tesfaye Dasa, Gail Davey, Adrian C. Davis, Dragos Virgil Davitoiu, Barbora de Courten, Fernando Pio de La Hoz, Diego de Leo, Jan-Walter de Neve, Meaza Girma Degefa, Louisa Degenhardt, Selina Deiparine, Robert P. Dellavalle, Gebre Teklemariam Demoz, Kebede Deribe, Nikolaos Dervenis, Don C. Des Jarlais, Getenet Ayalew Dessie, Subhojit Dey, Samath Dhamminda Dharmaratne, Mesfin Tadese Dinberu, M. Ashworth Dirac, Shirin Djalalinia, Linh Doan, Klara Dokova, David Teye Doku, E. Ray Dorsey, Kerrie E. Doyle, Tim Robert Driscoll, Manisha Dubey, Eleonora Dubljanin, Eyasu Ejeta Duken, Bruce B. Duncan, Andre R. Du-raes, Hedyeh Ebrahimi, Soheil Ebrahimpour, Michelle Marie Echo, David Edvardsson, Andem Effiong, Joshua R. Ehrlich, Charbel El Bcheraoui, Maysaa El Sayed Zaki, Ziad El-Khatib, Hajer Elkout, Iqbal R. F. Elyazar, Ahmadali Enayati, Aman Yesuf Endries, Benjamin

Er, Holly E. Erskine, Babak Eshrati, Sharareh Eskandarieh, Alireza Esteghamati, Sadaf Esteghamati, Hamed Fakhim, Vahid Fallah Omrani, Mahbobeh Faramarzi, Mohammad Fareed, Farzaneh Farhadi, Talha A. Farid, Carla Sofia E. sá Farinha, Andrea Farioli, Andre Faro, Maryam S. Farvid, Farshad Farzadfar, Valery L. Feigin, Netsanet Fentahun, Seyed-Mohammad Fereshtehnejad, Eduarda Fernandes, Joao C. Fernandes, Alize J. Ferrari, Garumma Tolu Feyissa, Irina Filip, Florian Fischer, Christina Fitzmaurice, Nataliya A. Foigt, Kyle J. Foreman, Jack Fox, Tahvi D. Frank, Takeshi Fukumoto, Nancy Fullman, Thomas Fürst, João M. Furtado, Neal D. Futran, Seana Gall, Morsaleh Ganji, Fortune Gbetoho Gankpe, Alberto L. Garcia-Basteiro, William M. Gardner, Abadi Kahu Gebre, Amanuel Tesfay Gebremedhin, Teklu Gebrehiwo Gebremichael, Tilayie Feto Gelano, Johanna M. Geleijnse, Ricard Genova-Maleras, Yilma Chisha Dea Geramo, Peter W. Gething, Kebede Embaye Gezae, Keyghobad Ghadiri, Khalil Ghasemi Falavarjani, Maryam Ghasemi-Kasman, Mamata Ghimire, Rakesh Ghosh, Alope Gopal Ghoshal, Simona Giampaoli, Paramjit Singh Gill, Tiffany K. Gill, Ibrahim Abdelmageed Ginawi, Giorgia Giussani, Elena V. Gnedovskaya, Ellen M. Goldberg, Srinivas Goli, Hector Gómez-Dantés, Philimon N. Gona, Sameer Vali Gopalani, Taren M. Gorman, Alessandra C. Goulart, Bárbara Niegia Garcia Goulart, Ayman Grada, Morgan E. Grams, Giuseppe Grosso, Harish Chander Gugnani, Yuming Guo, Prakash C. Gupta, Rahul Gupta, Rajeev Gupta, Tanush Gupta, Bishal Gyawali, Juanita A. Haagsma, Vladimir Hachinski, Nima Hafezi-Nejad, Hassan Haghparast Bidgoli, Tekleberhan B. Hagos, Gessesew Bugssa Hailu, Arvin Haj-Mirzaian, Arya Haj-Mirzaian, Randah R. Hamadeh, Samer Hamidi, Alexis J. Handal, Graeme J. Hankey, Yuantao Hao, Hilda L. Harb, Sivadasanpillai Harikrishnan, Josep Maria Haro, Mehedi Hasan, Hadi Hassankhani, Hamid Yimam Hassen, Rasmus Havmoeller, Caitlin N. Hawley, Roderick J. Hay, Simon I. Hay, Akbar Hedayatzadeh-Omran, Behzad Heibati, Delia Hendrie, Andualem Henok, Claudiu Herteliu, Sousan Heydarpour, Desalegn Tsegaw Hibstu, Huong Thanh Hoang,

Hans W. Hoek, Howard J. Hoffman, Michael K. Hole, Enayatollah Homaie Rad, Praveen Hoogar, H. Dean Hosgood, Seyed Mostafa Hosseini, Mehdi Hosseinzadeh, Mihaela Hostiuc, Sorin Hostiuc, Peter J. Hotez, Damian G. Hoy, Mohamed Hsairi, Aung Soe Htet, Guoqing Hu, John J. Huang, Chantal K. Huynh, Kim Moesgaard Iburg, Chad Thomas Ikeda, Bogdan Ileanu, Olayinka Stephen Ilesanmi, Usman Iqbal, Seyed Sina Naghibi Irvani, Caleb Mackay Salpeter Irvine, Sheikh Mohammed Shariful Islam, Farhad Islami, Kathryn H. Jacobsen, Leila Jahangiry, Nader Jahanmehr, Sudhir Kumar Jain, Mihajlo Jakovljevic, Mehdi Javanbakht, Achala Upendra Jayatilleke, Panniyammakal Jeemon, Ravi Prakash Jha, Vivekanand Jha, John S. Ji, Catherine O. Johnson, Jost B. Jonas, Jacek Jerzy Jozwiak, Suresh Banayya Jungari, Mikk Jürisson, Zubair Kabir, Rajendra Kadel, Amaha Kahsay, Rizwan Kalani, Tanuj Kanchan, Manoochehr Karami, Behzad Karami Matin, André Karch, Corine Karema, Narges Karimi, Seyed M. Karimi, Amir Kasaeian, Dessalegn H. Kassa, Getachew Mullu Kassa, Tesfaye Dessale Kassa, Nicholas J. Kassebaum, Srinivasa Vittal Katikireddi, Norito Kawakami, Ali Kazemi Karyani, Masoud Masoud Keighobadi, Peter Njenga Keiyoro, Laura Kemmer, Grant Rodgers Kemp, Andre Pascal Kengne, Andre Keren, Yousef Saleh Khader, Behzad Khafaei, Morteza Abdullatif Khafaie, Alireza Khajavi, Ibrahim A. Khalil, Ejaz Ahmad Khan, Muhammad Shahzeb Khan, Muhammad Ali Khan, Young-Ho Khang, Mohammad Khazaei, Abdullah T. Khoja, Ardeshir Khosravi, Mohammad Hossein Khosravi, Aliasghar A. Kiadaliri, Daniel N. Kiirithio, Cho-Il Kim, Daniel Kim, Pauline Kim, Young-Eun Kim, Yun Jin Kim, Ruth W. Kimokoti, Yohannes Kinfu, Adnan Kisa, Katarzyna Kissimova-Skarbek, Mika Kivimäki, Ann Kristin Skringdo Knudsen, Jonathan M. Kocarnik, Sonali Kochhar, Yoshihiro Kokubo, Tufa Kolola, Jacek A. Kopec, Soewarta Kosen, Georgios A. Kotsakis, Parvaiz A. Koul, Ai Koyanagi, Michael A. Kravchenko, Kewal Krishan, Kristopher J. Krohn, Barthelemy Kuate Defo, Burcu Kucuk Bicer, G. Anil Kumar, Manasi Kumar, Hmwe Hmwe Kyu, Deepesh P. Lad, Sheetal D. Lad, Alessandra Lafranconi, Ra-

tilal Laloo, Tea Lallukka, Faris Hasan Lami, C. van Lansingh, Arman Latifi, Kathryn Mei-Ming Lau, Jeffrey V. Lazarus, Janet L. Leasher, Jorge R. Ledesma, Paul H. Lee, James Leigh, Janni Leung, Miriam Levi, Sonia Lewycka, Shanshan Li, Yichong Li, Yu Liao, Misgan Legesse Liben, Lee-Ling Lim, Stephen S. Lim, Shiwei Liu, Rakesh Lodha, Katharine J. Looker, Alan D. Lopez, Stefan Lorkowski, Paulo A. Lotufo, Nicola Low, Rafael Lozano, Tim C. D. Lucas, Lydia R. Lucchesi, Raimundas Lunevicius, Ronan A. Lyons, Stefan Ma, Eryln Rachelle King Macarayan, Mark T. Mackay, Fabiana Madotto, Hassan Magdy Abd El Razek, Muhammed Magdy Abd El Razek, Dhaval P. Maghavanani, Narayan Bahadur Mahotra, Hue Thi Mai, Marek Majdan, Reza Majdzadeh, Azeem Majeed, Reza Malekzadeh, Deborah Carvalho Malta, Abdullah A. Mamun, Ana-Laura Manda, Helena Manguerra, Treh Manhertz, Mohammad Ali Mansournia, Lorenzo Giovanni Mantovani, Chabila Christopher Mapoma, Joemer C. Maravilla, Wagner Marcenes, Ashley Marks, Francisco Rogerlândio Martins-Melo, Ira Martopullo, Winfried März, Melvin B. Marzan, Tivani Phosa Mashamba-Thompson, Benjamin Ballard Massenburg, Manu Raj Mathur, Kunihiro Matsushita, Pallab K. Maulik, Mohsen Mazidi, Colm McAlinden, John J. McGrath, Martin McKee, Man Mohan Mehndiratta, Ravi Mehrotra, Kala M. Mehta, Varshil Mehta, Fabiola Mejia-Rodriguez, Tesfa Mekonen, Addisu Melese, Mulugeta Melku, Michele Meltzer, Peter T. N. Memiah, Ziad A. Memish, Walter Mendoza, Desalegn Tadese Mengistu, Getnet Mengistu, George A. Mensah, Seid Tiku Mereta, Atte Meretoja, Tuomo J. Meretoja, Tomislav Mestrovic, Naser Mohammad Gholi Mezerji, Bartosz Miazgowski, Tomasz Miazgowski, Anoushka I. Milllear, Ted R. Miller, Benjamin Miltz, G. K. Mini, Mojde Mirarefin, Erkin M. Mirakhimov, Awoke Temesgen Misganaw, Philip B. Mitchell, Habtamu Mitiku, Babak Moazen, Bahram Mohajer, Karzan Abdulmuhsin Mohammad, Noushin Mohammadifard, Mousa Mohammadnia-Afrouzi, Mohammed A. Mohammed, Shafiu Mohammed, Farnam Mohebi, Modhurima Moitra, Ali H. Mokdad, Mariam Molokhia, Lo-

renzo Monasta, Yoshan Moodley, Mahmood Moosazadeh, Ghobad Moradi, Maziar Moradi-Lakeh, Mehdi Moradinazar, Paula Moraga, Lidia Morawska, Ilais Moreno Velásquez, Joana Morgado-Da-Costa, Shane Douglas Morrison, Marilita M. Moschos, W. Cliff Mountjoy-Venning, Seyyed Meysam Mousavi, Kalayu Brhane Mruts, Ache- nef Asmamaw Muche, Kindie Fentahun Muchie, Ulrich Otto Muel- ler, Oumer Sada Muhammed, Satinath Mukhopadhyay, Kate Mul- ler, John Everett Mumford, Manoj Murhekar, Jonah Musa, Kama- rul Imran Musa, Ghulam Mustafa, Ashraf F. Nabhan, Chie Nagata, Mohsen Naghavi, Aliya Naheed, Azin Nahvijou, Gurudatta Naik, Ni- tish Naik, Farid Najafi, Luigi Naldi, Hae Sung Nam, Vinay Nangia, Jobert Richie Nansseu, Bruno Ramos Nascimento, Gopalakrishnan Natarajan, Nahid Neamati, Ionut Negoï, Ruxandra Irina Negoï, Sub- as Neupane, Charles Richard James Newton, Josephine W. Ngun- jiri, Anh Quynh Nguyen, Ha Thu Nguyen, Huong Lan Thi Nguyen, Huong Thanh Nguyen, Long Hoang Nguyen, Minh Nguyen, Nam Ba Nguyen, Son Hoang Nguyen, Emma Nichols, Dina Nur Anggraini Ningrum, Molly R. Nixon, Nomonde Nolutshungu, Shuhei Nomura, Ole F. Norheim, Mehdi Noroozi, Bo Norrving, Jean Jacques Nou- biap, Hamid Reza Nouri, Malihe Nourollahpour Shiadeh, Moham- mad Reza Nowroozi, Elaine O. Nsoesie, Peter S. Nyasulu, Christo- pher M. Odell, Richard Ofori-Asenso, Felix Akpojene Ogbo, In-Hwan Oh, Olanrewaju Oladimeji, Andrew T. Olagunju, Tinuke O. Olagun- ju, Pedro R. Olivares, Helen Elizabeth Olsen, Bolajoko Olubukuno- la Olusanya, Kanyin L. Ong, Sok King Ong, Eyal Oren, Alberto Or- tiz, Erika Ota, Stanislav S. Otstavnov, Simon Øverland, Mayowa Ojo Owolabi, Mahesh P A, Rosana Pacella, Amir H. Pakpour, Adrian Pa- na, Songhomitra Panda-Jonas, Andrea Parisi, Eun-Kee Park, Charles D. H. Parry, Shanti Patel, Sanghamitra Pati, Snehal T. Patil, Ajay Patle, George C. Patton, Vishnupriya Rao Paturi, Katherine R. Paul- son, Neil Pearce, David M. Pereira, Norberto Perico, Konrad Pesu- dovs, Hai Quang Pham, Michael R. Phillips, David M. Pigott, Juli- an David Pillay, Michael A. Piradov, Meghdad Pirsaeheb, Farhad Pish-

gar, Oleguer Plana-Ripoll, Dietrich Plass, Suzanne Polinder, Svetlana Popova, Maarten J. Postma, Akram Pourshams, Hossein Poustchi, Dorairaj Prabhakaran, Swayam Prakash, V. Prakash, Caroline A. Purcell, Manorama B. Purwar, Mostafa Qorbani, D. Alex Quistberg, Amir Radfar, Anwar Rafay, Alireza Rafiei, Fakher Rahim, Kazem Rahimi, Afarin Rahimi-Movaghar, Vafa Rahimi-Movaghar, Mahfuzar Rahman, Mohammad Hifz ur Rahman, Muhammad Aziz Rahman, Sajjad Ur Rahman, Rajesh Kumar Rai, Fatemeh Rajati, Usha Ram, Prabhat Ranjan, Anna Ranta, Puja C. Rao, David Laith Rawaf, Salman Rawaf, K. Srinath Reddy, Robert C. Reiner, Nickolas Reinig, Marissa Bettay Reitsma, Giuseppe Remuzzi, Andre M. N. Renzaho, Serge Resnikoff, Satar Rezaei, Mohammad Sadegh Rezai, Antonio Luiz P. Ribeiro, Nicholas L. S. Roberts, Stephen R. Robinson, Leonardo Roever, Luca Ronfani, Gholamreza Roshandel, Ali Rostami, Gregory A. Roth, Ambuj Roy, Enrico Rubagotti, Perminder S. Sachdev, Nafis Sadat, Basema Saddik, Ehsan Sadeghi, Sahar Saeedi Moghaddam, Hosein Safari, Yahya Safari, Roya Safari-Faramani, Mahdi Safdarian, Sare Safi, Saeid Safiri, Rajesh Sagar, Amirhossein Sahabkar, Mohammad Ali Sahraian, Haniye Sadat Sajadi, Nasir Salam, Joseph S. Salama, Payman Salamati, Komal Saleem, Zikria Saleem, Yahya Salimi, Joshua A. Salomon, Sundeep Santosh Salvi, Inbal Salz, Abdallah M. Samy, Juan Sanabria, Yingying Sang, Damian Francesco Santomauro, Itamar S. Santos, João Vasco Santos, Milena M. Santric Milicevic, Bruno Piassi Sao Jose, Mayank Sardana, Abdur Razzaque Sarker, Nizal Sarrafzadegan, Benn Sartorius, Shahabeddin Sarvi, Brijesh Sathian, Maheswar Satpathy, Arundhati R. Sawant, Monika Sawhney, Sonia Saxena, Mete Saylan, Elke Schaeffner, Maria Inês Schmidt, Ione J. C. Schneider, Ben Schöttker, David C. Schwebel, Falk Schwendicke, James G. Scott, Mario Sekerija, Sadaf G. Sepanlou, Edson Serván-Mori, Seyedmojtaba Seyedmousavi, Hossein Shabaninejad, Azadeh Shafieesabet, Mehdi Shahbazi, Amira A. Shaheen, Masood Ali Shaikh, Mehran Shams-Beyranvand, Mohammadbagher Shamsi, Morteza Shamsizadeh, Heidar Sharafi, Kiomars

Sharafi, Mehdi Sharif, Mahdi Sharif-Alhoseini, Meenakshi Sharma, Rajesh Sharma, Jun She, Aziz Sheikh, Peilin Shi, Kenji Shibuya, Mi-ka Shigematsu, Rahman Shiri, Reza Shirkoohi, Kawkab Shishani, Ivy Shiue, Farhad Shokraneh, Haitham Shoman, Mark G. Shrime, Si Si, Soraya Siabani, Tariq J. Siddiqi, Inga Dora Sigfusdottir, Rannveig Sigurvinsdottir, João Pedro Silva, Dayane Gabriele Alves Silveira, Narayana Sarma Venkata Singam, Jasvinder A. Singh, Narinder Pal Singh, Virendra Singh, Dhirendra Narain Sinha, Eirini Skiadaresi, Erica Leigh N. Slepak, Karen Sliwa, David L. Smith, Mari Smith, Adauto Martins Soares Filho, Badr Hasan Sobaih, Soheila Sobhani, Eugène Sobngwi, Samir S. Soneji, Moslem Soofi, Masoud Soosaraei, Reed J. D. Sorensen, Joan B. Soriano, Ireneous N. Soyiri, Luciano A. Sposato, Chandrashekhar T. Sreeramareddy, Vinay Srinivasan, Jeffrey D. Stanaway, Dan J. Stein, Caitlyn Steiner, Timothy J. Steiner, Mark A. Stokes, Lars Jacob Stovner, Michelle L. Subart, Agus Sudaryanto, Mu'awiyah Babale Sufiyan, Bruno F. Sunguya, Patrick John Sur, Ipsita Sutradhar, Bryan L. Sykes, Dillon O. Sylte, Rafael Tabarés-Seisdedos, Santosh Kumar Tadakamadla, Birkneh Tilahun Tadesse, Nikhil Tandon, Segen Gebremeskel Tassew, Mohammad Tavakoli, Nuno Taveira, Hugh R. Taylor, Arash Tehrani-Banihashemi, Tigist Gashaw Tekalign, Shishay Wahdey Tekelemedhin, Merhawi Gebremedhin Tekle, Habtamu Temesgen, Mohamad-Hani Temsah, Omar Temsah, Abdullah Sulieman Terkawi, Mebrahtu Teweldemedhin, Kavumpurathu Raman Thankappan, Nihal Thomas, Binyam Tilahun, Quyen G. To, Marcello Tonelli, Roman Topor-Madry, Fotis Topouzis, Anna E. Torre, Miguel Tortajada-Girbés, Mathilde Touvier, Marcos Roberto Tovani-Palone, Jeffrey A. Towbin, Bach Xuan Tran, Khanh Bao Tran, Christopher E. Troeger, Thomas Clement Truelsen, Miltiadis K. Tsilimbaris, Derrick Tsoi, Lorraine Tudor Car, E. Murat Tuzcu, Kingsley N. Ukwaja, Irfan Ullah, Eduardo A. Undurraga, Jürgen Unutzer, Rachel L. Updike, Muhammad Shariq Usman, Olalekan A. Uthman, Muthiah Vaduganathan, Afsane Vaezi, Pascual R. Valdez, Santosh Varughese, Tommi Juhani Vasankari, Narayanas-

wamy Venketasubramanian, Santos Villafaina, Francesco S. Violante, Sergey Konstantinovitch Vladimirov, Vasily Vlassov, Stein Emil Vollset, Kia Vosoughi, Isidora S. Vujcic, Fasil Shiferaw Wagnew, Yasar Waheed, Stephen G. Waller, Yafeng Wang, Yuan-Pang Wang, Elisabete Weiderpass, Robert G. Weintraub, Daniel J. Weiss, Fitsum Weldegebreal, Kidu Gidey Weldegwergs, Andrea Werdecker, T. Eoin West, Harvey A. Whiteford, Justyna Widecka, Tissa Wijerathne, Lauren B. Wilner, Shadrach Wilson, Andrea Sylvia Winkler, Alison B. Wiyeh, Charles Shey Wiysonge, Charles D. A. Wolfe, Anthony D. Woolf, Shouling Wu, Yun-Chun Wu, Grant M. A. Wyper, Denis Xavier, Gelin Xu, Simon Yadgir, Ali Yadollahpour, Seyed Hossein Yahyazadeh Jabbari, Tomohide Yamada, Lijing L. Yan, Yuichiro Yano, Mehdi Yaseri, Yasin Jemal Yasin, Alex Yeshaneh, Ebrahim M. Yimer, Paul Yip, Engida Yisma, Naohiro Yonemoto, Seok-Jun Yoon, Marcel Yotebieng, Mustafa Z. Younis, Mahmoud Yousefifard, Chuanhua Yu, Vesna Zadnik, Zoubida Zaidi, Sojib Bin Zaman, Mohammad Zamani, Zohreh Zare, Ayalew Jejaw Zeleke, Zerihun Menlkalew Zenebe, Kai Zhang, Zheng Zhao, Maigeng Zhou, Sanjay Zodpey, Inbar Zucker, Theo Vos, and Christopher J. L. Murray. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the global burden of disease study 2017. *The Lancet*, 392(10159):1789–1858, 2018.

- [74] Sabzali Javadov, Venkatesh Rajapurohitam, Ana Kilić, J. Craig Hunter, Asad Zeidan, Nazo Said Faruq, Nelson Escobales, and Morris Karmazyn. Expression of mitochondrial fusion-fission proteins during post-infarction remodeling: the effect of nhe-1 inhibition. *Basic research in cardiology*, 106(1):99–109, 2011.
- [75] Märit Jensen, Christian Müller, Chi-Un Choe, Edzard Schwedhelm, and Tanja Zeller. Analysis of l-arginine:glycine amidinotransferase-, creatine- and homoarginine-dependent gene regulation in the murine heart. *Scientific Reports*, 10(1):4821, 2020.

- [76] Hao Jiang, Daile Jia, Beijian Zhang, Wenlong Yang, Zhen Dong, Xiaolei Sun, Xiaotong Cui, Leilei Ma, Jian Wu, Kai Hu, Aijun Sun, and Junbo Ge. Exercise improves cardiac function and glucose metabolism in mice with experimental myocardial infarction through inhibiting hdac4 and upregulating glut1 expression. *Basic research in cardiology*, 115(3):28, 2020.
- [77] E. Jozefczuk, T. J. Guzik, and M. Siedlinski. Significance of sphingosine-1-phosphate in cardiovascular physiology and pathology. *Pharmacological Research*, 156:104793, 2020.
- [78] H. Kainulainen, M. Breiner, A. SCHURMANN, A. Marttinen, A. Virjo, and H. JOOST. In vivo glucose uptake and glucose transporter proteins glut1 and glut4 in heart and various types of skeletal muscle from streptozotocin-diabetic rats. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1225(3):275–282, 1994.
- [79] R. Kanyo, D. M. Price, C. L. Chik, and A. K. Ho. Salt-inducible kinase 1 in the rat pinealocyte: adrenergic regulation and role in arylalkylamine n-acetyltransferase gene transcription. *Endocrinology*, 150(9):4221–4230, 2009.
- [80] Georgios Karamanlidis, Luigino Nascimben, Gregory S. Couper, Prem S. Shekar, Federica del Monte, and Rong Tian. Defective dna replication impairs mitochondrial biogenesis in human failing hearts. *Circulation research*, 106(9):1541–1548, 2010.
- [81] Yoshiko Katoh, Hiroshi Takemori, Nanao Horike, Junko Doi, Masaki Muraoka, Li Min, and Mitsuhiro Okamoto. Salt-inducible kinase (sik) isoforms: their involvement in steroidogenesis and adipogenesis. *Molecular and cellular endocrinology*, 217(1-2):109–112, 2004.
- [82] Simon Kennedy, Kathleen A. Kane, Nigel J. Pyne, and Susan Pyne. Targeting sphingosine-1-phosphate signalling for cardioprotection. *Current opinion in pharmacology*, 9(2):194–201, 2009.

- [83] Petra Keul, Susann Lucke, Karin von Wnuck Lipinski, Constan-tin Bode, Markus Gräler, Gerd Heusch, and Bodo Levkau. Sphingosine-1-phosphate receptor 3 promotes recruitment of mono-cyte/macrophages in inflammation and atherosclerosis. *Circula-tion research*, 108(3):314–323, 2011.
- [84] Girish Kewalramani, Ding An, Min Suk Kim, Sanjoy Ghosh, Dake Qi, Ashraf Abrahami, Thomas Pulinilkunnil, Vijay Sharma, Richard B. Wambolt, Michael F. Allard, Sheila M. Innis, and Brian Rodrigues. Ampk control of myocardial fatty acid metabolism fluctuates with the intensity of insulin-deficient diabetes. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 42(2):333–342, 2007.
- [85] Geun Hyang Kim, Andras Szabo, Emily M. King, Jennifer Ayala, Ju-lio E. Ayala, and Judith Y. Altarejos. Leptin recruits creb-regulated transcriptional coactivator 1 to improve hyperglycemia in insulin-deficient diabetes. *Molecular metabolism*, 4(3):227–236, 2015.
- [86] Hwjin Kim. The transcription cofactor crtc1 protects from aberrant hepatic lipid accumulation. *Scientific Reports*, 6(1):37280, 2016.
- [87] Maengjo Kim, Roger W. Hunter, Lorena Garcia-Menendez, Guo-hua Gong, Yu-Ying Yang, Stephen C. Kolwicz, Jason Xu, Kei Saka-moto, Wang Wang, and Rong Tian. Mutation in the γ 2-subunit of amp-activated protein kinase stimulates cardiomyocyte proliferati-on and hypertrophy independent of glycogen storage. *Circulation research*, 114(6):966–975, 2014.
- [88] Maengjo Kim, Mei Shen, Soeun Ngoy, Georgios Karamanlidis, Ron-glih Liao, and Rong Tian. Ampk isoform expression in the normal and failing hearts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 52(5):1066–1073, 2012.
- [89] Mi Ok Kim, Yu Jin Lee, Jae Hong Park, Jung Min Ryu, Seung Pil Yun, and Ho Jae Han. Pka and camp stimulate proliferation of mouse embryonic stem cells by elevating glut1 expression mediated by the

- nf- κ b and creb/cbp signaling pathways. *Biochimica et biophysica acta*, 1820(10):1636–1646, 2012.
- [90] Stephen C. Kolwicz, Suneet Purohit, and Rong Tian. Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes. *Circulation research*, 113(5):603–616, 2013.
- [91] Mari Kono, Yide Mi, Yujing Liu, Teiji Sasaki, Maria Laura Allende, Yun-Ping Wu, Tadashi Yamashita, and Richard L. Proia. The sphingosine-1-phosphate receptors s1p1, s1p2, and s1p3 function coordinately during embryonic angiogenesis. *The Journal of biological chemistry*, 279(28):29367–29373, 2004.
- [92] Seung-Hoi Koo, Lawrence Flechner, Ling Qi, Xinmin Zhang, Robert A. Screatton, Shawn Jeffries, Susan Hedrick, Wu Xu, Fayçal Boussouar, Paul Brindle, Hiroshi Takemori, and Marc Montminy. The creb coactivator torc2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature*, 437(7062):1109–1111, 2005.
- [93] C. Korvald, O. P. Elvenes, and T. Myrnel. Myocardial substrate metabolism influences left ventricular energetics in vivo. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 278(4):H1345–51, 2000.
- [94] Bernard Korzeniewski, Véronique Deschodt-Arsac, Guillaume Calmettes, Jean-Michel Franconi, and Philippe Diolez. Physiological heart activation by adrenaline involves parallel activation of atp usage and supply. *The Biochemical journal*, 413(2):343–347, 2008.
- [95] Krisztián A. Kovács, Pascal Steullet, Myriam Steinmann, Kim Q. Do, Pierre J. Magistretti, Olivier Halfon, and Jean-René Cardinaux. Torc1 is a calcium- and camp-sensitive coincidence detector involved in hippocampal long-term synaptic plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(11):4700–4705, 2007.

- [96] Olli Kärkkäinen, Tomi Tuomainen, Maija Mutikainen, Marko Lehtonen, Jorge L. Ruas, Kati Hanhineva, and Pasi Tavi. Heart specific *pgc-1 α* deletion identifies metabolome of cardiac restricted metabolic heart failure. *Cardiovascular research*, 115(1):107–118, 2019.
- [97] Monika Książek, Marta Chacińska, Adrian Chabowski, and Marcin Baranowski. Sources, metabolism, and regulation of circulating sphingosine-1-phosphate. *Journal of lipid research*, 56(7):1271–1281, 2015.
- [98] A. Kumar and V. Lindner. Remodeling with neointima formation in the mouse carotid artery after cessation of blood flow. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 17(10):2238–2244, 1997.
- [99] George H. Kunkel, Christopher J. Kunkel, Hazel Ozuna, Irina Miralda, and Suresh C. Tyagi. *Tfam* overexpression reduces pathological cardiac remodeling. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 454(1-2):139–152, 2019.
- [100] Koichiro Kuwahara, Yoshihiko Saito, Makoto Takano, Yuji Arai, Shinji Yasuno, Yasuaki Nakagawa, Nobuki Takahashi, Yuichiro Adachi, Genzo Takemura, Minoru Horie, Yoshihiro Miyamoto, Takayuki Morisaki, Shinobu Kuratomi, Akinori Noma, Hisayoshi Fujiwara, Yasunao Yoshimasa, Hideyuki Kinoshita, Rika Kawakami, Ichiro Kishimoto, Michio Nakanishi, Satoru Usami, Yoshitomo Saito, Masaki Harada, and Kazuwa Nakao. *Nrsf* regulates the fetal cardiac gene program and maintains normal cardiac structure and function. *The EMBO journal*, 22(23):6310–6321, 2003.
- [101] Vanisha Lakhina and Coleen T. Murphy. For longevity, perception is everything. *Cell*, 160(5):807–809, 2015.
- [102] N. G. Larsson, J. Wang, H. Wilhelmsson, A. Oldfors, P. Rustin, M. Lewandoski, G. S. Barsh, and D. A. Clayton. Mitochondrial transcription factor *a* is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nature Genetics*, 18(3):231–236, 1998.

- [103] D. R. Laybutt, A. L. Thompson, G. J. Cooney, and E. W. Kraegen. Selective chronic regulation of glut1 and glut4 content by insulin, glucose, and lipid in rat cardiac muscle in vivo. *The American journal of physiology*, 273(3 Pt 2):H1309–16, 1997.
- [104] J. J. Lehman, P. M. Barger, A. Kovacs, J. E. Saffitz, D. M. Medeiros, and D. P. Kelly. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 106(7):847–856, 2000.
- [105] Pei Li, Jing Wang, Xia Zhao, Jing Ru, Tian Tian, Yun An, Liying Tang, and Yuzhi Bai. Pten inhibition attenuates endothelial cell apoptosis in coronary heart disease via modulating the ampk-creb-mfn2-mitophagy signaling pathway. *Journal of Cellular Physiology*, 235(5):4878–4889, 2020.
- [106] Marc Liesa, Manuel Palacín, and Antonio Zorzano. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiological reviews*, 89(3):799–845, 2009.
- [107] Wen Liu, Dandan Sun, and Jun Yang. Diastolic dysfunction of hypertrophic cardiomyopathy genotype-positive subjects without hypertrophy is detected by tissue doppler imaging: A systematic review and meta-analysis. *Journal of ultrasound in medicine : official journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine*, 36(10):2093–2103, 2017.
- [108] Maria Lombardi, Davide Lazzeroni, Annalinda Pisano, Francesca Girolami, Ottavio Alfieri, Giovanni La Canna, Giulia d’Amati, Iacopo Olivotto, Ornella E. Rimoldi, Chiara Foglieni, and Paolo G. Camici. Mitochondrial energetics and ca²⁺-activated atpase in obstructive hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of clinical medicine*, 9(6), 2020.
- [109] Gary D. Lopaschuk and Jagdip S. Jaswal. Energy metabolic phenotype of the cardiomyocyte during development, differentiation,

- and postnatal maturation. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 56(2):130–140, 2010.
- [110] Rachel Lopez, Bahador Marzban, Xin Gao, Ellen Lauinger, Françoise van den Bergh, Steven E. Whitesall, Kimber Converso-Baran, Charles F. Burant, Daniel E. Michele, and Daniel A. Beard. Impaired myocardial energetics causes mechanical dysfunction in decompensated failing hearts. *Function (Oxford, England)*, 1(2):zqaa018, 2020.
- [111] O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 193(1):265–275, 1951.
- [112] Yingchang Lu, Felix R. Day, Stefan Gustafsson, Martin L. Buchkovich, Jianbo Na, Veronique Bataille, Diana L. Cousminer, Zari Dastani, Alexander W. Drong, Tõnu Esko, David M. Evans, Mario Falchi, Mary F. Feitosa, Teresa Ferreira, Åsa K. Hedman, Robin Haring, Pirro G. Hysi, Mark M. Iles, Anne E. Justice, Stavroula Kanoni, Vasiliki Lagou, Rui Li, Xin Li, Adam Locke, Chen Lu, Reedik Mägi, John R. B. Perry, Tune H. Pers, Qibin Qi, Marianna Sanna, Ellen M. Schmidt, William R. Scott, Dmitry Shungin, Alexander Teumer, Anna A. E. Vinkhuyzen, Ryan W. Walker, Harm-Jan Westra, Mingfeng Zhang, Weihua Zhang, Jing Hua Zhao, Zhihong Zhu, Uzma Afzal, Tarunveer Singh Ahluwalia, Stephan J. L. Bakker, Claire Bellis, Amélie Bonnefond, Katja Borodulin, Aron S. Buchman, Tommy Cedersholm, Audrey C. Choh, Hyung Jin Choi, Joanne E. Curran, Lisette C. P. G. M. de Groot, Philip L. de Jager, Rosalie A. M. Dhonukshe-Rutten, Anke W. Enneman, Elodie Eury, Daniel S. Evans, Tom Forsen, Nelle Friedrich, Frédéric Fumeron, Melissa E. Garcia, Simone Gärtner, Bok-Ghee Han, Aki S. Havulinna, Caroline Hayward, Dena Hernandez, Hans Hillege, Till Ittermann, Jack W. Kent, Ivana Kolcic, Tiina Laatikainen, Jari Lahti, Irene Mateo Leach, Christine G. Lee, Jong-Young Lee, Tian Liu, Youfang Liu, Stéphane Lobbens, Marie Loh,

Leo-Pekka Lyytikäinen, Carolina Medina-Gomez, Karl Michaëlsson, Mike A. Nalls, Carrie M. Nielson, Laticia Oozageer, Laura Pascoe, Lavinia Paternoster, Ozren Polašek, Samuli Ripatti, Mark A. Sarzynski, Chan Soo Shin, Nina Smolej Narančić, Dominik Spira, Priya Srikanth, Elisabeth Steinhausen-Thiessen, Yun Ju Sung, Karin M. A. Swart, Leena Taittonen, Toshiko Tanaka, Emmi Tikkanen, Nathalie van der Velde, Natasja M. van Schoor, Niek Verweij, Alan F. Wright, Lei Yu, Joseph M. Zmuda, Niina Eklund, Terrence Forrester, Niels Grarup, Anne U. Jackson, Kati Kristiansson, Teemu Kuulasmaa, Johanna Kuusisto, Peter Lichtner, Jian'an Luan, Anubha Mahajan, Satu Männistö, Cameron D. Palmer, Janina S. Ried, Robert A. Scott, Alena Stancáková, Peter J. Wagner, Ayse Demirkan, Angela Döring, Vilmundur Gudnason, Douglas P. Kiel, Brigitte Kühnel, Massimo Mangino, Barbara Mcknight, Cristina Menni, Jeffrey R. O'Connell, Ben A. Oostra, Alan R. Shuldiner, Kijoung Song, Liesbeth Vandenput, Cornelia M. van Duijn, Peter Vollenweider, Charles C. White, Michael Boehnke, Yvonne Boettcher, Richard S. Cooper, Nita G. Forouhi, Christian Gieger, Harald Grallert, Aroon Hingorani, Torben Jørgensen, Pekka Jousilahti, Mika Kivimäki, Meena Kumari, Markku Laakso, Claudia Langenberg, Allan Linneberg, Amy Luke, Colin A. McKenzie, Aarno Palotie, Oluf Pedersen, Annette Peters, Konstantin Strauch, Bamidele O. Tayo, Nicholas J. Wareham, David A. Bennett, Lars Bertram, John Blangero, Matthias Blüher, Claude Bouchard, Harry Campbell, Nam H. Cho, Steven R. Cummings, Stefan A. Czerwinski, Ilja Demuth, Rahel Eckardt, Johan G. Eriksson, Luigi Ferrucci, Oscar H. Franco, Philippe Froguel, Ron T. Gansevoort, Torben Hansen, Tamara B. Harris, Nicholas Hastie, Markku Heliövaara, Albert Hofman, Joanne M. Jordan, Antti Jula, Mika Kähönen, Eero Kajantie, Paul B. Knekt, Seppo Koskinen, Peter Kovacs, Terho Lehtimäki, Lars Lind, Yongmei Liu, Eric S. Orwoll, Clive Osmond, Markus Perola, Louis Pérusse, Olli T. Raitakari, Tuomo Rankinen, D. C. Rao, Treva K. Rice, Fernando Rivadeneira, Igor Rudan, Veikko Salomaa, Thorkild I. A. Sørensen, Michael Stumvoll, Anke Tönjes, Bradford Towne, Grego-

- ry J. Tranah, Angelo Tremblay, André G. Uitterlinden, Pim van der Harst, Erkki Vartiainen, Jorma S. Viikari, Veronique Vitart, Marie-Claude Vohl, Henry Völzke, Mark Walker, Henri Wallaschofski, Sarah Wild, James F. Wilson, Loïc Yengo, D. Timothy Bishop, Ingrid B. Borecki, John C. Chambers, L. Adrienne Cupples, Abbas Dehghan, Panos Deloukas, Ghazaleh Fatemifar, Caroline Fox, Terrence S. Furey, Lude Franke, Jiali Han, David J. Hunter, Juha Karjalainen, Fredrik Karpe, Robert C. Kaplan, Jaspal S. Kooner, Mark I. McCarthy, Joanne M. Murabito, Andrew P. Morris, Julia A. N. Bishop, Kari E. North, Claes Ohlsson, Ken K. Ong, Inga Prokopenko, J. Brent Richards, Eric E. Schadt, Tim D. Spector, Elisabeth Widén, Cristen J. Willer, Jian Yang, Erik Ingelsson, Karen L. Mohlke, Joel N. Hirschhorn, John Andrew Pospisilik, M. Carola Zillikens, Cecilia Lindgren, Tuomas Oskari Kilpeläinen, and Ruth J. F. Loos. New loci for body fat percentage reveal link between adiposity and cardiometabolic disease risk. *Nature Communications*, 7(1):10495, 2016.
- [113] Floriana S. Luppino, Leonore M. de Wit, Paul F. Bouvy, Theo Stijnen, Pim Cuijpers, Brenda W. J. H. Penninx, and Frans G. Zitman. Overweight, obesity, and depression: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Archives of General Psychiatry*, 67(3):220–229, 2010.
- [114] Christoph Maack. Orphaned mitochondria in heart failure. *Cardiovascular research*, 109(1):6–8, 2016.
- [115] Christoph Maack, Sonia Cortassa, Miguel A. Aon, Anand N. Ganesan, Ting Liu, and Brian O'Rourke. Elevated cytosolic na^+ decreases mitochondrial ca^{2+} uptake during excitation-contraction coupling and impairs energetic adaptation in cardiac myocytes. *Circulation research*, 99(2):172–182, 2006.
- [116] Michael Maceyka, Kuzhuvilil B. Harikumar, Sheldon Milstien, and Sarah Spiegel. Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends in Cell Biology*, 22(1):50–60, 2012.

- [117] Michael Maceyka, Heidi Sankala, Nitai C. Hait, Hervé Le Stunff, Hong Liu, Rachele Toman, Claiborne Collier, Min Zhang, Leslie S. Satin, Alfred H. Merrill, Sheldon Milstien, and Sarah Spiegel. Sphk1 and sphk2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. *The Journal of biological chemistry*, 280(44):37118–37129, 2005.
- [118] Marjorie Maillet, Jop H. van Berlo, and Jeffery D. Molkentin. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(1):38–48, 2013.
- [119] Barry J. Maron and Carolyn Y. Ho. Hypertrophic cardiomyopathy without hypertrophy: an emerging pre-clinical subgroup composed of genetically affected family members. *JACC. Cardiovascular imaging*, 2(1):65–68, 2009.
- [120] Keith S. Mascal, Gary R. Small, George Gibson, and Graeme F. Nixon. Sphingosine-1-phosphate-induced release of timp-2 from vascular smooth muscle cells inhibits angiogenesis. *Journal of Cell Science*, 125(Pt 9):2267–2275, 2012.
- [121] Fiona A. Mathieson and Graeme F. Nixon. Sphingolipids differentially regulate mitogen-activated protein kinases and intracellular ca^{2+} in vascular smooth muscle: effects on creb activation. *British Journal of Pharmacology*, 147(4):351–359, 2006.
- [122] M. Mattie, G. Brooker, and S. Spiegel. Sphingosine-1-phosphate, a putative second messenger, mobilizes calcium from internal stores via an inositol trisphosphate-independent pathway. *The Journal of biological chemistry*, 269(5):3181–3188, 1994.
- [123] Leena Mela and Steven Seitz. [4] isolation of mitochondria with emphasis on heart mitochondria from small amounts of tissue. In

Methods in Enzymology : Biomembranes Part F: Bioenergetics: Oxidative Phosphorylation, volume 55, pages 39–46. Academic Press, 1979.

- [124] Michelle Michels, Osama I. I. Soliman, Marcel J. Kofflard, Yvonne M. Hoedemaekers, Dennis Dooijes, Danielle Majoor-Krakauer, and Folkert J. ten Cate. Diastolic abnormalities as the first feature of hypertrophic cardiomyopathy in dutch myosin-binding protein c founder mutations. *JACC. Cardiovascular imaging*, 2(1):58–64, 2009.
- [125] Naoki Mizutani, Yukari Omori, Koji Tanaka, Hiromi Ito, Akira Takagi, Tetsuhito Kojima, Masahiro Nakatochi, Hideo Ogiso, Yoshiyuki Kawamoto, Mitsuhiro Nakamura, Motoshi Suzuki, Mamoru Kyogashima, Keiko Tamiya-Koizumi, Yoshinori Nozawa, and Takashi Murate. Increased sphk2 transcription of human colon cancer cells in serum-depleted culture: The involvement of creb transcription factor. *Journal of Cellular Biochemistry*, 116(10):2227–2238, 2015.
- [126] Karoline Morhenn. *The role of the transcriptional coactivator CRT1 in the development of cardiac hypertrophy in mice*. PhD thesis, 2016.
- [127] Karoline Morhenn, Thomas Quentin, Helen Wichmann, Michael Steinmetz, Maksymilian Prondzynski, Klaus-Dieter Söhren, Torsten Christ, Birgit Geertz, Sabine Schröder, Friedrich A. Schöndube, Gerd Hasenfuss, Saskia Schlossarek, Wolfram H. Zimmermann, Lucie Carrier, Thomas Eschenhagen, Jean-René Cardinaux, Susanne Lutz, and Elke Oetjen. Mechanistic role of the creb-regulated transcription coactivator 1 in cardiac hypertrophy. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 127:31–43, 2019.
- [128] Kazuo Murakami, Yuji Shigematsu, Mareomi Hamada, and Jitsuo Higaki. Insulin resistance in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*, 68(7):650–655, 2004.

- [129] S. F. Nagueh, L. L. Bachinski, D. Meyer, R. Hill, W. A. Zoghbi, J. W. Tam, M. A. Quiñones, R. Roberts, and A. J. Marian. Tissue doppler imaging consistently detects myocardial abnormalities in patients with hypertrophic cardiomyopathy and provides a novel means for an early diagnosis before and independently of hypertrophy. *Circulation*, 104(2):128–130, 2001.
- [130] S. F. Nagueh, H. A. Kopelen, D. S. Lim, W. A. Zoghbi, M. A. Quiñones, R. Roberts, and A. J. Marian. Tissue doppler imaging consistently detects myocardial contraction and relaxation abnormalities, irrespective of cardiac hypertrophy, in a transgenic rabbit model of human hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*, 102(12):1346–1350, 2000.
- [131] Michinari Nakamura and Junichi Sadoshima. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nature Reviews Cardiology*, 15(7):387–407, 2018.
- [132] S. Neubauer, M. Horn, M. Cramer, K. Harre, J. B. Newell, W. Peters, T. Pabst, G. Ertl, D. Hahn, J. S. Ingwall, and K. Kochsiek. Myocardial phosphocreatine-to-atp ratio is a predictor of mortality in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 96(7):2190–2196, 1997.
- [133] Jason Newton, Santiago Lima, Michael Maceyka, and Sarah Spiegel. Revisiting the sphingolipid rheostat: Evolving concepts in cancer therapy. *Experimental Cell Research*, 333(2):195–200, 2015.
- [134] Alexander G. Nickel, Albrecht von Hardenberg, Mathias Hohl, Joachim R. Löffler, Michael Kohlhaas, Janne Becker, Jan-Christian Reil, Andrey Kazakov, Julia Bonnekoh, Moritz Stadelmaier, Sarah-Lena Puhl, Michael Wagner, Ivan Bogeski, Sonia Cortassa, Reinhard Kappl, Bastian Pasieka, Michael Lafontaine, C. Roy D. Lancaster, Thomas S. Blacker, Andrew R. Hall, Michael R. Duchon, Lars Kästner, Peter Lipp, Tanja Zeller, Christian Müller, Andreas Knopp, Ulrich Laufs, Michael Böhm, Markus Hoth, and Christoph Maack. Re-

- versal of mitochondrial transhydrogenase causes oxidative stress in heart failure. *Cell metabolism*, 22(3):472–484, 2015.
- [135] E. Oetjen, T. Diedrich, A. Eggers, B. Eckert, and W. Knepel. Distinct properties of the camp-responsive element of the rat insulin i gene. *Journal of Biological Chemistry*, 269(43):27036–27044, 1994.
- [136] Shin-ichi Oka, Amira D. Sabry, Keiko M. Cawley, and Junco S. Warren. Multiple levels of pgc-1 α dysregulation in heart failure. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 7:2, 2020.
- [137] Sang-Bing Ong and Derek J. Hausenloy. Mitochondrial morphology and cardiovascular disease. *Cardiovascular research*, 88(1):16–29, 2010.
- [138] Jie Ouyang, Zhihao Shu, Shuhua Chen, Hong Xiang, and Hongwei Lu. The role of sphingosine 1-phosphate and its receptors in cardiovascular diseases. *Journal of cellular and molecular medicine*, 24(18):10290–10301, 2020.
- [139] Sergio Papa, Salvatore Scacco, Domenico de Rasmio, Anna Signorile, Francesco Papa, Damiano Panelli, Annarita Nicastro, Raffaella Scaringi, Arcangela Santeramo, Emilio Roca, Raffaella Trentadue, and Maria Larizza. camp-dependent protein kinase regulates post-translational processing and expression of complex i subunits in mammalian cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1797(6-7):649–658, 2010.
- [140] Christian Pennanen, Valentina Parra, Camila López-Crisosto, Pablo E. Morales, Andrea Del Campo, Tomás Gutierrez, Pablo Rivera-Mejías, Jovan Kuzmicic, Mario Chiong, Antonio Zorzano, Beverly A. Rothermel, and Sergio Lavandero. Mitochondrial fission is required for cardiomyocyte hypertrophy mediated by a ca²⁺-calcineurin signaling pathway. *Journal of Cell Science*, 127(Pt 12):2659–2671, 2014.

- [141] B. W. Penninx, A. T. Beekman, A. Honig, D. J. Deeg, R. A. Schoevers, J. T. van Eijk, and W. van Tilburg. Depression and cardiac mortality: results from a community-based longitudinal study. *Archives of General Psychiatry*, 58(3):221–227, 2001.
- [142] Stuart M. Pitson, Pu Xia, Tamara M. Leclercq, Paul A. B. Moretti, Julia R. Zebol, Helen E. Lynn, Binks W. Wattenberg, and Mathew A. Vadas. Phosphorylation-dependent translocation of sphingosine kinase to the plasma membrane drives its oncogenic signalling. *Journal of Experimental Medicine*, 201(1):49–54, 2005.
- [143] Maksymilian Prondzynski, Giulia Mearini, and Lucie Carrier. Gene therapy strategies in the treatment of hypertrophic cardiomyopathy. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 471(5):807–815, 2019.
- [144] Lei Qiang, Ashley Sample, Christopher R. Shea, Keyoumars Soltani, Kay F. Macleod, and Yu-Ying He. Autophagy gene atg7 regulates ultraviolet radiation-induced inflammation and skin tumorigenesis. *Autophagy*, 13(12):2086–2103, 2017.
- [145] Lina Quteineh, Martin Preisig, Margarita Rivera, Yuri Milaneschi, Enrique Castelao, Mehdi Gholam-Rezaee, Frederik Vandenberghe, Nuria Saigi-Morgui, Aurélie Delacrétaz, Jean-René Cardinaux, Gonneke Willemsen, Dorret I. Boomsma, Brenda W. J. H. Penninx, Ana Ching-López, Philippe Conus, and Chin B. Eap. Association of crtc1 polymorphisms with obesity markers in subjects from the general population with lifetime depression. *Journal of Affective Disorders*, 198:43–49, 2016.
- [146] Rebecca C. Rabinovitch, Bozena Samborska, Brandon Faubert, Eric H. Ma, Simon-Pierre Gravel, Sylvia Andrzejewski, Thomas C. Raissi, Arnim Pause, Julie St-Pierre, and Russell G. Jones. Ampk maintains cellular metabolic homeostasis through regulation of mitochondrial reactive oxygen species. *Cell reports*, 21(1):1–9, 2017.

- [147] Jill A. Rahnert, Bin Zheng, Matthew B. Hudson, Myra E. Woodworth-Hobbs, and S. Russ Price. Glucocorticoids alter crtc-creb signaling in muscle cells: Impact on pgc-1 α expression and atrophy markers. *PLoS one*, 11(7):e0159181, 2016.
- [148] Mitra Rajabi, Christos Kassiotis, Peter Razeghi, and Heinrich Taegtmeyer. Return to the fetal gene program protects the stressed heart: a strong hypothesis. *Heart failure reviews*, 12(3-4):331–343, 2007.
- [149] Tyler P. Rasmussen, Yuejin Wu, Mei-ling A. Joiner, Olha M. Koval, Nicholas R. Wilson, Elizabeth D. Luczak, Qinchuan Wang, Biyi Chen, Zhan Gao, Zhiyong Zhu, Brett A. Wagner, Jamie Soto, Michael L. McCormick, William Kutschke, Robert M. Weiss, Liping Yu, Ryan L. Boudreau, E. Dale Abel, Fenghuang Zhan, Douglas R. Spitz, Garry R. Buettner, Long-Sheng Song, Leonid V. Zingman, and Mark E. Anderson. Inhibition of mcu forces extramitochondrial adaptations governing physiological and pathological stress responses in heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(29):9129–9134, 2015.
- [150] P. Razeghi, M. E. Young, J. L. Alcorn, C. S. Moravec, O. H. Frazier, and H. Taegtmeyer. Metabolic gene expression in fetal and failing human heart. *Circulation*, 104(24):2923–2931, 2001.
- [151] Robert Roberts and Ali J. Marian. Can an energy-deficient heart grow bigger and stronger? **editorials published in the journal of the american college of cardiology reflect the views of the authors and do not necessarily represent the views of jaccor the american college of cardiology. *Journal of the American College of Cardiology*, 41(10):1783–1785, 2003.
- [152] Kerstin Rohde, Maria Keller, Lars La Cour Poulsen, Torunn Rønningen, Michael Stumvoll, Anke Tönjes, Peter Kovacs, Annette Horstmann, Arno Villringer, Matthias Blüher, and Yvonne Böttcher.

- (epi)genetic regulation of *crtc1* in human eating behaviour and fat distribution. *EBioMedicine*, 44:476–488, 2019.
- [153] Stephan Rosenkranz. Tgf-beta1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. *Cardiovascular Research*, 63(3):423–432, 2004.
- [154] Clara Rossetti, Daniel Sciarra, Jean-Marie Petit, Chin B. Eap, Olivier Halfon, Pierre J. Magistretti, Benjamin Boutrel, and Jean-René Cardinaux. Gender-specific alteration of energy balance and circadian locomotor activity in the *crtc1* knockout mouse model of depression. *Translational Psychiatry*, 7(12):1269, 2017.
- [155] David M. Ryba, Chad M. Warren, Chehade N. Karam, Robert T. Davis, Shamim A. K. Chowdhury, Manuel G. Alvarez, Maximilian McCann, Chong Wee Liew, David F. Wiczorek, Peter Varga, R. John Solaro, and Beata M. Wolska. Sphingosine-1-phosphate receptor modulator, fty720, improves diastolic dysfunction and partially reverses atrial remodeling in a *tm-e180g* mouse model linked to hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation. Heart failure*, 12(11):e005835, 2019.
- [156] Jan Rydström. Mitochondrial transhydrogenase—a key enzyme in insulin secretion and, potentially, diabetes. *Trends in biochemical sciences*, 31(7):355–358, 2006.
- [157] M. N. Sack, D. L. Disch, H. A. Rockman, and D. P. Kelly. A role for *sp* and nuclear receptor transcription factors in a cardiac hypertrophic growth program. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(12):6438–6443, 1997.
- [158] Teresa Sanchez and Timothy Hla. Structural and functional characteristics of *s1p* receptors. *Journal of Cellular Biochemistry*, 92(5):913–922, 2004.
- [159] Gabriele G. Schiattarella and Joseph A. Hill. Inhibition of hypertrophy is a good therapeutic strategy in ventricular pressure overload. *Circulation*, 131(16):1435–1447, 2015.

- [160] Robert A. Screatton, Michael D. Conkright, Yoshiko Katoh, Jennifer L. Best, Gianluca Canettieri, Shawn Jeffries, Ernesto Guzman, Sherry Niessen, John R. Yates, Hiroshi Takemori, Mitsuhiro Okamoto, and Marc Montminy. The creb coactivator torc2 functions as a calcium- and camp-sensitive coincidence detector. *Cell*, 119(1):61–74, 2004.
- [161] Lea K. Seidlmayer, Christine Mages, Annette Berbner, Petra Eder-Negrin, Paula Anahi Arias-Loza, Mathias Kaspar, Moshi Song, Gerald W. Dorn, Michael Kohlhaas, Stefan Frantz, Christoph Maack, Brenda Gerull, and Elena N. Dedkova. Mitofusin 2 is essential for ip3-mediated sr/mitochondria metabolic feedback in ventricular myocytes. *Frontiers in physiology*, 10:733, 2019.
- [162] Vasco Sequeira, Edoardo Bertero, and Christoph Maack. Energetic drain driving hypertrophic cardiomyopathy. *FEBS Letters*, 593(13):1616–1626, 2019.
- [163] Vijay Sharma, Pavan Dhillon, Hannah Parsons, Michael F. Allard, and John H. McNeill. Metoprolol represses pgc1alpha-mediated carnitine palmitoyltransferase-1b expression in the diabetic heart. *European Journal of Pharmacology*, 607(1-3):156–166, 2009.
- [164] Freya L. Sheeran, Julie Angerosa, Norman Y. Liaw, Michael M. Cheung, and Salvatore Pepe. Adaptations in protein expression and regulated activity of pyruvate dehydrogenase multienzyme complex in human systolic heart failure. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019:4532592, 2019.
- [165] Linying Shi, Jia Liu, Yuan Zhang, Mulei Chen, and Jiamei Liu. β 1 adrenoceptor antibodies induce myocardial apoptosis via inhibiting pgc-1 α -related pathway. *BMC Cardiovascular Disorders*, 20(1):269, 2020.
- [166] Takuya Shimizu, Allison de Wispelaere, Martin Winkler, Travis D’Souza, Jacob Caylor, Lihua Chen, Frank Dastvan, Jessie Deou, Aesim Cho, Axel Larena-Avellaneda, Michael Reidy, and Guenter

- Daum. Sphingosine-1-phosphate receptor 3 promotes neointimal hyperplasia in mouse iliac-femoral arteries. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 32(4):955–961, 2012.
- [167] Mateusz Siedlinski, Ryszard Nosalski, Piotr Szczepaniak, Agnieszka H. Ludwig-Gałęzowska, Tomasz Mikołajczyk, Magdalena Filip, Grzegorz Osmenda, Grzegorz Wilk, Michał Nowak, Paweł Wołkow, and Tomasz J. Guzik. Vascular transcriptome profiling identifies sphingosine kinase 1 as a modulator of angiotensin ii-induced vascular dysfunction. *Scientific Reports*, 7(1):44131, 2017.
- [168] Long-Sheng Song, Eric A. Sobie, Stacey McCulle, W. J. Lederer, C. William Balke, and Heping Cheng. Orphaned ryanodine receptors in the failing heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(11):4305–4310, 2006.
- [169] Moshi Song, Antonietta Franco, Julie A. Fleischer, Lihong Zhang, and Gerald W. Dorn. Abrogating mitochondrial dynamics in mouse hearts accelerates mitochondrial senescence. *Cell metabolism*, 26(6):872–883.e5, 2017.
- [170] Moshi Song, Katsuyoshi Mihara, Yun Chen, Luca Scorrano, and Gerald W. Dorn. Mitochondrial fission and fusion factors reciprocally orchestrate mitophagic culling in mouse hearts and cultured fibroblasts. *Cell metabolism*, 21(2):273–286, 2015.
- [171] Tim Sonntag, James J. Moresco, Joan M. Vaughan, Shigenobu Matsumura, John R. Yates, and Marc Montminy. Analysis of a camp regulated coactivator family reveals an alternative phosphorylation motif for ampk family members. *PLoS one*, 12(2):e0173013, 2017.
- [172] D. Stapleton, K. I. Mitchelhill, G. Gao, J. Widmer, B. J. Michell, T. Teh, C. M. House, C. S. Fernandez, T. Cox, L. A. Witters, and B. E. Kemp. Mammalian amp-activated protein kinase subfamily. *The Journal of biological chemistry*, 271(2):611–614, 1996.

- [173] Statistisches Bundesamt. Die 10 häufigsten todesfälle durch herzkreislauf-erkrankungen, 30.11.2020.
- [174] Leszek Szablewski. Glucose transporters in brain: In health and in alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 55(4):1307–1320, 2017.
- [175] Heinrich Taegtmeyer, Shiraj Sen, and Deborah Vela. Return to the fetal gene program: a suggested metabolic link to gene expression in the heart. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1188:191–198, 2010.
- [176] Noriko Takuwa, Sei-Ichiro Ohkura, Shin-Ichiro Takashima, Keisuke Ohtani, Yasuo Okamoto, Tamotsu Tanaka, Kaoru Hirano, Soichiro Usui, Fei Wang, Wa Du, Kazuaki Yoshioka, Yoshiko Banno, Motoko Sasaki, Ikuyo Ichi, Miwa Okamura, Naotoshi Sugimoto, Kiyomi Mizugishi, Yasuni Nakanuma, Isao Ishii, Masayuki Takamura, Shuichi Kaneko, Shosuke Kojo, Kiyoshi Satouchi, Kunitoshi Mitumori, Jerold Chun, and Yoh Takuwa. S1p3-mediated cardiac fibrosis in sphingosine kinase 1 transgenic mice involves reactive oxygen species. *Cardiovascular research*, 85(3):484–493, 2010.
- [177] Sina Tavakoli, Mahmoud Razavian, Jiasheng Zhang, Lei Nie, Ravi Marfatia, Lawrence W. Dobrucki, Albert J. Sinusas, Simon Robinson, D. Scott Edwards, and Mehran M. Sadeghi. Matrix metalloproteinase activation predicts amelioration of remodeling after dietary modification in injured arteries. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 31(1):102–109, 2011.
- [178] Tin Aung Than, Huan Lou, Cheng Ji, Sanda Win, and Neil Kaplowitz. Role of camp-responsive element-binding protein (creb)-regulated transcription coactivator 3 (crtc3) in the initiation of mitochondrial biogenesis and stress response in liver cells. *The Journal of biological chemistry*, 286(25):22047–22054, 2011.

- [179] C. Thornton, M. A. Snowden, and D. Carling. Identification of a novel amp-activated protein kinase beta subunit isoform that is highly expressed in skeletal muscle. *The Journal of biological chemistry*, 273(20):12443–12450, 1998.
- [180] A. A. Toye, J. D. Lippiat, P. Proks, K. Shimomura, L. Bentley, A. Hugill, V. Mijat, M. Goldsworthy, L. Moir, A. Haynes, J. Quarterman, H. C. Freeman, F. M. Ashcroft, and R. D. Cox. A genetic and physiological study of impaired glucose homeostasis control in c57bl/6j mice. *Diabetologia*, 48(4):675–686, 2005.
- [181] Filippos Triposkiadis, Gregory Giamouzis, John Parissis, Randall C. Starling, Harisios Boudoulas, John Skoularigis, Javed Butler, and Gerassimos Filippatos. Reframing the association and significance of co-morbidities in heart failure. *European Journal of Heart Failure*, 18(7):744–758, 2016.
- [182] Kazumasa Unno, Satoshi Isobe, Hideo Izawa, Xian Wu Cheng, Masakazu Kobayashi, Akihiro Hirashiki, Takashi Yamada, Ken Harada, Satoru Ohshima, Akiko Noda, Kohzo Nagata, Katsuhiko Kato, Mitsuhiro Yokota, and Toyooki Murohara. Relation of functional and morphological changes in mitochondria to myocardial contractile and relaxation reserves in asymptomatic to mildly symptomatic patients with hypertrophic cardiomyopathy. *European heart journal*, 30(15):1853–1862, 2009.
- [183] Styliani Vakrou and M. Roselle Abraham. Hypertrophic cardiomyopathy: a heart in need of an energy bar? *Frontiers in physiology*, 5:309, 2014.
- [184] Peter Vaupel, Hans-Georg Schaible, and Ernst Mutschler. *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, Stuttgart, 7. vollständig überarbeitete und erweiterte auflage edition, 2017.

- [185] Ricardo Vierk, Günter Glassmeier, Lepu Zhou, Nicola Brandt, Lars Fester, Danuta Dudzinski, Wiebke Wilkars, Roland A. Bender, Martha Lewerenz, Simon Gloger, Lucas Graser, Jürgen Schwarz, and Gabriele M. Rune. Aromatase inhibition abolishes Itp generation in female but not in male mice. *Journal of Neuroscience*, 32(24):8116–8126, 2012.
- [186] Nicolas Vignier, Saskia Schlossarek, Bodvaël Fraysse, Giulia Mearini, Elisabeth Krämer, Hervé Pointu, Nathalie Mougenot, Josiane Guiard, Rudolph Reimer, Heinrich Hohenberg, Ketty Schwartz, Muriel Vernet, Thomas Eschenhagen, and Lucie Carrier. Nonsense-mediated mRNA decay and ubiquitin-proteasome system regulate cardiac myosin-binding protein c mutant levels in cardiomyopathic mice. *Circulation research*, 105(3):239–248, 2009.
- [187] Michael Wagner, Edoardo Bertero, Alexander Nickel, Michael Kohlhaas, Gary E. Gibson, Ward Heggermont, Stéphane Heymans, and Christoph Maack. Selective NADH communication from α -ketoglutarate dehydrogenase to mitochondrial transhydrogenase prevents reactive oxygen species formation under reducing conditions in the heart. *Basic Research in Cardiology*, 115(5):53, 2020.
- [188] J. Wanagat, Z. Cao, P. Pathare, and J. M. Aiken. Mitochondrial DNA deletion mutations colocalize with segmental electron transport system abnormalities, muscle fiber atrophy, fiber splitting, and oxidative damage in sarcopenia. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(2):322–332, 2001.
- [189] Shawn Yongshun Wang, Siyu Zhu, Jian Wu, Maomao Zhang, Yousheng Xu, Wei Xu, Jinjin Cui, Bo Yu, Wei Cao, and Jingjin Liu. Exercise enhances cardiac function by improving mitochondrial dysfunction and maintaining energy homeostasis in the development of diabetic cardiomyopathy. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 98(2):245–261, 2020.

- [190] Haodi Wu, Huaxiao Yang, June-Wha Rhee, Joe Z. Zhang, Chi Keung Lam, Karim Sallam, Alex C. Y. Chang, Ning Ma, Jaecheol Lee, Hao Zhang, Helen M. Blau, Donald M. Bers, and Joseph C. Wu. Modeling diastolic dysfunction in induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes from hypertrophic cardiomyopathy patients. *European heart journal*, 40(45):3685–3695, 2019.
- [191] Kun Wu, Xiao-Ying Tan, Yi-Huan Xu, Guang-Hui Chen, and Mei-Qin Zhuo. Functional analysis of promoters of genes in lipid metabolism and their transcriptional response to stat3 under leptin signals. *Genes*, 9(7), 2018.
- [192] Zhidan Wu, Xueming Huang, Yajun Feng, Christoph Handschin, Yan Feng, P. Scott Gullicksen, Olivia Bare, Mark Labow, Bruce Spiegelman, and Susan C. Stevenson. Transducer of regulated creb-binding proteins (torcs) induce pgc-1alpha transcription and mitochondrial biogenesis in muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(39):14379–14384, 2006.
- [193] Zhidan Wu, Pere Puigserver, Ulf Andersson, Chenyu Zhang, Guillaume Adelmant, Vamsi Mootha, Amy Troy, Saverio Cinti, Bradford Lowell, Richard C. Scarpulla, and Bruce M. Spiegelman. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator pgc-1. *Cell*, 98(1):115–124, 1999.
- [194] Run-Qing Xue, Ming Zhao, Qing Wu, Si Yang, Yan-Ling Cui, Xiao-Jiang Yu, Jiankang Liu, and Wei-Jin Zang. Regulation of mitochondrial cristae remodelling by acetylcholine alleviates palmitate-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Free radical biology & medicine*, 145:103–117, 2019.
- [195] Masayoshi Yamanaka, Daniel Shegogue, Heuping Pei, Shizhong Bu, Alicja Bielawska, Jacek Bielawski, Benjamin Pettus, Yusuf A. Hannun, Lina Obeid, and Maria Trojanowska. Sphingosine kinase 1

- (sphk1) is induced by transforming growth factor-beta and mediates timp-1 up-regulation. *The Journal of biological chemistry*, 279(52):53994–54001, 2004.
- [196] Hui Yan, Shaowei Yi, Hang Zhuang, Lujin Wu, Dao Wen Wang, and Jiangan Jiang. Sphingosine-1-phosphate ameliorates the cardiac hypertrophic response through inhibiting the activity of histone deacetylase-2. *International journal of molecular medicine*, 41(3):1704–1714, 2018.
- [197] Yan Yan, X. Edward Zhou, H. Eric Xu, and Karsten Melcher. Structure and physiological regulation of ampk. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11):3534, 2018.
- [198] Kai Yao, Wayne W. Zhang, Luyu Yao, Shu Yang, Wanpin Nie, and Feizhou Huang. Carvedilol promotes mitochondrial biogenesis by regulating the pgc-1/tfam pathway in human umbilical vein endothelial cells (huvecs). *Biochemical and biophysical research communications*, 470(4):961–966, 2016.
- [199] D. Zhang, J. L. Mott, S. W. Chang, G. Denniger, Z. Feng, and H. P. Zassenhaus. Construction of transgenic mice with tissue-specific acceleration of mitochondrial dna mutagenesis. *Genomics*, 69(2):151–161, 2000.
- [200] Huiliang Zhang, Pei Wang, Sara Bisetto, Yisang Yoon, Quan Chen, Shey-Shing Sheu, and Wang Wang. A novel fission-independent role of dynamin-related protein 1 in cardiac mitochondrial respiration. *Cardiovascular research*, 113(2):160–170, 2017.
- [201] Yijie Zhang, Xianlong Fang, Mingyan Dai, Quan Cao, Tuantuan Tan, Wenbo He, Yan Huang, Liang Chu, and Mingwei Bao. Cardiac-specific down-regulation of carnitine palmitoyltransferase-1b (cpt-1b) prevents cardiac remodeling in obese mice. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 24(12):2533–2543, 2016.

- [202] Bo Zhou and Rong Tian. Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure. *The Journal of Clinical Investigation*, 128(9):3716–3726, 2018.
- [203] L. Zhou, L. Fester, S. Haghshenas, X. de Vrese, R. von Hacht, S. Gloger, N. Brandt, M. Bader, G. Vollmer, and G. M. Rune. Oestradiol-induced synapse formation in the female hippocampus: roles of oestrogen receptor subtypes. *Journal of Neuroendocrinology*, 26(7):439–447, 2014.
- [204] L. A. Zinovkina. Dna replication in human mitochondria. *Biochemistry. Biokhimiia*, 84(8):884–895, 2019.
- [205] Dmitry B. Zorov, Magdalena Juhaszova, and Steven J. Sollott. Mitochondrial reactive oxygen species (ros) and ros-induced ros release. *Physiological reviews*, 94(3):909–950, 2014.

Anhang A.

Auflistung der verwendeten Gefahrenstoffe nach GHS

Tabelle A.1.: Gefahrenhinweise (H-Sätze)

H225	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
H226	Flüssigkeit und Dampf entzündbar.
H228	Entzündbarer Feststoff.
H272	Kann Brand verstärken; Oxidationsmittel.
H280	Enthält Gas unter Druck; kann bei Erwärmung explodieren.
H281	Enthält tiefgekühltes Gas; kann Kälteverbrennungen oder -verletzungen verursachen.
H290	Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
H301	Giftig bei Verschlucken.
H302	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
H310	Lebensgefahr bei Hautkontakt.
H312	Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.
H314	Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
H315	Verursacht Hautreizungen.
H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
H318	Verursacht schwere Augenschäden.
H319	Verursacht schwere Augenreizung.

H331	Giftig bei Einatmen.
H332	Gesundheitsschädlich bei Einatmen.
H334	Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.
H335	Kann die Atemwege reizen.
H336	Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
H340	Kann genetische Defekte verursachen.
H341	Kann vermutlich genetische Defekte verursachen.
H350	Kann Krebs erzeugen.
H351	Kann vermutlich Krebs erzeugen.
H360	Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen.
H361	Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen.
H361d	Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
H370	Schädigt die Organe.
H371	Kann die Organe schädigen.
H372	Schädigt die Organe bei längerer oder wiederholter Exposition.
H373	Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition.
H301+H311+H331	Giftig bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen.
H301+H331	Giftig bei Verschlucken oder Einatmen.
H302+H312+H332	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen.
H302+H332	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken oder Einatmen.
H312+H332	Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt oder Einatmen.
H400	Sehr giftig für Wasserorganismen.
H410	Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.
H411	Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

H412 Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

Tabelle A.2.: Sicherheitshinweise (P-Sätze)

P201	Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
P202	Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.
P210	Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen sowie anderen Zündquellenarten fernhalten. Nicht rauchen.
P233	Behälter dicht verschlossen halten.
P234	Nur in Originalverpackung aufbewahren.
P240	Behälter und zu befüllende Anlage erden.
P260	Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol nicht einatmen.
P261	Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden.
P262	Nicht in die Augen, auf die Haut oder auf die Kleidung gelangen lassen.
P264	Nach Gebrauch ... gründlich waschen.
P270	Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen.
P273	Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
P280	Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.
P282	Schutzhandschuhe mit Kälteisolierung und zusätzlich Gesichtsschild oder Augenschutz tragen.
P284	[Bei unzureichender Belüftung] Atemschutz tragen.
P301+P312	Bei Verschlucken: Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum / Arzt / ... anrufen.
P301+P330+P331	Bei Verschlucken: Mund ausspülen. Kein Erbrechen herbeiführen.

P302+P352	Bei Berührung mit der Haut: Mit viel Wasser / ... waschen.
P303+P361+P353	Bei Berührung mit der Haut [oder dem Haar]: Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen [oder duschen].
P304+P340	Bei Einatmen: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.
P305+P351+P338	Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
P308	Bei Exposition oder falls betroffen:
P308+P313	Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P310	Sofort Giftinformationszentrum, Arzt oder ... anrufen.
P311	Giftinformationszentrum, Arzt oder ... anrufen.
P312	Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum / Arzt / ... anrufen.
P314	Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P330	Mund ausspülen.
P332+P313	Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P333+P313	Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P336+P315	Vereiste Bereiche mit lauwarmem Wasser auftauen. Betroffenen Bereich nicht reiben. Sofort ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P337+P313	Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P342+P311	Bei Symptomen der Atemwege: Giftinformationszentrum, Arzt oder ... anrufen.
P362+P364	Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

Anhang A. Auflistung der verwendeten Gefahrenstoffe nach GHS

P390	Verschüttete Mengen aufnehmen, um Materialschäden zu vermeiden.
P391	Verschüttete Mengen aufnehmen.
P403	An einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
P403+P233	An einem gut belüfteten Ort aufbewahren. Behälter dicht verschlossen halten.
P405	Unter Verschluss aufbewahren.
P410+P403	Vor Sonnenbestrahlung schützen. An einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
P501	Inhalt / Behälter ... zuführen.

Anhang B.

Ergänzende Daten

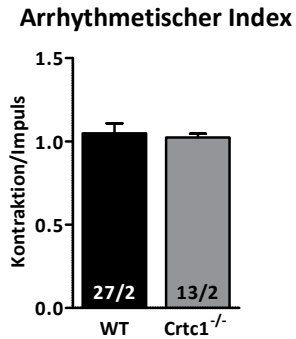


Abbildung B.1.: Arrhythmie in isolierten Kardiomyozyten von *Crtc1*^{-/-} Mäusen. Arrhythmischer Index zur Abschätzung der Integrität der Kardiomyozyten nach dem Stressprotokoll. Gemessen wurde die Anzahl der Kontraktionen pro Impuls. Dargestellt als Mittelwert±SEM; die Anzahl der Zellen/Mäuse ist in den Balken angegeben.

Anhang C.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Elke Oetjen bedanken; für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, für ihre Betreuung und Unterstützung in leichten und in schweren Zeiten. Sie gab mir stets das Gefühl über alle Probleme, wissenschaftlich oder privat, sprechen zu können. Sie hat mich dazu bewegt, über mich hinaus zu wachsen. Das weiß ich sehr zu schätzen. Der ganzen Arbeitsgruppe bin ich ausgesprochen dankbar für die entspannte Atmosphäre und die unzähligen lustigen Stunden. Übertriebener Dank geht an meine Super-Co-Betreuerin Dr. Karoline Morhenn. Sie stand mir nicht nur wissenschaftlich immer zur Seite, sondern in jeder Lebenslage. Auch Kyra Köster war immer für mich da und half mir, wenn ich selber nicht mal ahnte, dass ich Hilfe brauchte. Zusammen mit Dr. Jorge Duque Escobar haben sie mir wunderschöne Erinnerungen an die Zeit im Labor und auf Konferenzen geschenkt. Sabine Schröder möchte ich danken für die Einführung ins Labor und ich wünsche mir sehr, dass sie mit ihrer pragmatischen Art auf mich abgefärbt hat. Anne Ruge und Dr. Diana Kaiser haben mir mit ihrer Hilfsbereitschaft wo es ging Last abgenommen.

Bei Prof. Rainer Böger möchte ich mich für die Gelegenheit bedanken im Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie an dieser Dissertation arbeiten zu können. Den Kolleg:innen der Institute für Klinische und Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie möchte ich für die selbstverständliche Unterstützung und die wunderbare Atmosphäre in jedem Flur und Labor danken. Insbesondere Prof. Lucie Carrier und Dr. Saskia Schlossarek für das Überlassen der Mäuse und Prof. Friederike Cuello da-

für, dass sie nicht nur meine Dissertation begutachtet, sondern sich schon in den Jahren zuvor für mich eingesetzt hat.

Bei den Arbeitsgruppen von Prof. Gabriele Rune und Dr. Günter Daum möchte ich mich für die Zusammenarbeit bedanken. Speziell bei Dr. Lepu Zhou, Barbara Holstermann und Dr. Markus Geißen für die Unterstützung bis zum Fertigstellen dieser Arbeit. Ein besonderer Dank geht an Prof. Christoph Maack, Dr. Michael Kohlhaas und Dr. Alexander Nickel, die erheblich zur Bearbeitung des Themas beigetragen haben.

Ich bedanke mich bei PD Dr. Sabine Hoffmeister-Ullerich und Prof. Peter Heisig für die Zusage für meine Prüfungskommission und Prof. Peter Heisig insbesondere für das Schreiben der Gutachten für das Promotionsstipendium der Universität Hamburg. Dafür und für die finanzielle Unterstützung der Niemann-Stiftung und des DZHK e.V. bin ich sehr dankbar.

Dankbarkeit verspüre ich für meine verständnisvollen Freunde, die sich mindestens so sehr wie ich auf den Tag der Abgabe freuten. Den MaiR-Maids möchte ich danken für ihre beständige Motivationsarbeit und emotionale Unterstützung in der Schreibphase. Meiner Familie bin ich dankbar für die andauernde Bekräftigung und den Glauben an mich. Besonders mein Opa hat nicht locker gelassen und mich immer wieder zum Weitermachen angehalten. Meinen Eltern bin ich unermesslich dankbar, weil sie einfach immer für mich da sind, meine Launen aushalten und zuletzt viele Wochen ihr Zuhause und HomeOffice mit mir geteilt haben. Özgür'üm, sana hangi dilde teşekkür etmeliyim?

Anhang D.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende, an der Universität Hamburg eingereichte Dissertation mit dem Titel

Kardialer und kardiomyozytärer Stoffwechsel in CRT1-defizienten Mäusen

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die Dissertation wurde unter der Anleitung von Prof. Elke Oetjen am Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf verfasst. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Hamburg, den 04. Mai 2021

(Anna Laura Gundler)