

Kälteinduzierte mitochondriale Fragmentation und ihre Reversibilität in Endothelzellen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

vorgelegt von

Leonard Ben Quiring

geboren in Herdecke

Institut für Physiologische Chemie
der
Universität Duisburg-Essen

2023

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/82131

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20240719-075307-9

Alle Rechte vorbehalten.

Tag der Disputation: 28.05.2024

Erstgutachterin: Prof. Dr. Ursula Rauen

Zweitgutachter: Prof. Dr. Christian Mayer

Vorsitzende: Prof. Dr. Sabrina Disch

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Physiologische Chemie der Universität Duisburg-Essen am Universitätsklinikum Essen durchgeführt.

Die vorliegende Arbeit basiert auf den beigefügten Originalarbeiten:

- Quiring, L., Walter, B., Lohaus, N., Schwan, D., Rech, A., Dlugos, A., and Rauen, U. (2022). Characterisation of cold-induced mitochondrial fission in porcine aortic endothelial cells. *Mol Med* 28, 13.
- Quiring, L., Caponi, L., Schwan, D., Rech, A., and Rauen, U. (2022). Recovery from cold-induced mitochondrial fission in endothelial cells requires reconditioning temperatures of ≥ 25 °C. *Front Transplant* 1, 1044551.

Ergebnisse dieser Arbeit wurden außerdem im Rahmen von Fachtagungen präsentiert und als Abstracts veröffentlicht:

- Quiring, L., Walter, B., Schwan, D., Caponi, L., Lohaus, N., Bauer, A., Dlugos, A., Klüsener, S., and Rauen, U. (2020) Characterisation of cold-induced mitochondrial fission in endothelial cells, *Cryobiology* 97, 276.
- Schwan, D., Walkenfort, B., Walter, B., Quiring, L., Jastrow, H., Sapkota, N., Lohaus, N., Schumann, S., Hasenberg, M., and Rauen, U. (2021) Cold- and low chloride-induced alterations in mitochondrial morphology and ultrastructure – a study in endothelial cells, *Cryobiology* 103, 172.

Ergebnisse dieser Arbeit wurden auf folgenden Tagungen zur Fachdiskussion gestellt:

- Vortrag beim 23. Workshop „Zell- und Gewebeschädigung: Mechanismen, Protektion und Therapie“, Bremerhaven (30.11.-02.12.2017).
 - Postervorstellung beim 16. Tag der Forschung der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen, Essen (08.12.2017).
 - Postervorstellung bei der 27. Jahrestagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft DTG 2018, Berlin (07.11.-10.11.2018).
 - Vortrag beim 24. Workshop „Zell- und Gewebeschädigung: Mechanismen, Protektion und Therapie“, Rauschholzhausen (29.11.-01.12.2018).
 - Postervorstellung beim 17. Tag der Forschung der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen, Essen (07.12.2018).
 - Postervorstellung bei „ATx-Summit from Boston to Essen“, Essen, Chiesi Farmaceutici S.p.A. (28.06.-29.06.2019).
-

-
- Postervorstellung bei „MitoChats“, Köln, Scientific Symposium on Mitochondrial Biology (10.07.-12.07.2019).
 - Vortrag bei der 28. Jahrestagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft DTG 2019, Hannover (17.10.-19.10.2019).
 - Postervortrag bei der 28. Jahrestagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft DTG 2019, Hannover (17.10.-19.10.2019).
 - Postervorstellung beim 18. Tag der Forschung der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen, Essen (22.11.2019).
 - Science Slam mit Auszeichnung beim 18. Tag der Forschung der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen, Essen (22.11.2019).
 - Vortrag beim 25. Workshop „Zell- und Gewebeschädigung: Mechanismen, Protektion und Therapie“, Xanten (28.11.-30.11.2019).
 - Vortrag bei der 57. Jahrestagung der Society for Cryobiology CRYO 2020, Virtuelle Konferenz (03.07.-05.07.2020).
 - Vortrag bei der 57. Jahrestagung der Society for Low Temperature Biology SLTB 2021, Virtuelle Konferenz (03.11.-05.11.2021).
-

Inhalt

1	Einleitung	9
1.1	Konservierungsschädigung als Problem der Organtransplantation.....	9
1.1.1	Kälteschädigung	10
1.1.2	Maschinenperfusion und Rekonditionierung	11
1.1.3	Rolle des Endothels	13
1.2	Mitochondrien	13
1.2.1	Mitochondriale Dynamik	15
1.2.2	Kälteinduzierte mitochondriale Fragmentation.....	18
1.3	Zielsetzung.....	18
2	Experimentelles Modell	20
3	Publikationen.....	21
3.1	Quiring et al., Mol Med, 2022	21
3.2	Quiring et al., Front Transplant, 2022	41
4	Zusammenfassung der Hauptergebnisse	54
5	Diskussion	56
5.1	Charakteristika der kälteinduzierten mitochondrialen Fragmentation	56
5.2	Mechanismus der kälteinduzierten mitochondrialen Fragmentation.....	59
5.3	Re-Fusion in der Wiedererwärmung	60
5.4	Relevanz der Ergebnisse für das Gesamtorgan	63
6	Ausblick	64
7	Zusammenfassung.....	65
8	Summary	66
9	Literatur.....	67
10	Danksagung.....	73
11	Erklärung.....	75

1 Einleitung

Die Organtransplantation stellt noch immer die einzige Therapiemethode für viele Erkrankungen dar. Besonders für schwere Formen der Niereninsuffizienz, Herzmuskelerkrankungen, Leberzirrhose oder Mukoviszidose ist dies der Fall [1]. Die Wartezeit auf ein Spenderorgan dauert im Normalfall mehrere Jahre [1], und viele Patienten erhalten nicht rechtzeitig ein Organ. Im Jahr 2021 standen in Deutschland 8459 Menschen auf der Warteliste. Über eintausend Menschen starben, während sie auf ein geeignetes Spenderorgan warteten [1]. Durch den demografischen Wandel und die steigende Zahl älterer Menschen wird dieser Organmangel in den nächsten Jahren und Jahrzehnten eine noch größere Bedeutung erlangen.

1.1 Konservierungsschädigung als Problem der Organtransplantation

Für eine erfolgreiche Transplantation gibt es mehrere Voraussetzungen, ein zentraler Punkt ist die Qualität des Transplantats. Diese wird durch die bereits im Spender vorhandene Vorschädigung als auch durch die Schädigung durch den Transport beeinträchtigt [2]. Durch den starken Organmangel wurden die Kriterien für transplantierbare Organe stark erweitert und zunehmend sogenannte ECDs (*extended criteria donors*) eingeschlossen. Damit werden Organe von Spendern transplantiert, die ein gewisses Alter überschritten haben oder kardiovaskulär vorbelastet sind. Hinzu kommt, dass Schädigungsprozesse nach Entnahme des Organs die Qualität weiter vermindern [3].

Klassischerweise werden Organe unter kalten Bedingungen in speziellen Konservierungslösungen transportiert. Dabei treten Schädigungen besonders durch kalte Ischämie sowie warme Reperfusion auf [3], und in der Kälte werden Prozesse angestoßen, die in der Wiedererwärmung zu einer Schädigung führen [3]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine gewisse Toxizität durch die Konservierungslösung selbst möglich ist [4-6]. Die verschiedenen Schädigungsmöglichkeiten sind in Abb. 1 aufgeführt.

Durch die geringe Ausgangsqualität in Kombination mit der Schädigung, die beim Transport entsteht, wird die Langzeitfunktion des Organs vermindert. Das Risiko eines Organversagens für den Empfänger steigt, was wiederum zur verringerten Verfügbarkeit von Transplantaten führt. Eine Verbesserung der Konservierung könnte also die Überlebenschancen der Patienten enorm erhöhen.

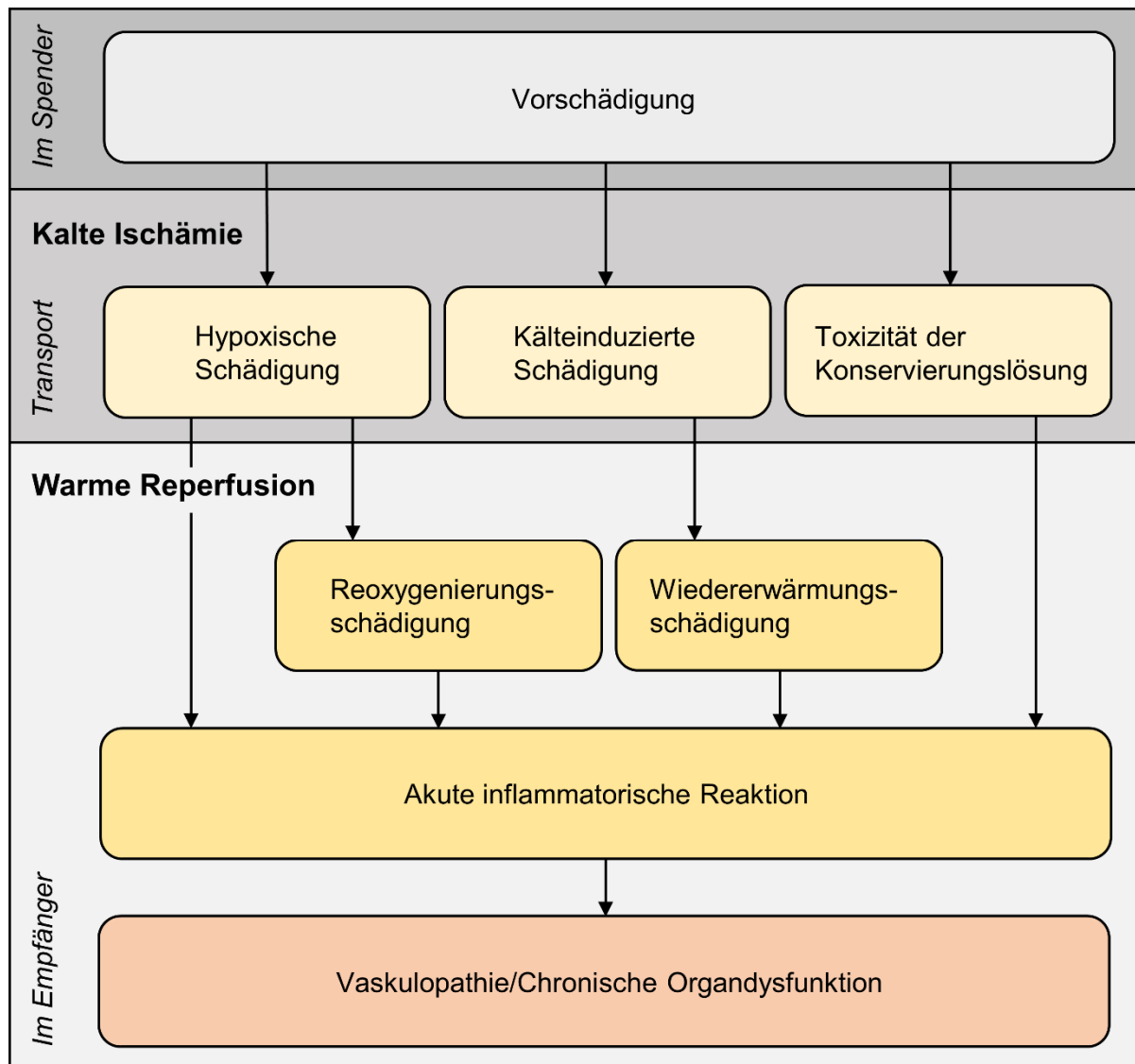


Abbildung 1: Übersicht über die Organschädigung während der Transplantation. Das Organ kann vor Entnahme bereits Vorschädigungen aufweisen. Außerdem treten sowohl durch die kalte Ischämie während des Transports als auch durch die warme Reperfusion im Empfänger verschiedene Arten der Schädigung auf. Modifiziert nach Rauen und Paul 2013 [7].

1.1.1 Kälteschädigung

Organe werden üblicherweise unter Hypothermie (4 °C) transportiert [8]. Durch die niedrige Temperatur werden die Stoffwechselprozesse im Organ verlangsamt und die daraus resultierenden Schäden auf zellulärer Ebene verringert [9]. Die Kälte wirkt also in erster Linie protektiv, allerdings gibt es bestimmte Schädigungsprozesse, die erst durch die Kälte angestoßen werden. Der Gesamtschaden aus der kalten Ischämie sowie der warmen Reperfusion ist komplex (Abb. 1). Dabei wird unter anderem zwischen Schädigungsprozessen aufgrund von Hypoxie und Hypothermie, sowie zwischen Reoxygenierung und Wiedererwärmung unterschieden. Hypoxie (Sauerstoffmangel) ist eine Folge der Ischämie (Minderdurchblutung). Ohne

genügend Sauerstoff kommt die ATP-Produktion der mitochondrialen Atmungskette zum Erliegen [10]. Die Folgen des ATP-Mangels sind unter anderem eine Akkumulation von Calcium-Ionen innerhalb der Zellen [11, 12]. Auch kann es zu mitochondrialen Veränderungen wie der Öffnung der Permeabilitätspore kommen. Sowohl der ATP-Mangel als auch die Calcium-Akkumulation oder Öffnung der Pore können zum Zelltod führen [11, 12]. Durch die anschließende Reoxygenierung des Organs wird die Schädigung sogar noch verstärkt. Es entstehen reaktive Sauerstoffspezies, die an Lipidmembranen eine Lipidperoxidation induzieren [13, 14]. Dadurch entstehen weitere Schäden an verschiedenen Zellorganellen und eine Nekrose ist die Folge [15, 16].

Während die Hypothermie diese Prozesse verlangsamt, führt sie auch zur Freisetzung von Eisen-Ionen innerhalb der Zelle, die normalerweise proteingebunden sind [3, 17-19]. Durch die chelatisierbaren Eisen-Ionen entstehen aktivere reaktive Sauerstoffspezies, was starke Schäden der zellulären Membranen zur Folge hat. Gerade bei Mitochondrien wurde durch diese eisenabhängige Schädigung die Öffnung der Permeabilitätspore beobachtet, was in der Wiedererwärmung zur Apoptose führte [18, 20]. Durch Zugabe von Eisenchelatoren konnte diese rein auf Kälte zurückzuführende Schädigung allerdings verhindert werden [19, 21, 22] und wird derzeit in klinischen Studien untersucht [23, 24].

1.1.2 Maschinenperfusion und Rekonditionierung

Neben der Verbesserung von Konservierungslösungen wie der Anpassung der in Deutschland meistgenutzten Konservierungslösung Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK), die bereits seit 1978 in ihrer Zusammensetzung feststeht, wird derzeit die Maschinenperfusion als Alternative zur klassischen statischen Kaltlagerung eingesetzt [25]. Es konnte jedoch noch kein Standardprotokoll etabliert werden (Abb. 2). Es gibt sowohl normotherme (37 °C), als auch subnormotherme (20 °C - 30 °C) und hypotherme (4 °C - 10 °C) Herangehensweisen [26]. Die meisten Studien deuten bei Verwendung von Maschinenperfusion auf deutliche Verbesserungen des Transplantationsergebnisses hin, unabhängig davon, welche Transporttemperatur verwendet wurde [27, 28]. Besonders normotherme Maschinenperfusion ermöglicht es, die Spenderorgane schon während der Perfusion hinsichtlich ihrer Qualität zu beurteilen und gegebenenfalls vor der Transplantation zu behandeln [29-31].

Die Maschinenperfusion ist allerdings deutlich komplexer und kostspieliger als die konventionelle Kältekonservierung. Es sind spezielle Geräte, Konservierungslösungen und Personal erforderlich. Bei normothermer Perfusion werden außerdem Sauerstoffträger – in der Regel Blutkonserven – benötigt [32]. Sollte das Perfusionsgerät während des Transports ausfallen

oder ein Fehler auftreten, entstehen sofort starke Schädigungen, sodass das Organ für die Transplantation verloren ist, unabhängig von der ursprünglichen Qualität. Dieses Risiko stellt mit den fehlenden Standards für die Durchführung und Bewertung der Maschinenperfusion die größten Nachteile dar.

Einen Mittelweg, der neuerdings eingesetzt wird, stellt die Kombination der statischen Kältekonserverung und der Rekonditionierung im Transplantationszentrum dar. Die kontrollierte oxygenierte Wiedererwärmung nutzt die Vorteile der konventionellen Kältekonserverung für den Transport, kombiniert diese aber mit einer Rekonditionierung im Transplantationszentrum, wo das Organ mit einer speziellen Perfusionsmaschine allmählich erwärmt wird (Abb. 2) [33]. Die Rekonditionierung bietet ebenfalls die Möglichkeit der Beurteilung der Qualität und der Behandlung des Organs vor der Implantation in den Empfänger [34, 35].

Dabei wird auf eine langsame Erwärmung des Organs geachtet, da bei einer abrupten Wiedererwärmung schädigende Prozesse innerhalb der Zellen beschleunigt werden, die bereits während der Kälteexposition ausgelöst werden [3, 36]. Diese Prozesse, zusammen mit der Gesamtschädigung, können die Organfunktion und das Transplantatüberleben negativ beeinflussen. So können reaktive Sauerstoffspezies, oxidativer Stress, inflammatorische Reaktionen

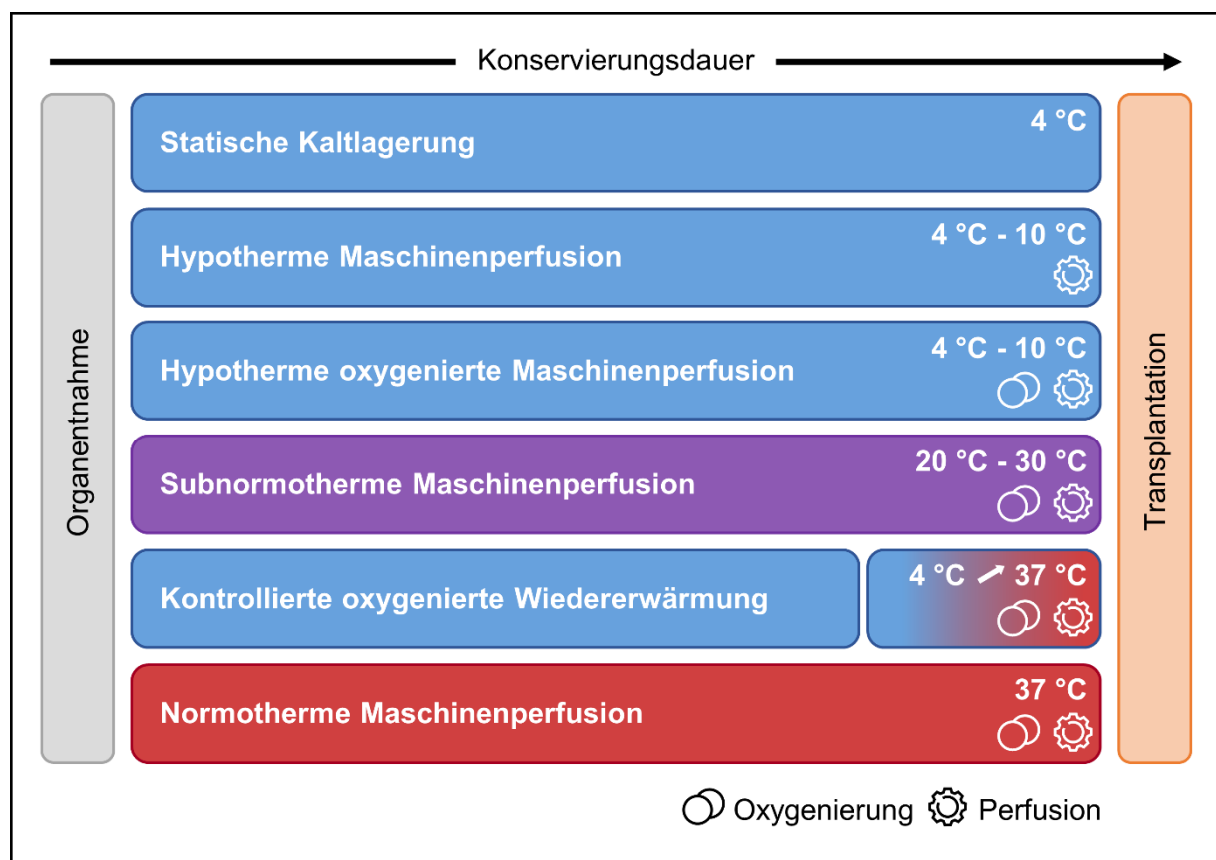


Abbildung 2: Überblick über die verschiedenen Organkonservierungsstrategien. Die Konservierungsstrategien unterscheiden sich hauptsächlich durch die Temperatur sowie die Komplexität durch Nutzung eines Perfusionsgeräts und der Bereitstellung von Sauerstoff [38, 39].

und eine Schädigung an Endothelzellen im Organ auftreten. Darüber hinaus stellt bei der Wiedererwärmung der unmittelbar ansteigende Stoffwechsel und Energiebedarf eine Herausforderung für die Zellen dar, da deren Energieniveau nach der Kaltlagerung niedrig ist [3, 36, 37]. Eine schnelle Energiebereitstellung für Reparaturprozesse in der Wärme ist also ein zentraler Punkt während der Wiedererwärmung.

1.1.3 Rolle des Endothels

Das Endothel spielt bei der Organtransplantation eine besondere Rolle. Endothelzellen kommen als erster Zelltyp sowohl mit der kalten Konservierungslösung als auch mit dem warmen Blut des Empfängers in Kontakt. Dabei wurde beobachtet, dass ausgerechnet diese Zellen sehr kältesensitiv sind [3, 40, 41]. Ein geschädigtes Endothel kann bei der Reperfusion zu Mikrozirkulationsstörungen führen, was zur Schädigung der Parenchymzellen beiträgt. Außerdem führt die Aktivierung des Endothels zu inflammatorischen Prozessen, die eine Abstoßung initiieren und damit den Langzeitverlust des Organs zur Folge haben können (Abb. 1).

Darüber hinaus wurde bei kultivierten Endothelzellen beobachtet, dass bei Verwendung von chloridarmen Konservierungslösungen in der Kaltinkubation bei Wiedererwärmung der Zelltod eintritt [42, 43]. Dies spielt eine wichtige Rolle, da die meisten aktuell verwendeten Konservierungslösungen eine geringere Chloridkonzentration besitzen und stattdessen mit überwiegend organischen membran-impermeablen Anionen wie Lactobionat ausgestattet sind [44]. In der Kälte ziehen sich die Zellen zusammen und sind nach Kaltinkubation unter chloridarmen Bedingungen in der Wiedererwärmung nicht mehr in der Lage, ihre ursprüngliche Morphologie einzunehmen (Abb. 3). Dies ist nach vorläufigen, bisher unveröffentlichten Ergebnissen auf die Veränderung der Mitochondrien zurückzuführen (Walter, B., [...], Quiring, L., et al., Manuskript in Vorbereitung), die neben vielen anderen zellulären Prozessen vor allem für die Energiegewinnung verantwortlich sind.

Die Erhaltung eines gesunden Endothels ist wichtig für die Organqualität, und dafür ist eine schnelle Energiebereitstellung nach Kälte erforderlich [45].

1.2 Mitochondrien

Auf zellulärer Ebene sind die Mitochondrien das zentrale Zellorganell zur Energiegewinnung. Durch die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien produzieren alle aeroben Lebewesen Energie in Form von ATP [46]. Außerdem enthalten sie durch ihren prokaryotischen

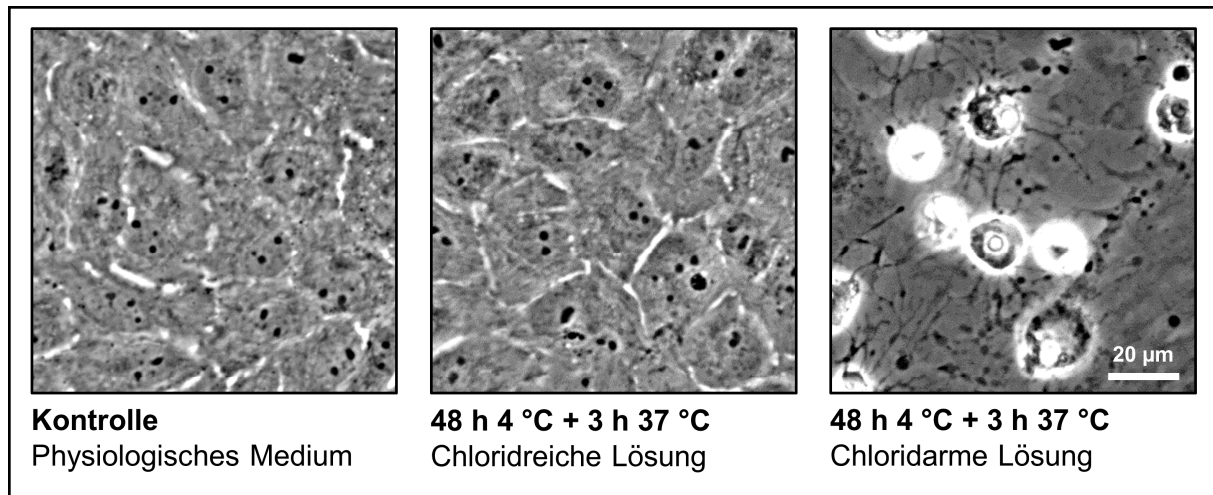


Abbildung 3: Endothelzellen unter physiologischen Bedingungen und nach Kaltinkubation in einer chloridreichen Kaltinkubationslösung und in einer chloridarmen Kaltinkubationslösung. Die Endothelzellen zeigen in der Wiedererwärmung nach Kaltinkubation in chloridarmer Lösung keine Rückkehr zu ihrer ursprünglichen Morphologie. Viele Kaltlagerungslösungen für die Organkonservierung verwenden eine chloridarme Zusammensetzung. Abgebildet sind Phasenkontrastaufnahmen von Aortenendothelzellen. Die Kaltinkubation erfolgte in Krebs-Henseleit-Puffer mit Glukose und Eisenchelator, die Wiedererwärmung in Zellkulturmedium (Walter, B., [...], Quiring, L., et al., Manuskript in Vorbereitung).

Ursprung eigene DNA und Ribosomen, die allerdings nur einen Bruchteil der mitochondrialen Proteine synthetisieren.

Das Mitochondrium besitzt zwei Membranen, die das Organell in zwei Kompartimente einteilen: Die äußere Membran schließt das Mitochondrium nach außen zum Cytoplasma ab und die innere Membran trennt den Intermembranraum von der Matrix (Abb. 4). Die Komplexe der Atmungskette befinden sich in der inneren Mitochondrienmembran (Abb. 4) und bauen mit Hilfe der oxidativen Phosphorylierung einen Protonengradienten auf. Die innere Membran bildet mehrfache Faltungen aus, die Cristae. Dadurch wird Oberfläche der Membran stark erhöht.

Mitochondrien wurden besonders in letzter Zeit als ein wichtiger Faktor in der Transplantationsmedizin beschrieben [45]. So konnte gezeigt werden, dass durch oxidativen Stress, Calcium-Akkumulation und Hypoxie die mitochondriale Permeabilitätsübergangspore geöffnet wird [47]. Die Pore sitzt in der inneren Membran, und durch die Öffnung kommt es zu einer Depolarisation, was eine Schwellung der Matrix zur Folge hat. Dadurch kann es zu einer Ruptur der äußeren Membran und somit zur Apoptose bzw. zu Mischformen der Zellschädigung kommen [47].

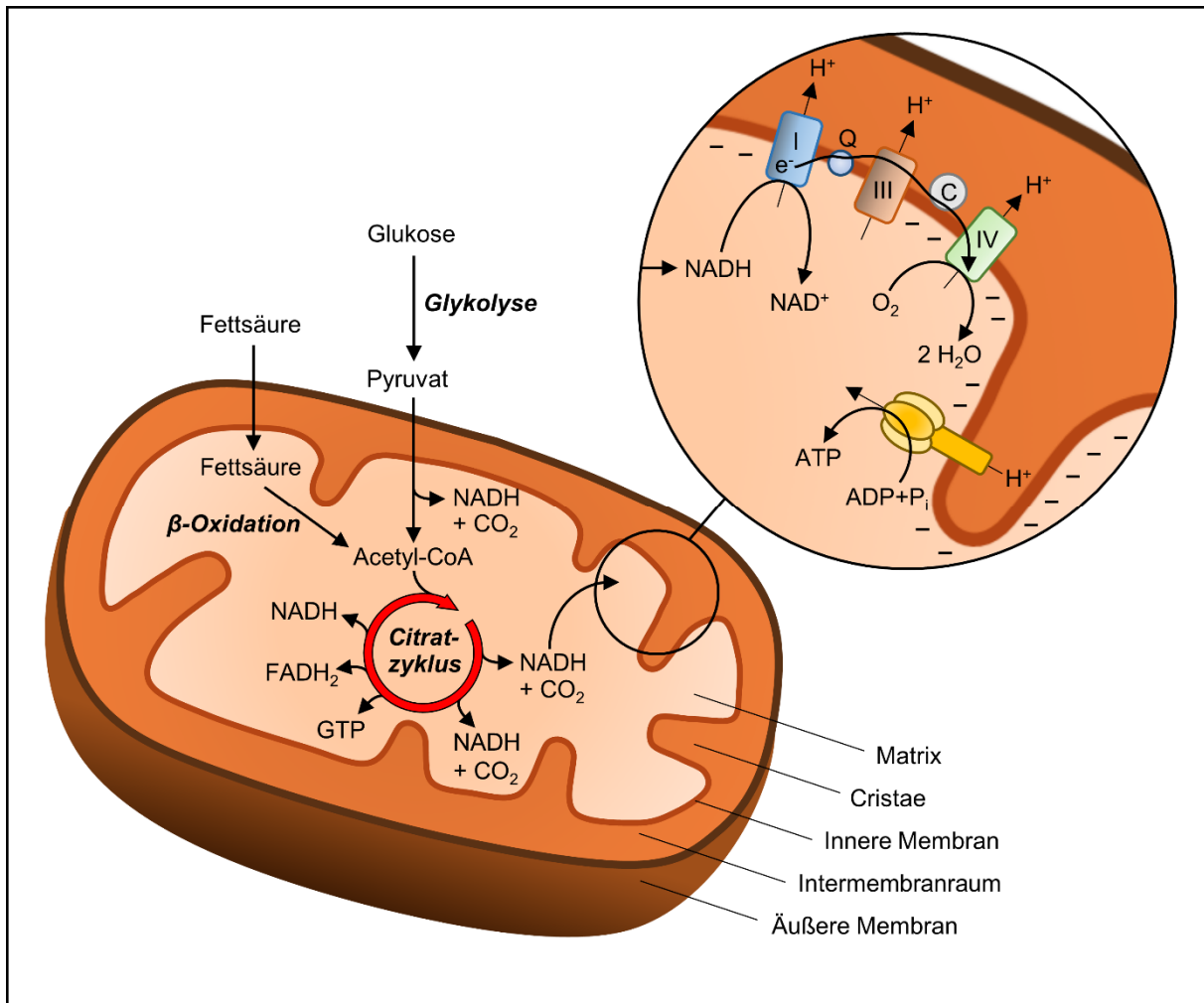


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Mitochondriums und dessen wichtigster Funktionen. Mitochondrien stellen das zentrale Zellorganell für die Energiegewinnung in Form von ATP dar. Glukose oder Fettsäuren werden in Acetyl-CoA umgewandelt, das wiederum im Citratzyklus oxidiert wird, so dass NADH, FADH₂ und CO₂ entstehen. In der Atmungskette werden diese Reduktionsäquivalente oxidiert und die Elektronen über Komplex I, Coenzym Q, Komplex III, Cytochrom C und Komplex IV auf Sauerstoff übertragen. Die freiwerdende Energie wird verwendet, um Protonen in den Intermembranraum zu pumpen, was den Aufbau des mitochondrialen Membranpotentials zur Folge hat. Der Protonengradient wird durch die ATP-Synthase zur Synthese von ATP genutzt. Für die Übersichtlichkeit der Darstellung wurden die Stöchiometrien nicht vollständig angegeben.

1.2.1 Mitochondriale Dynamik

Mitochondrien sind allerdings keine statischen Kraftwerke, die eine immer gleiche Menge an ATP produzieren. Es handelt sich um dynamische Organellen, die sich unter anderem zur Regulation der Energiebereitstellung in Größe, Form und subzellulärer Verteilung anpassen können [48, 49]. Dies wird als mitochondriale Dynamik bezeichnet und beinhaltet die mitochondriale Fragmentation bzw. Fission, also die Aufspaltung eines Mitochondriums in kleinere Organellen, und die mitochondriale Fusion, die Verschmelzung von Mitochondrien zu einem größeren und komplexeren Organell (Abb. 5) [46, 48, 50]. Die mitochondriale Dynamik ist

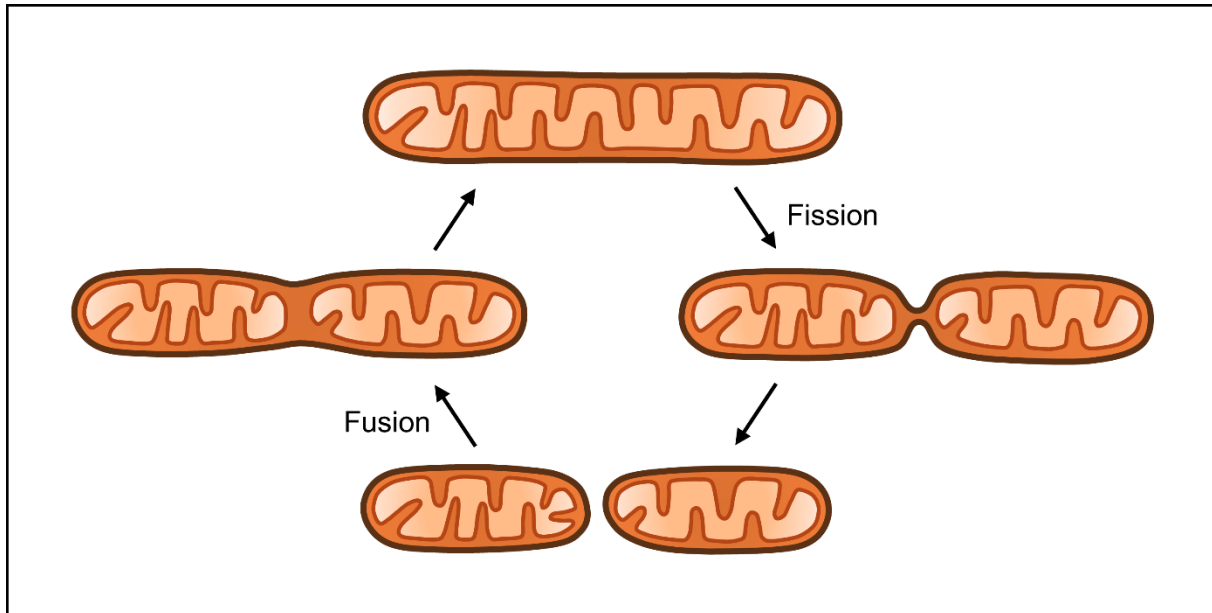


Abbildung 5: Schematische Darstellung der mitochondrialen Dynamik. Mitochondrien sind in der Lage, sich durch Fission zu trennen und durch Fusion zu verbinden. Dadurch bilden sie ein dynamisches Netzwerk.

hochkonserviert in allen Eukaryoten und dient der Anpassung der Zellen an verschiedene Bedingungen und Anforderungen. Fission hilft, bei der Zellproliferation die Mitochondrien in die Tochterzellen zu verteilen, spielt aber auch bei der Qualitätskontrolle eine wichtige Rolle [51]. Durch Fusion kann mehr ATP synthetisiert werden und die Zelle kann so auf geänderte Energieansprüche reagieren [48, 50]. Es ist also davon auszugehen, dass ein ausgeprägtes mitochondriales Netzwerk nach Kaltinkubation zur Energiegewinnung am produktivsten wäre. Die Balance zwischen Fission und Fusion wird besonders durch die Regulation der GTPasen DRP1 (dynamin-related protein 1) und OPA1 (optic atrophy 1) bestimmt. Diese Regulation ist abhängig vom Zelltyp, dem metabolischen Zustand und dem Stresslevel der Zelle [52]. Insgesamt herrscht ein stark reguliertes Gleichgewicht zwischen Fission und Fusion, das die Mitochondrien funktionsfähig hält.

So kann DRP1 an Serin 616 und 637 phosphoryliert werden, was Aktivität und Lokalisation beeinflusst (Abb. 6). Die Phosphorylierung an S616 fördert die mitochondriale Fission, indem sie die GTPase-Aktivität und die Translokation von DRP1 zu den Mitochondrien erhöht [50, 53, 54]. Die Phosphorylierung an S637 hemmt hingegen die mitochondriale Fission, indem sie die GTPase-Aktivität und die Translokation von DRP1 zu den Mitochondrien verringert (Abb. 6) [54, 55].

Die Phosphorylierung an den beiden Stellen wird durch verschiedene Proteinkinasen reguliert, die auf unterschiedliche Signale reagieren. Die aktivierende Phosphorylierung an S616 wird während des Zellzyklus durch die Cyclin-abhängige Kinase 1 vermittelt und bei oxidativem

Stress durch MAPK1/ERK2 [55, 56]. Die inaktivierende Phosphorylierung an S637 wird bei erhöhtem cAMP-Spiegel durch die Proteinkinase A vermittelt [57]. Durch die Rezeptoren MFF (mitochondrial fission factor), FIS1 (mitochondrial fission 1 protein), MiD49 und MiD51 (mitochondrial dynamics protein) wird das sonst cytosolisch lokalisierte DRP1 an die Mitochondrien rekrutiert [58]. Dabei spielt auch das Endoplasmatische Retikulum (ER) eine Rolle, da die Fission an den Membrankontaktstellen zwischen glattem ER und Mitochondrium stattfindet [59].

Für die Fusion ist die Aktivität der drei membranintegralen GTPasen MFN1 (mitofusin 1) und MFN2 (mitofusin 2) in der äußeren Membran und OPA1 in der inneren Membran erforderlich (Abb. 6) [60-62]. OPA1 wird durch verschiedene Proteasen, wie YME1L1 und vor allem OMA1 (one mitochondrial AAA protease), gespalten, sodass lange und kurze Isoformen entstehen [63-65]. Für die Fusion ist eine gewisse Stöchiometrie von s- und l-OPA1 notwendig, wobei die kurzen Isoformen nur regulatorisch an der Fusion beteiligt sind [64].

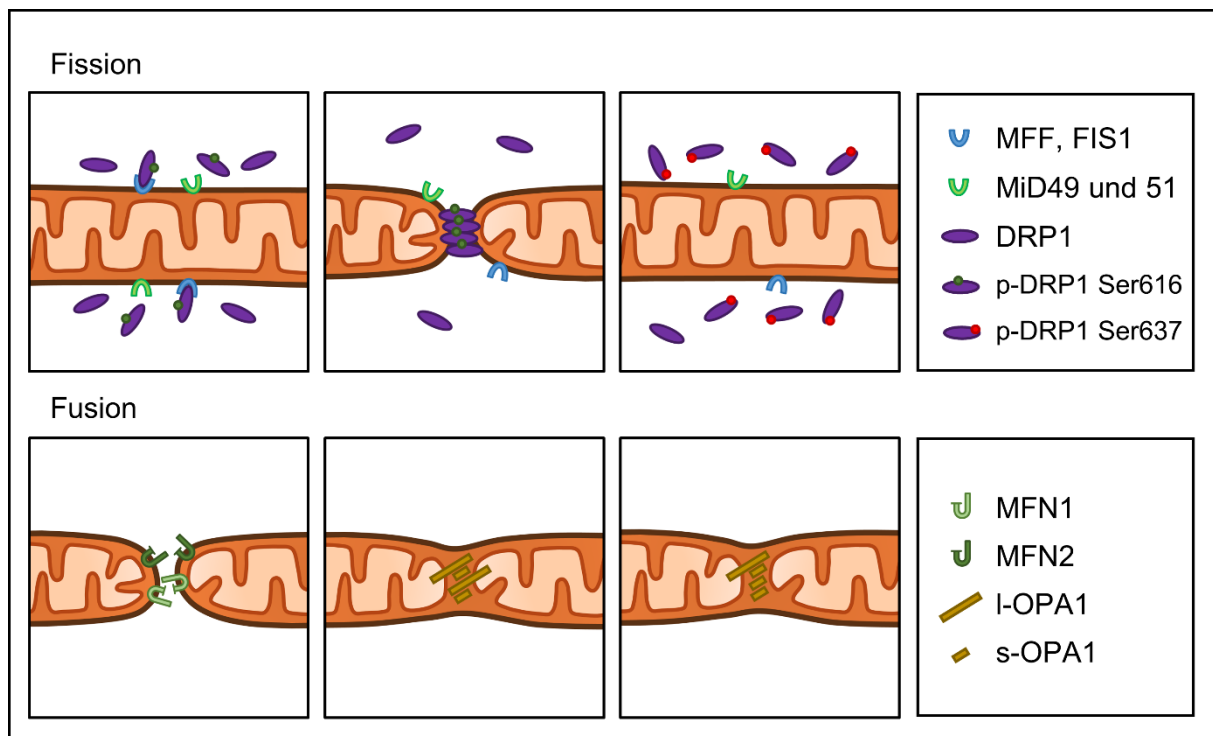


Abbildung 6: Mechanismen der mitochondrialen Fission und Fusion unter physiologischen Bedingungen. Die mitochondriale **Fission** wird hauptsächlich durch das Enzym DRP1 reguliert. Durch Phosphorylierung an Serin 616 wird DRP1 aktiviert und zu den Rezeptoren MFF, FIS1, MiD49 und MiD51 rekrutiert und katalysiert die Fission. Durch Phosphorylierung an Serin 637 wird dieser Prozess gehemmt. Die mitochondriale **Fusion** wird in Fusion der äußeren und der inneren mitochondrialen Membran unterteilt. Im ersten Schritt katalysieren die Membranproteine MFN1 und MFN2 die Fusion der äußeren Membran. Im zweiten Schritt sorgt OPA1 für die Fusion der inneren Membran. Hierbei ist prozessiertes OPA1, also s-OPA1, nicht in der Lage, die Fusion zu katalysieren. Es muss also eine entsprechende Menge l-OPA1 für eine erfolgreiche Fusion vorhanden sein [54, 60].

Unter anderem durch den Verlust des Membranpotentials wird die autokatalytische Spaltung von OMA1 initiiert [66]. Die Spaltung von OMA1 erhöht die Protease-Aktivität und fördert die Spaltung von OPA1, was zu einer Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerks führt [66, 67]. YME1L1 spaltet OPA1 an einer anderen Stelle als OMA1 und führt zu einer Akkumulation von sowohl langen als auch kurzen Formen von OPA1, die beide für die mitochondriale Fusion notwendig sind [64, 68].

Insgesamt herrscht ein stark reguliertes Gleichgewicht zwischen Fission und Fusion, das die Mitochondrien funktionsfähig hält. Der genaue Mechanismus und die Regulation sind allerdings selbst unter normothermen Bedingungen noch nicht vollständig verstanden. Unter hypothermen Bedingungen ist zur mitochondrialen Dynamik nahezu nichts bekannt.

1.2.2 Kälteinduzierte mitochondriale Fragmentation

Das Gleichgewicht zwischen Fission und Fusion wird durch Kälte verändert und Mitochondrien zeigen bei 4 °C starke morphologische Veränderungen [21]. Diese kälteinduzierte mitochondriale Fragmentation wurde zum ersten Mal in Rattenleberendothelzellen beschrieben und konnte seitdem in weiteren Zelltypen beobachtet werden [21, 69-71].

Unter physiologischen Bedingungen bilden die Mitochondrien ein verzweigtes Netzwerk aus tubulären Strukturen aus, das in der Kälte zu vielen kurzen Mitochondrien fragmentiert. Außerdem gibt es Hinweise, dass die kälteinduzierte mitochondriale Fragmentation unter bestimmten Bedingungen nicht reversibel ist und mit dem Zelltod einhergeht [21, 43, 70].

Da bei Mitochondrien mit einer starken Fragmentation meist auch ein Abfall der Energieproduktion einhergeht, ist dieser Umstand für die Transplantationsmedizin von großem Interesse. Zum genauen Auftreten der Fragmentation in der Kälte und dem dahinterliegenden Mechanismus ist allerdings bisher nichts bekannt. Wegen ihrer wichtigen Rolle bei der Energiebereitstellung und vielen weiteren zellulären Prozessen sollte dieser Umstand weiter untersucht werden.

1.3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der kälteinduzierten mitochondrialen Fission unter nichtschädigenden Bedingungen (Zugabe eines Eisenchelators) als Voraussetzung für weitere Forschung im Zusammenhang mit Zellschädigung z.B. Wiedererwärmungsschädigung. Dazu gehörten die Beschreibung der Temperaturabhängigkeit und der Zeitabhängigkeit der Fragmentation sowie Untersuchungen zu funktionellen Konsequenzen und die Klärung des zugrundeliegenden Mechanismus.

Außerdem sollte die Auswirkung von Rekonditionierungsbedingungen auf die kälteinduzierte mitochondriale Fragmentation betrachtet werden. Genauer sollte die Reversibilität der Fragmentation bei Wiedererwärmung sowie ihr Zusammenhang zur Wiedererlangung der Zellfunktionen untersucht werden, um einen faktenbasierten Ansatz für ein optimiertes Wiedererwärmungsprotokoll zu liefern.

2 Experimentelles Modell

Aufgrund der Bedeutung, die das Endothel bei der Organtransplantation trägt, wurden in dieser Arbeit Endothelzellen untersucht. Es wurden primäre Schweineaortenendothelzellen im Monolayer verwendet, um in einem möglichst physiologischen Zellmodell die Kältesensitivität insbesondere der Mitochondrien zu untersuchen. Da in dieser Arbeit die Temperatureffekte auf die Mitochondrien charakterisiert werden sollten, die weder von einer Toxizität der Konservierungslösung noch von der (eisenabhängigen) Kälteschädigung oder von Substratmangel überlagert werden, wurde die Kaltinkubation in Krebs-Henseleit-Puffer mit dem Eisenchelator Deferoxamin und einer physiologischen Glukosekonzentration durchgeführt. Dieser Puffer ist der extrazellulären physiologischen Ionenzusammensetzung nachempfunden.

Zur Färbung der Mitochondrien wurden die Fluoreszenzfarbstoffe MitoTracker Red, MitoTracker Green und Tetramethylrhodamin-Methylester (TMRM) verwendet. Infolge des negativen Membranpotentials wurden die Mitochondrien durch den membranpermeablen Farbstoff mit delokalisierte positiver Ladung selektiv angefärbt. MitoTracker Red wurde wegen seiner geringen Phototoxizität eingesetzt, während MitoTracker Green zur Gegenfärbung von TMRM für die Untersuchung des Membranpotentials verwendet wurde. Dabei binden die MitoTracker-Farbstoffe kovalent an Proteine und sind damit nach der Färbung potentialunabhängig gebunden, während TMRM weiterhin potentialabhängig bleibt. Durch eine Ko-Färbung kann das Membranpotential untersucht werden; für eine reine morphologische Untersuchung ist der potentialunabhängige MitoTracker Red allerdings besser geeignet. Über Immunfluoreszenz konnte die GTPase DRP1 sowie Mikrotubuli als Teil des Cytoskeletts angefärbt werden. Zur funktionellen Untersuchung der Mitochondrien wurde der zelluläre ATP-Gehalt durch die biolumineszierende Luciferase-Reaktion bestimmt. Außerdem wurde als Maß der metabolischen Aktivität die Reduktion von Resazurin zu Resorufin untersucht. Per Westernblot-Methode wurden die Proteinmengen der an der mitochondrialen Dynamik beteiligten Proteine zu verschiedenen Zeitpunkten inklusive ihres Phosphorylierungs- und Prozessierungsstatus bestimmt.

3 Publikationen

3.1 Quiring et al., Mol Med, 2022

Im Folgenden ist die Publikation 1 aus dem peer-reviewed fachspezifischen Journal *Molecular Medicine*, Verlag BMC, London, angehängt.

Sie ist unter der “Creative Commons Attribution 4.0 International Licence CC BY 4.0” lizenziert, wurde am 31. Januar 2022 veröffentlicht und ist unter der folgenden Zitation oder dem digitalen Objektbezeichner (*digital object identifier*, DOI) zu finden:



Quiring, L., Walter, B., Lohaus, N., Schwan, D., Rech, A., Dlugos, A., and Rauen, U. (2022). Characterisation of cold-induced mitochondrial fission in porcine aortic endothelial cells. *Mol Med* 28, 13. <https://doi.org/10.1186/s10020-021-00430-z>

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Characterisation of cold-induced mitochondrial fission in porcine aortic endothelial cells

Leonard Quiring¹, Björn Walter², Niklas Lohaus^{2,3} , Dhanusha Schwan², Anja Rech¹, Andrea Dlugos^{2,4} and Ursula Rauen^{1,2*} 

Abstract

Background: Previously, we observed that hypothermia, widely used for organ preservation, elicits mitochondrial fission in different cell types. However, temperature dependence, mechanisms and consequences of this cold-induced mitochondrial fission are unknown. Therefore, we here study cold-induced mitochondrial fission in endothelial cells, a cell type generally displaying a high sensitivity to cold-induced injury.

Methods: Porcine aortic endothelial cells were incubated at 4–25 °C in modified Krebs–Henseleit buffer (plus glucose to provide substrate and deferoxamine to prevent iron-dependent hypothermic injury).

Results: Cold-induced mitochondrial fission occurred as early as after 3 h at 4 °C and at temperatures below 21 °C, and was more marked after longer cold incubation periods. It was accompanied by the formation of unusual mitochondrial morphologies such as donuts, blobs, and lassos. Under all conditions, re-fusion was observed after rewarming. Cellular ATP content dropped to 33% after 48 h incubation at 4 °C, recovering after rewarming. Drp1 protein levels showed no significant change during cold incubation, but increased phosphorylation at both phosphorylation sites, activating S616 and inactivating S637. Drp1 receptor protein levels were unchanged. Instead of increased mitochondrial accumulation of Drp1 decreased mitochondrial localization was observed during hypothermia. Moreover, the well-known Drp1 inhibitor Mdivi-1 showed only partial protection against cold-induced mitochondrial fission. The inner membrane fusion-mediating protein Opa1 showed a late shift from the long to the fusion-incompetent short isoform during prolonged cold incubation. Oma1 cleavage was not observed.

Conclusions: Cold-induced mitochondrial fission appears to occur over almost the whole temperature range relevant for organ preservation. Unusual morphologies appear to be related to fission/auto-fusion. Fission appears to be associated with lower mitochondrial function/ATP decline, mechanistically unusual, and after cold incubation in physiological solutions reversible at 37 °C.

Keywords: Mitochondrial dynamics, Mitochondrial fragmentation, Mitochondrial fusion, Endothelium, Mitochondria, Preservation

Introduction

Organs are stored under hypothermic conditions (in special preservation solutions) to preserve integrity and function for transplantation. While hypothermia has beneficial effects, delaying injury caused by ischemia and subsequent energy deficiency, it also leads to

*Correspondence: ursula.rauen@uni-duisburg-essen.de

² Institut für Physiologische Chemie, Universitätsklinikum Essen, Hufelandstr. 55, 45147 Essen, Germany
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2022. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

cold-induced injury (Belzer et al. 1988; Rauen et al. 1999, 2002). The major mechanism of cold-induced injury to diverse cell types has been shown to be an increase in the intracellular chelatable iron pool leading to the formation of highly reactive oxygen species and an iron-dependent induction of a mitochondrial permeability transition (Kerkweg et al. 2002; Rauen et al. 2000, 2003, 2004). As an additional change occurring in cells incubated under hypothermic conditions, we observed a pronounced mitochondrial fission after cold incubation of liver endothelial cells for 18 h at 4 °C in University of Wisconsin solution (Kerkweg et al. 2003). This fission occurred both in the absence and in the presence of the iron chelator deferoxamine. Subsequently, marked fission was observed under hypothermic conditions in many cell types relevant in transplantation medicine, such as hepatocytes (Pless et al. 2012; Rauen et al. 2003), corneal endothelial cells (Rauen et al. 2006), and kidney epithelial cells (Hendriks et al. 2017; Zhang et al. 2010)/renal tubules (Bienholz et al. 2017). In these studies, mitochondrial fission was observed after different periods of cold incubation (18 h–5 days) at 4 °C or 10 °C and in many different storage solutions.

In principle, mitochondrial fission is a physiological process. Under normothermic conditions mitochondria form a dynamic network in the cell by continuous fission and fusion, processes crucial for equal distribution of mitochondria to daughter cells (Taguchi et al. 2007), for quality control (Chan 2012; Twig et al. 2008) and for the response to varying energy requirements (Pagliarini et al. 2008), with the interconnected network being more efficient in ATP production (Pernas et al. 2016). The processes of these mitochondrial dynamics are highly regulated. Under normothermic conditions mitofusin (Mfn) 1 and 2 and optic atrophy protein 1 (Opa1) are responsible for fusion of the outer and inner mitochondrial membrane (Cipolat et al. 2004; Ishihara et al. 2004; Song et al. 2009), respectively, while dynamin-related protein 1 (Drp1)—in conjunction with its receptors fission 1 protein (Fis1), mitochondrial fission factor (Mff), mitochondrial dynamics proteins of 49 kDa (MiD49) and of 51 kDa (MiD51)—is regarded to be crucial for mitochondrial fission (Hoppins et al. 2007; Kraus et al. 2021; Otsuga et al. 1998, van der Bliek et al. 2013).

While the mechanisms of mitochondrial fission have been described in detail for normothermic conditions (Kraus et al. 2021), little is known about the mechanisms and consequences of cold-induced mitochondrial fission. Furthermore, its temperature dependence is unclear but of great interest with regard to evolving subnormothermic preservation methods (Kaths et al. 2018; Moers et al. 2009). Therefore, we here study the occurrence and mechanisms of cold-induced mitochondrial fission in

endothelial cells, i.e. in a cell type known to be very sensitive to hypothermia (Bath et al. 2019; Nordling et al. 2018, Rauen et al. 2004), and under conditions where this mitochondrial alteration is not superimposed by mitochondrial permeability transition and/or cellular injury.

Methods

Isolation and culture of porcine aortic endothelial cells

Porcine aortae were obtained from the local slaughterhouse. Endothelial cells were isolated mechanically as described by Peters et al (Peters 2005). The cells were cultured in M199 cell culture medium (Biochrom, Germany) supplemented with fetal calf serum (20% *v/v*), L-glutamine (2 mM) and antibiotics (100 U/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin) under a humidified 5% CO₂ atmosphere and split 1:3 on day 4. Three days later the cells were again split 1:3 and used for experiments after 48 h in an early confluent state.

Cold incubation/rewarming

For experiments the cells were washed with Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS, 37 °C) and incubated in modified Krebs–Henseleit (KH) buffer (143.6 mM Na⁺; 128.3 mM Cl⁻; 25.0 mM HCO₃⁻; 5.9 mM K⁺; 1.2 mM Mg²⁺; 1.2 mM SO₄²⁻; 1.2 mM H₂PO₄⁻; 2.5 mM Ca²⁺; 20.0 mM HEPES) supplemented with glucose (5 mM) and deferoxamine (1 mM, Novartis, Basel, Switzerland), the latter added to prevent iron-dependent cellular and mitochondrial injury (Rauen et al. 2004). The cold incubation solution was added at room temperature, and cells were kept under a 5% CO₂, 21% O₂ and 74% N₂ atmosphere (for the maintenance of the bicarbonate buffer system) at 4 °C or at other temperatures specified in the results section (Rauen et al. 1999). For some experiments, the Drp1 inhibitor Mdivi-1 (20 μM, Enzo Life Sciences, Farmingdale, New York, USA) or DMSO as solvent control were added to the cells for a 15 min pre-incubation in KH buffer (+ 5 mM glucose) as well as to the cold incubation solution. For some experiments, the tubulin polymerization inhibitor nocodazole (5 μM, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) or DMSO (solvent control) was added 18 h before and during rewarming (rewarming with 5% instead of 20% fetal calf serum). After different periods of cold incubation, cells were washed once with cold HBSS, cold cell culture medium was added and cells were slowly rewarmed at 37 °C. For some control conditions, cycloheximide (50 μg/ml; Applichem, Darmstadt, Germany), α-amanitin (10 μg/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) or carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCP; 20 μM; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) were added to the incubation solution.

Mitochondrial morphology

For microscopic studies cells were grown on collagen-coated coverslips. The cells were washed with HBSS and stained with MitoTracker Red CMXRos (150 nM; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in KH buffer with glucose (5 mM) for 20 min at 37 °C. After washing the cells were incubated dye-free for 2 h in KH buffer with glucose and then exposed to cold conditions as described above.

The cells were fixated with PFA (3.7% *w/v*) in cell culture medium for 10 min at incubation temperature followed by 15 min at 37 °C. The slides were mounted on an object slide and analysed using fluorescence microscopy (Axio Observer.Z1 with Apotome1, Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC, Zeiss, Germany; $\lambda_{\text{exc.}} = 546 \pm 6$ nm, $\lambda_{\text{em.}} \geq 590$ nm).

For live cell imaging the cells were incubated on the microscope in the Cooling/Heating Incubation Insert P-Set 2000 (Pecon, Erbach, Germany) at the indicated temperature with 5% CO₂ (maintained at the same temperature). To protect the cells from phototoxicity, excitation light intensity (Colibri.2, Zeiss, Germany; 2% intensity), the frequency of the exposures (every 20 min at 8 °C or every 5 min at 37 °C) and the exposure time (2000 ms) were reduced to a minimum.

Immunofluorescence

For immunofluorescence MitoTracker-stained cells were fixated, residual PFA was quenched with NH₄Cl (50 mM) in PBS for 30 min, cells were permeabilized with Triton X-100 (0.5% *v/v*) and, after washing, blocked according to the manufacturer's instructions. The cells were covered with the antibody (Drp1: Cell Signalling, #8570, 1:50 dilution, 1 h at RT; α -Tubulin, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA, T5168, 1:500, 1 h at RT), washed and incubated with the secondary antibody (Anti-Rabbit IgG-FITC, Sigma-Aldrich, #F9887, 1:100, 45 min at RT; anti-Mouse IgG-FITC, Sigma-Aldrich, F9137, 1:100, 1 h at RT), then mounted and analysed by fluorescence microscopy ($\lambda_{\text{exc.}} = 470 \pm 20$ nm, $\lambda_{\text{em.}} = 525 \pm 25$ nm).

Mitochondrial membrane potential

Washed cells were counterstained with MitoTracker Green (500 nM; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) in KH buffer with glucose (5 mM) for 20 min at 37 °C.

Then cells were stained with TMRM (500 nM; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) for 20 min. During experiments, a 100 nM maintenance dose was added to the incubation solution. Cells were analysed by fluorescence microscopy (TMRM: $\lambda_{\text{exc.}} = 546 \pm 6$ nm,

$\lambda_{\text{em.}} \geq 590$ nm; MitoTracker Green: $\lambda_{\text{exc.}} = 470 \pm 20$ nm, $\lambda_{\text{em.}} = 525 \pm 25$ nm).

Electron microscopy

For electron microscopy cells were fixed using 5% (*w/v*) glutaraldehyde and 8% (*w/v*) paraformaldehyde in PHEM buffer (60 mM PIPES, 25 mM HEPES, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, pH 7.2; Schliwa et al. 1981) for 30 min at incubation temperature followed by 30 min at room temperature. Afterwards cells were further fixed using 2.5% (*w/v*) glutaraldehyde and 4% (*w/v*) paraformaldehyde in PHEM buffer for 2 h at room temperature. Then cells were processed as described before (Polishchuk et al. 2013). Samples were cut in ultrathin sections (55 nm) using a Leica EM TRIM2 (Leica, Wetzlar, Germany). Sections were analysed using the Transmission Electron Microscope System JEOL-JEM 1400 Plus (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) of the central imaging facility of the Universitätsklinikum Essen (IMCES) at 120 kV.

Cell viability

Hoechst 33342 and propidium iodide staining was performed and LDH release measured as previously described (Rauen et al. 1999). Incubation times for Hoechst 33342 were extended under cold conditions to 2 h.

ATP measurement

The ATP content of cells grown on 6-well plates was determined using the ATP Bioluminescence Assay Kit CLSII (Roche, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Western blot

Cell extract preparation was performed as described previously (Bienholz et al. 2017). The shown proteins were visualised using a rabbit antibody against Phospho-Drp1-S637 (Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA, #4867), Phospho-Drp1-S616 (Cell Signaling, #4494), Drp1 (Cell Signaling, #5391), Opa1 (Cell Signaling, #80471), Fis1 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, #PA5-22142), Mfn1 (Merck, Darmstadt, Germany, #ABC41), Caspase-3 (Cell Signaling, #9662), Mff (Cell Signaling, #84580), Phospho-Mff (Cell Signaling, #49281), MiD51 (Proteintech, Rosemont, Illinois, USA, 20164-1-AP), MiD49 (Proteintech, 28718-1-AP) and a mouse antibody against Oma1 (Santa Cruz, Dallas, Texas, USA, sc-515788) and Mfn2 (Abcam, Cambridge, United Kingdom, #ab56889), all in 1:1000 dilution. Anti-rabbit IgG (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA, #A8275) and anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich, #A4416) conjugated with peroxidase was used as secondary antibody in 1:5000 dilution. The chemiluminescence signals (SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity

Substrate, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) were recorded using the gel documentation system Fusion Pulse 6 (Vilber Lourmat, Eberhardzell, Germany) and quantified by the software Bio1D (Vilber Lourmat, Eberhardzell, Germany). Gels stained with Coomassie were used as a loading control.

Statistics

All experiments were performed in duplicate and repeated four times. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The Friedman test was used for all statistical calculations; $p \leq 0.05$ was considered significant.

Results

Cold-induced mitochondrial fission

Under normothermic control conditions, porcine aortic endothelial cells stained with MitoTracker Red showed a network of long filamentous mitochondria (Fig. 1A). After 48 h of cold incubation (4 °C), however, mitochondria showed marked fission (Fig. 1B). This fission was reversible when the cells were rewarmed for 1 h at 37 °C (Fig. 1C).

Mitochondrial membrane potential of fragmented mitochondria

Co-staining with MitoTracker Green (Fig. 1D–F; green) and tetramethylrhodamine (TMRM; red)—resulting predominantly in co-localization of fluorescence in the overlay—confirmed that mitochondria fragmented at 4 °C and demonstrated that the fragmented mitochondria in the cold still had mitochondrial membrane potential.

Cell viability

Staining with Hoechst 33342 and propidium iodide showed that during cold incubation and after rewarming cell injury only affected very few cells (<1.5%; Fig. 1G–I). Similar data were obtained assessing the release of lactate dehydrogenase (LDH; Fig. 1J). Caspase-3 cleavage, as marker of apoptosis, could not be observed after 48 h of cold incubation, although the positive control (cycloheximide; Alessenko et al. 1997) was positive (Fig. 1K)—confirming that cold-induced mitochondrial fission was not due to cell injury/apoptosis.

Time dependence of mitochondrial fission

When cells were incubated for different time periods at 4 °C, mitochondria showed fission as early as after 3 h (Fig. 2): The long tubular mitochondria typical for this cell type (Fig. 2A) fragmented in the cold to yield predominantly intermediate length mitochondria, with only a few elongated mitochondria left (Fig. 2B, G). With ongoing cold incubation, cold-induced fission became more marked (Fig. 2C–G). After 6 h most mitochondria were of intermediate length with an increase of short mitochondria. After 12 h of hypothermia there were no long (tubular) mitochondria left. After 24 h and 48 h of cold incubation the number of intermediate mitochondria decreased and short mitochondria predominated after 48 h. After 1 h of rewarming at 37 °C, marked re-fusion could be observed after all cold incubation periods up to 48 h (Fig. 2G). The cold-induced mitochondrial fission progressing over time was visualized in a time-lapse video at 8 °C (the lowest temperature technically possible for prolonged live cell imaging) which is available as Additional file 1 in the supplementary data. The reversibility of cold-induced fission is also shown in a time-lapse video performed during rewarming after cold incubation for 48 h at 4 °C (Additional file 2).

Temperature dependence of cold-induced mitochondrial fission

The extent of cold-induced mitochondrial fission showed a clear temperature dependence when cells were incubated for 48 h at temperatures ranging from 4 °C to 25 °C. At 4 °C the already described loss of long mitochondria and predominance of short mitochondria was noted (Fig. 3B). A similar result was observed at 10 °C and 15 °C with the disappearance of long mitochondria and a high percentage of short mitochondria (Fig. 3C, D). At 21 °C, in contrast, a large difference to the lower temperatures was visible, with only few short mitochondria, a predominance of intermediate length mitochondria and a considerable proportion of long mitochondria (Fig. 3E). At 25 °C the long morphology dominated with intermediate length mitochondria also being present (Fig. 3F). After “cold” incubation at all incubation temperatures the mitochondria had re-fused again after 1 h rewarming at 37 °C (Fig. 3G).

(See figure on next page.)

Fig. 1 Cold-induced mitochondrial fission and its reversibility. Mitochondria of porcine aortic endothelial cells stained with MitoTracker Red (A–C) are shown before cold incubation (A), after cold incubation at 4 °C for 48 h (B) and after rewarming for 1 h at 37 °C (C). Mitochondrial membrane potential (TMRM staining, red) is shown before cold incubation (D), after cold incubation for 48 h (E) and after rewarming (F) in mitochondria counter-stained with MitoTracker Green (green). Cell viability was assessed by propidium iodide uptake and Hoechst 33342 counter-staining (G–I), its quantification (J) and assessment of LDH release (J). Caspase 3 was analysed as an apoptosis marker; cycloheximide (Chx; 50 µg/ml) served as positive control (K). Representative figures of $n = 4$ experiments; for J means \pm SD of $n = 4$ experiments. (MitoTracker Red/TMRM/PI: $\lambda_{exc} = 546 \pm 6$ nm, $\lambda_{em} \geq 590$ nm; MitoTracker Green: $\lambda_{exc} = 470 \pm 20$ nm, $\lambda_{em} = 525 \pm 25$ nm; Hoechst: $\lambda_{exc} = 359 \pm 24$ nm, $\lambda_{em} = 445 \pm 25$ nm)

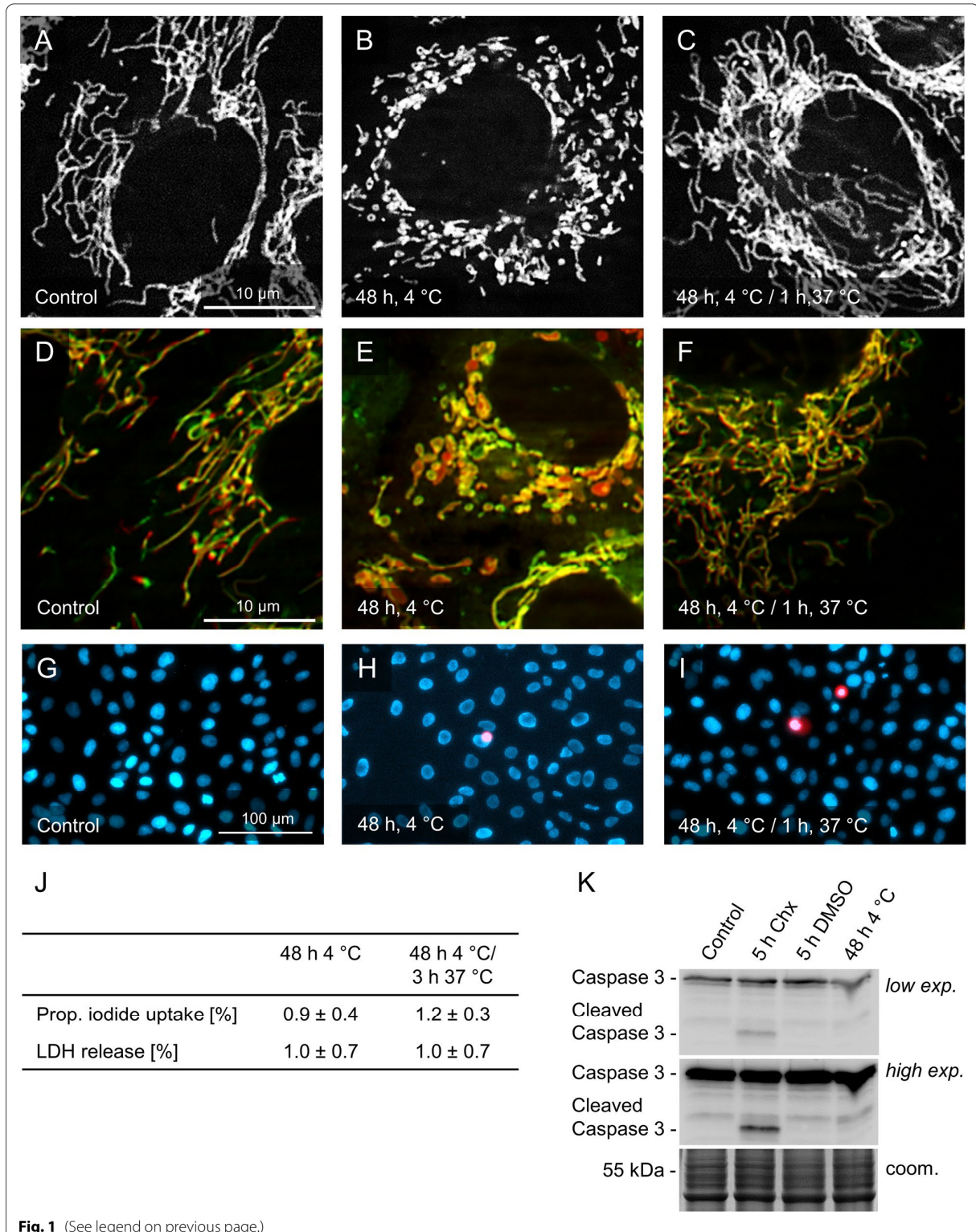
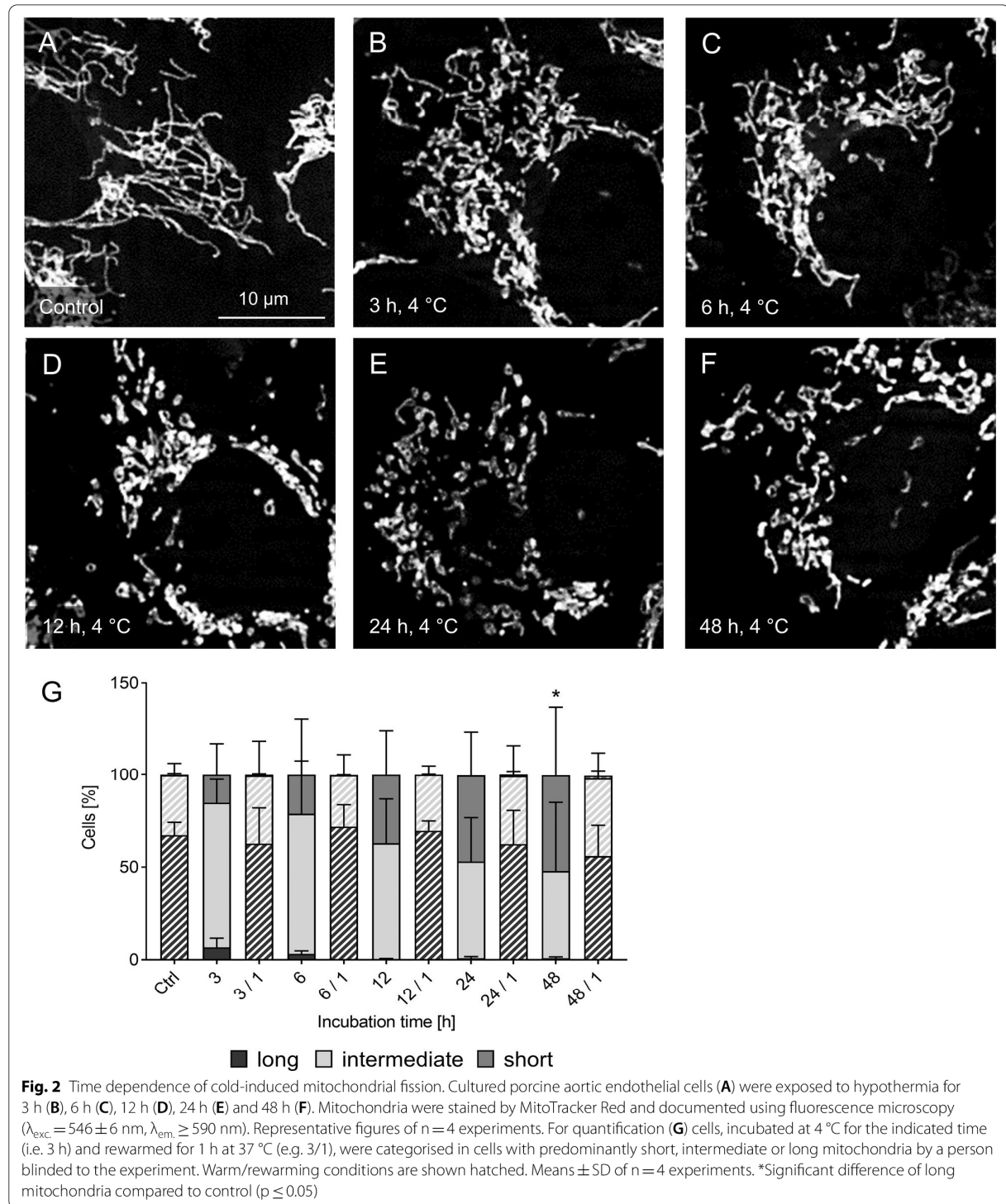
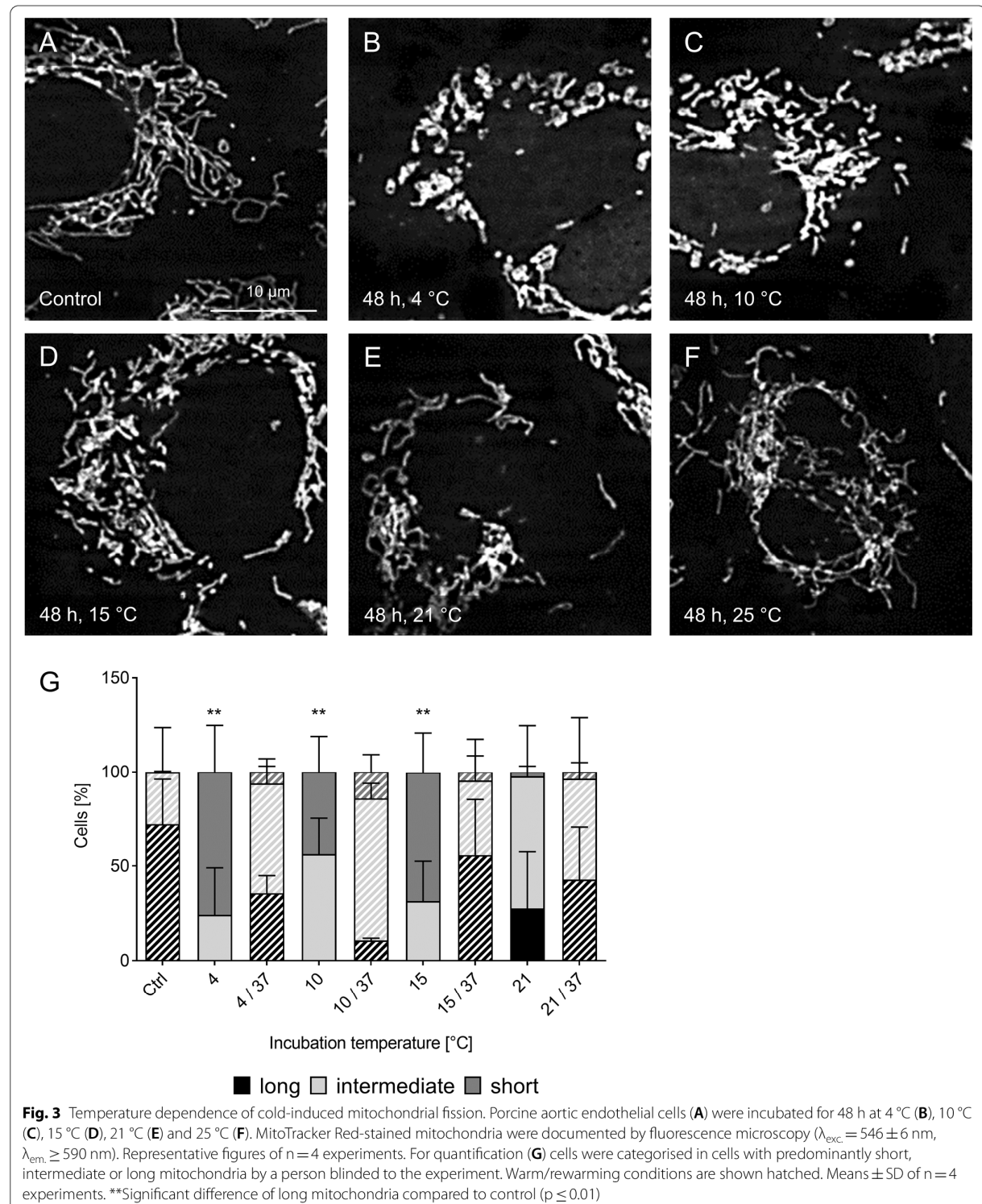
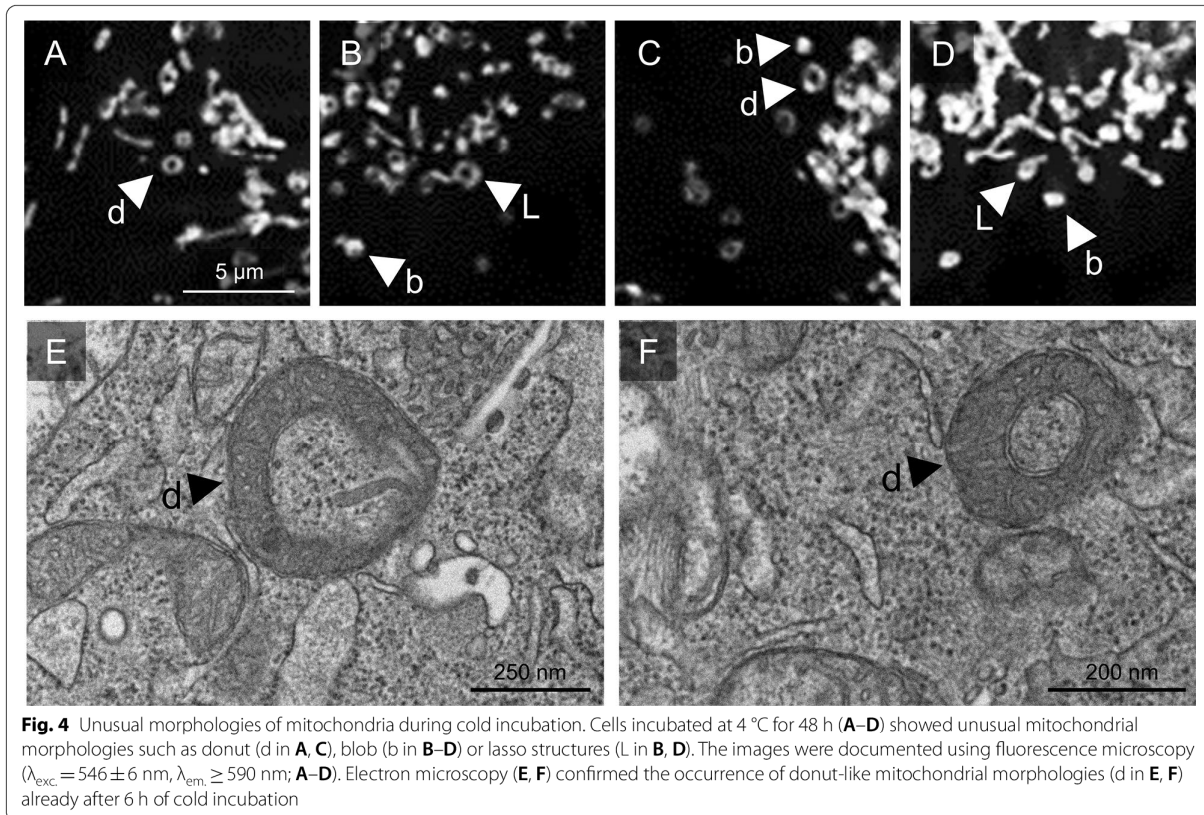


Fig. 1 (See legend on previous page.)







Occurrence of unusual morphologies with longer cold incubation periods

In addition to enhanced fission under hypothermic conditions mitochondria displayed further morphology changes (Fig. 4). Not only short or dot-like very short mitochondria but also donuts (ring-like mitochondria), blobs (swollen mitochondria/swollen donuts) and lasso-like mitochondria formation occurred in the majority of cells. Especially the typical donut morphology occurred in most cells under cold incubation (Fig. 4A) with blob and lasso morphologies present alongside it. These morphologies were observed after ≥ 6 h at 4 °C or after 48 h at ≤ 15 °C, increasing over time. In the ultrastructure a closed circular morphology of a proportion of the mitochondria (donut) could be observed (Fig. 4E, F).

Influence of cellular growth state/confluence

Because in a previous publication endothelial sensitivity towards cold storage conditions had been shown to be influenced by cellular growth state (Rauen et al. 1994b), with proliferating cells being less sensitive to cold storage conditions than late-confluent cells, a

potentially similar dependence of cold-induced mitochondrial fission on cellular growth state/culture period was assessed here by modifying the usual 48 h culture period to 24 h, 96 h and 168 h. While under all culture conditions long filamentous mitochondria predominated before cold incubation (Fig. 5A–D), cold-induced mitochondrial fission was visible throughout all experiments (Fig. 5E–H). The longer the culture period, the more marked the fission appeared already after 3 h of cold incubation. In the late-confluent cells cultured for one week (168 h) the observed fission was most marked (Fig. 5H).

Effects of cold incubation on Drp1 phosphorylation, Drp1 receptors and Drp1 localization

Drp1, the key enzyme of the fission machinery, showed no distinct alteration in protein levels neither under hypothermia nor after rewarming (Fig. 6). The same applied to its receptors Fis1, which is also considered to have a regulatory role (Yu et al. 2020), Mff, MiD49 and MiD51 and the two key enzymes for fusion of the outer mitochondrial membrane Mfn1 and Mfn2 (Fig. 6). In contrast to the total protein levels the phosphorylated isoforms of both Drp1 and Mff showed an increase over

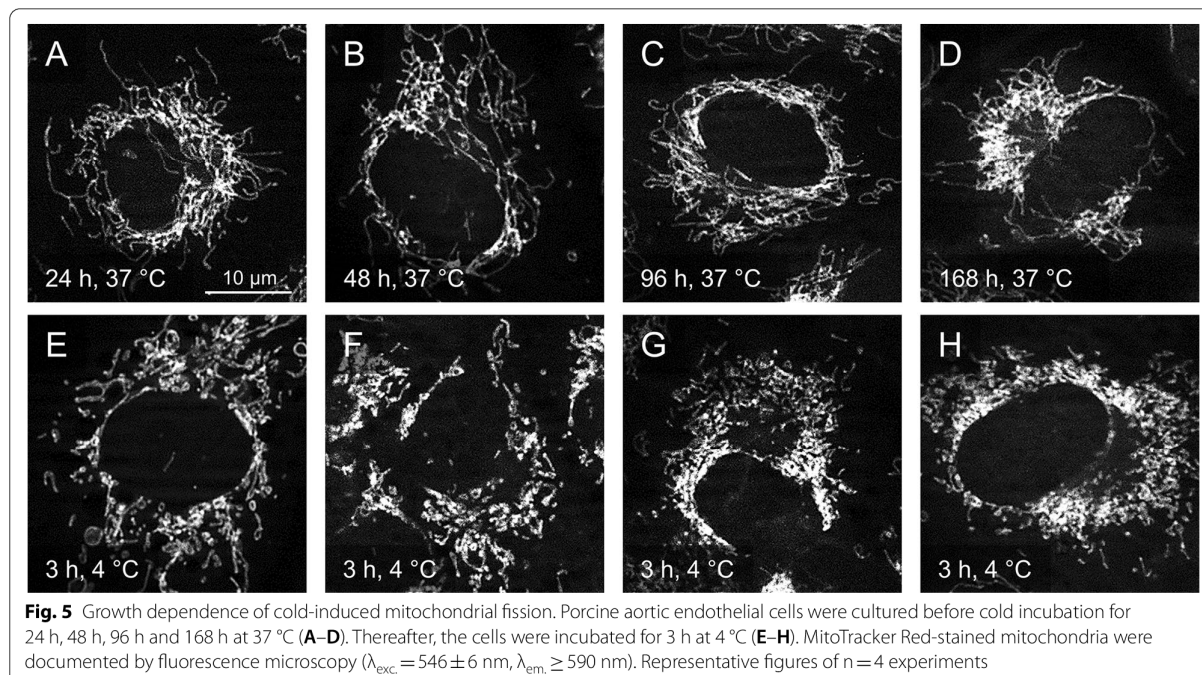


Fig. 5 Growth dependence of cold-induced mitochondrial fission. Porcine aortic endothelial cells were cultured before cold incubation for 24 h, 48 h, 96 h and 168 h at 37 °C (A–D). Thereafter, the cells were incubated for 3 h at 4 °C (E–H). MitoTracker Red-stained mitochondria were documented by fluorescence microscopy ($\lambda_{exc} = 546 \pm 6$ nm, $\lambda_{em} \geq 590$ nm). Representative figures of $n = 4$ experiments

(See figure on next page.)

Fig. 6 Qualitative and quantitative analysis of proteins involved in mitochondrial fission and outer membrane fusion. Protein lysates of porcine aortic endothelial cells incubated for 3 h, 6 h, 24 h or 48 h at 4 °C and rewarmed for 1 h at 37 °C were analysed by western blot (A) for protein levels of Drp1 and phosphorylation of Drp1 (activating site p-Drp1-S616 and inactivating site p-Drp1-S637) and Fis1. Additionally Mff, p-Mff Ser146, MiD49, MiD51, Mfn1 and Mfn2 were targeted. Coomassie staining was used as loading control (coom.). Representative figures of $n = 4$ experiments. The band intensity was quantified using the BioVision software and normalized to the control (B–D). Rewarming conditions are shown hatched. Means \pm SD of $n = 4$ experiments. * Significantly different to control ($p \leq 0.05$) *** ($p \leq 0.005$) # Significantly different to the respective cold incubation ($p \leq 0.05$)

the cold incubation period. However, both the activating site S616 and the inactivating site S637 of Drp1 were phosphorylated in the cold with significant changes after 24 h and 48 h (Fig. 6B and C). Phosphorylated Mff showed a similar time course (Fig. 6D). When cells were rewarmed (37 °C) after each cold incubation period, the level of phosphorylated Drp1 and Mff decreased within 1 h to a level largely matching the control before cold exposure.

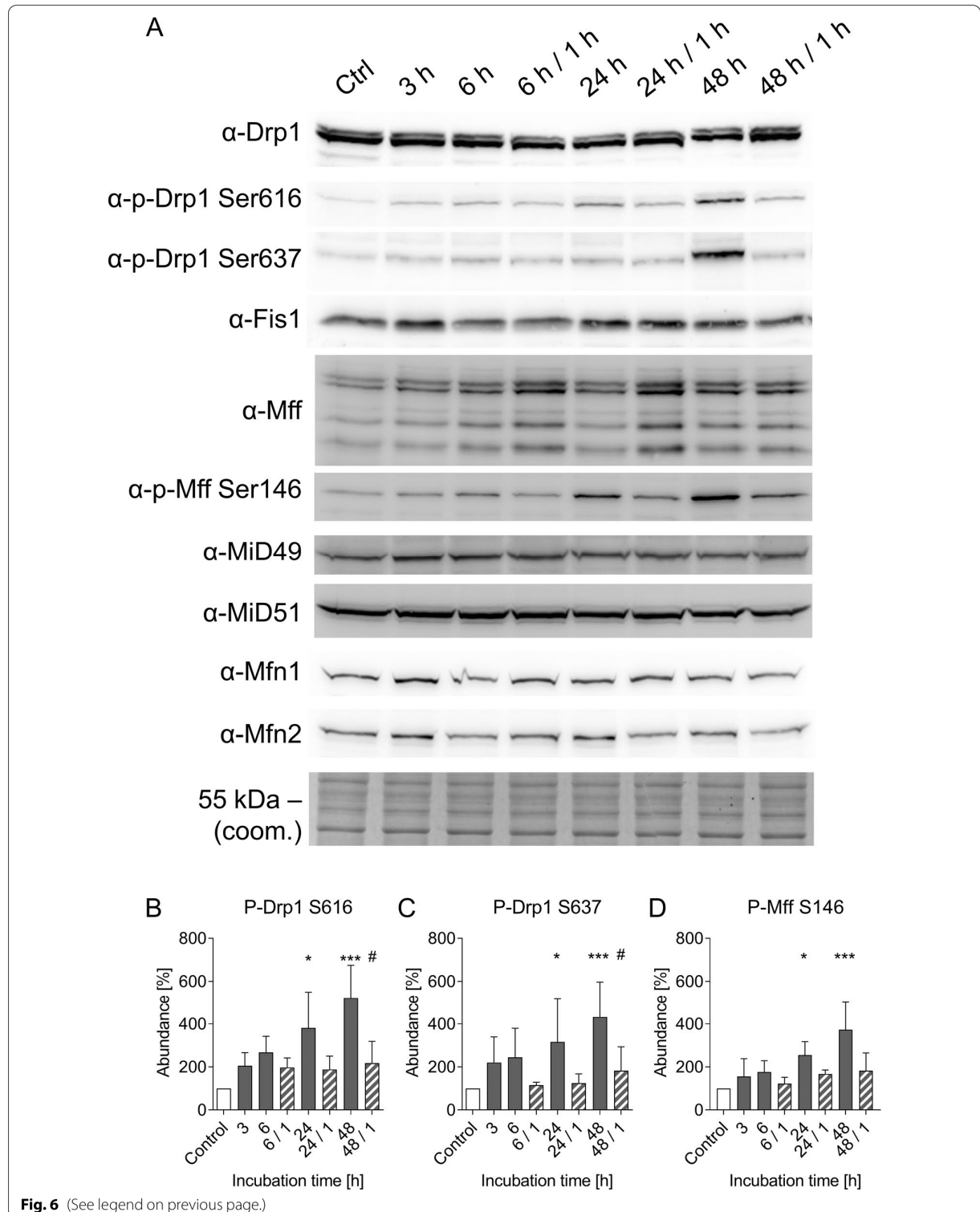
As both the activating and the inactivating phosphorylation site of Drp1 were phosphorylated under hypothermic conditions, the localization of Drp1 was analysed by immunofluorescence. In control cells not exposed to hypothermia punctate Drp1 staining could be observed (Fig. 7A) which co-localized to mitochondria (Fig. 7K). After a cold treatment of 3 h to 6 h at 4 °C both the punctate staining and the co-localization with mitochondria decreased (Fig. 7L, M). After 24 h cold incubation—the time duration in which the cold-induced mitochondrial

fission was practically completed (Figs. 2G, 7I)—almost no co-localization of the Drp1 antibody to mitochondria and mostly weak diffuse fluorescence in the cytosol (Fig. 7N) could be observed.

Addition of the Drp1 inhibitor Mdivi-1, although used at the high concentration of 20 μ M and with pre-treatment of the cells at 37 °C, did not prevent cold-induced mitochondrial fission (Fig. 8) but only slightly delayed it. The clearest difference occurred after 3 h (Fig. 8F vs. B, Fig. 8Q); after 6 h and even more so after 24 h fission was clearly visible under both conditions with little difference (Fig. 8G vs. C, Fig. 8H vs. D, Fig. 8Q). Mdivi-1 did also not change the behaviour of Drp1 dislocating from the mitochondria during cold incubation (less co-localization; Fig. 8J–L and N–P).

Effects of cold incubation on Opa1 processing

Opa1, the central protein for inner membrane fusion and generally regarded as a major player of mitochondrial



fusion, appears in five isoforms. The short isoforms (s-Opa1) result from cleavage of the long isoforms (l-Opa1) and are, in contrast to the long isoforms, not able to mediate fusion. Under normothermic control conditions, both, the long and the short isoforms of Opa1 could be observed (Fig. 9A), with the short forms accounting for about 55% of total Opa1 (Fig. 9B). Over the duration of cold incubation, there was no change in the total protein level of Opa1 (Fig. 9C), but in the ratio of s-Opa1 to total Opa1 (s-Opa1 plus l-Opa1; Fig. 9B). Only a very slight shift towards the short isoforms was visible after 3 h in the cold, i.e. at a time point when fission was already marked. Enhanced cleavage of l-Opa1 to s-Opa1 became more pronounced after longer periods of cold incubation with a marked difference at 24 h when >70% of Opa1 was processed to s-Opa1. The short isoforms finally exceeded 80% of total Opa1 after 48 h of cold incubation. In rewarmed cells the protein levels of Opa1 isoforms were hardly altered compared to the respective cold incubation. Oma1, a major Opa1 regulator cleaving Opa1, is activated by self-cleavage. Oma1 cleavage could not be observed during cold incubation or rewarming (Fig. 9D), not even after high exposure. Controls in which Oma1 self-cleavage was induced by adding the uncoupler carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazine (CCCP, 20 μ M), in contrast, clearly showed cleaved Oma1. In order to exclude that (low) constitutive Opa1 processing, together with lacking re-synthesis of l-Opa1 in the cold, could lead to the alteration of the cleavage ratio, the transcription inhibitor α -amanitin was added to warm control incubations (for 5 h at 37 °C, a time period that should yield—with regard to the Q₁₀ rule—largely equivalent metabolism as 48 h cold incubation). There were no differences between warm incubation with or without amanitin (Fig. 9E, F), i.e. inhibition of re-synthesis of l-Opa1 per se cannot explain the altered cleavage ratio after cold incubation.

Effects of cold incubation on cellular ATP levels

To assess mitochondrial function during/after cold storage cellular ATP content was measured. Under normothermic control conditions endothelial ATP content amounted to 4.7 ± 1.0 nmol ATP/ 10^6 cells (Fig. 10). Over the period of cold incubation cellular ATP content gradually declined with a significant drop to 1.9 ± 1.7 nmol/ 10^6 cells after 24 h and 1.5 ± 0.7 nmol/ 10^6 cells after 48 h at 4 °C. During rewarming after each cold incubation period

the ATP content increased again, reaching the level of the warm control within 1 h. To provide evidence that fission and fusion are important for the ATP decline during hypothermia and the ATP increase after rewarming, respectively, we performed controls in which re-fusion of mitochondria was prevented. To this end we inhibited tubulin polymerization by the addition of nocodazole (5 μ M; 18 h before the end of cold incubation, after mitochondrial fragmentation occurred). Intact microtubuli could be observed in the control (Fig. 10C) and after rewarming (Fig. 10F), lack of microtubuli (depolymerized tubulin) in the cold (Fig. 10D, E) and after rewarming with nocodazole (Fig. 10G). Re-fusion during rewarming was thus inhibited and mitochondria were noticeably shorter after rewarming with nocodazole (Fig. 10L, compare to Fig. 10K). In the incubation with nocodazole the ATP content did not increase to the level of the corresponding rewarming control (solvent control) after 1 h rewarming at 37 °C and remained below 50% of the control (Fig. 10B) suggesting that fusion is important for ATP generation.

Discussion

In this study we showed that cold-induced mitochondrial fission occurred already after short exposure to hypothermia (3 h, 4 °C) and over a wide temperature range (≤ 15 °C), that it is accompanied by unusual morphologies like donuts, that it does not appear to be clearly mediated by Drp1 and its receptors and that it appears functionally relevant.

Cold-induced mitochondrial fission occurring in isolated cells, as described here, has to be clearly differentiated to cold-induced mitochondrial fission in brown adipose tissue of whole animals; both are mechanistically totally different. Cold-induced mitochondrial fission in brown adipose tissue has been described to be triggered by the release of the stress hormone norepinephrine by the adrenal gland that is then acting on plasma membrane receptors (Wikstrom et al. 2014). Cold-induced mitochondrial fission in isolated cells or isolated organs cannot be mediated by this mechanism but must rather be triggered intrinsically in the cold-exposed cells.

Cold-induced fission in endothelial cells, i.e. the cell type that is most severely affected by hypothermia/organ preservation (McKeown et al. 1988; Rauen et al. 1994a, 2004), appeared to occur over a wide temperature range (Fig. 3). For transplantation, many different temperatures

(See figure on next page.)

Fig. 7 Immunofluorescence for Drp1 localisation under hypothermic conditions. Drp1 localisation was assessed using a Drp1 antibody and a FITC-labelled secondary antibody (A–E, green) in porcine aortic endothelial cells that had been stained with MitoTracker Red to show mitochondria (F–J, red). Merged images show cells (control cells, K) after cold incubation for 3 h (L), 6 h (M) and 24 h (N) and a staining without Drp1 antibody (only secondary antibody) as negative control (E, J, O). The images were documented by fluorescence microscopy (MitoTracker Red: $\lambda_{exc.} = 546 \pm 6$ nm, $\lambda_{em.} \geq 590$ nm; FITC: $\lambda_{exc.} = 470 \pm 20$ nm, $\lambda_{em.} = 525 \pm 25$ nm). Representative figures of n = 4 experiments

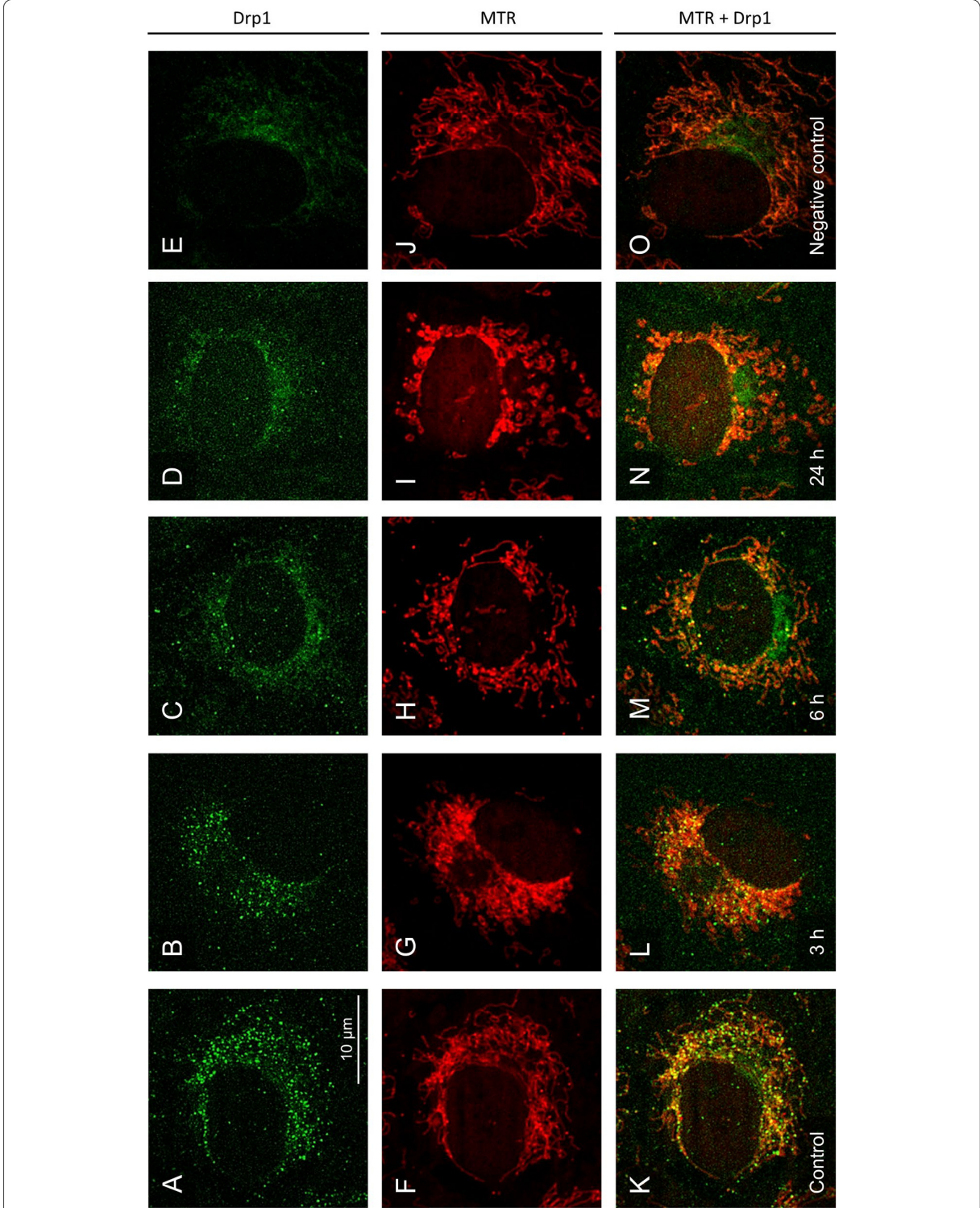


Fig. 7 (See legend on previous page.)

from subnormothermic temperature to supercooling are discussed for different organ preservation approaches (Bellini et al. 2019; de Vries et al. 2019; Fuller et al. 2013; Gilbo et al. 2017) and cold-induced mitochondrial fission might be relevant for most of them. The early occurrence of the enhanced fission at 4 °C (Fig. 2) underlines a potential relevance during organ preservation with many organs being stored for hours until transplantation (Jing et al. 2018). The cold-induced mitochondrial fragmentation observed here was very marked (Figs. 1, 2, 3), similar to other models of cold exposure of isolated cells (Hendriks et al. 2017; Kerkgweg et al. 2003; Rauen et al. 2006; Zhang et al. 2010), but exceeding the fission described in many normothermic models by far (Barsoum et al. 2006, Toyama et al. 2016).

Mitochondrial fission as occurring under physiological and most pathophysiological conditions, i.e. under conditions of normothermia, is regarded to be mediated by the GTPase Drp1 (Kraus et al. 2021) and its receptors fission 1 protein (Fis1), mitochondrial fission factor (Mff), mitochondrial dynamics proteins of 49 kDa (MiD49) and of 51 kDa (MiD51; Pernas et al. 2016). Drp1 is then believed to oligomerize at the outer mitochondrial membrane and to initiate mitochondrial abscission by GTP hydrolysis (Pernas et al. 2016). Drp1 is known to be regulated by different posttranslational modifications such as ubiquitylation, S-nitrosylation and sumoylation, but the best established and likely most important is phosphorylation. Phosphorylation at S616 by cyclin B kinase activates fission while phosphorylation at S637 by cyclic AMP-dependent protein kinase A inhibits the GTPase activity and thus inactivates the protein (Kraus et al. 2021).

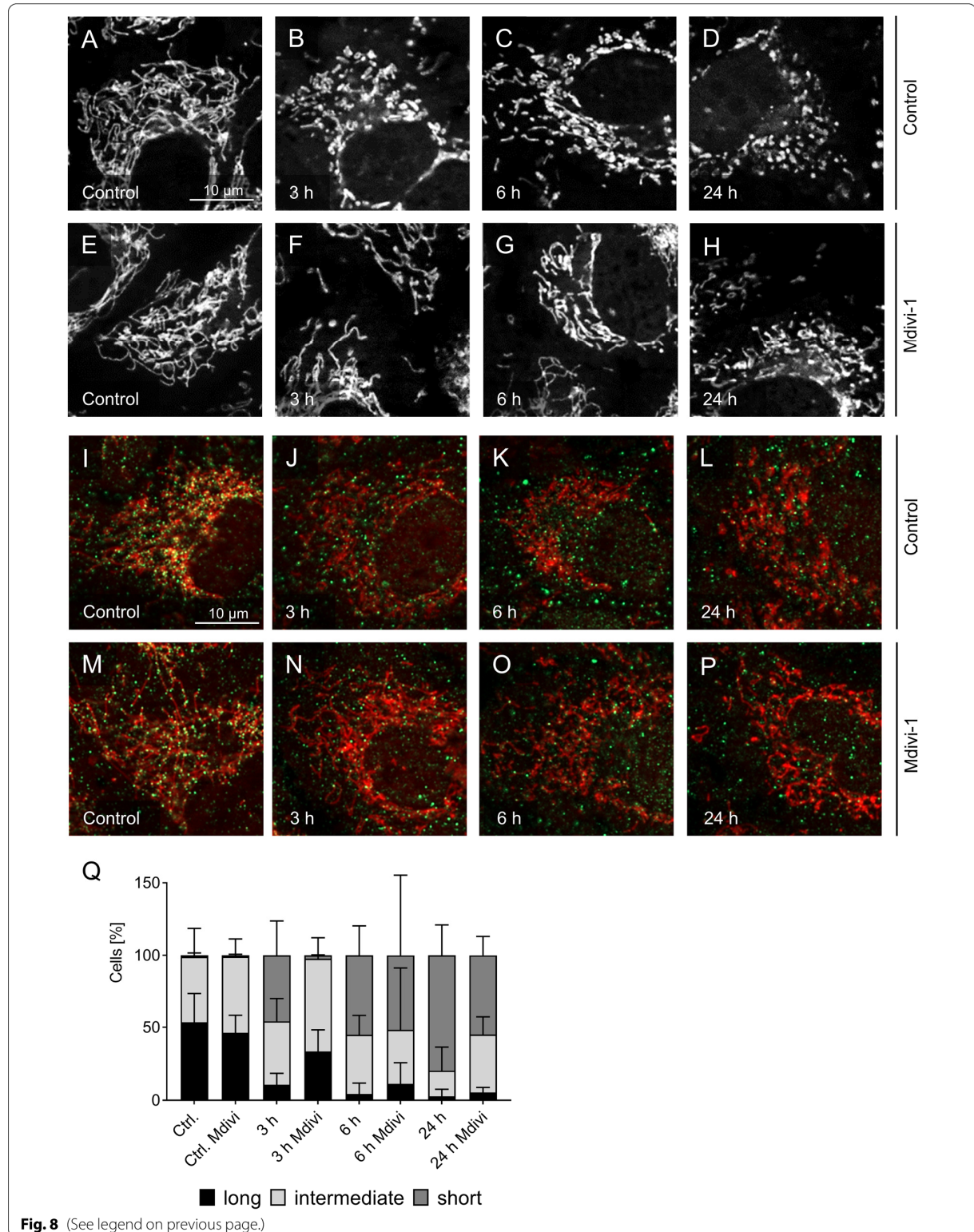
For cold-induced mitochondrial fragmentation, however, we could not find convincing evidence for this classical mechanism: Although there was phosphorylation at the activating site S616, significant phosphorylation was only observed after ≥ 24 h (Fig. 6) while most fission processes occurred within the first few hours of cold incubation leading to marked mitochondrial fragmentation already after 3 h of cold incubation (Fig. 2). Furthermore, both the activating (S616) and the inactivating (S637) site were phosphorylated in parallel (Fig. 6). Mff was also phosphorylated in the cold, while the total level of Mff did not change. And while it is described that phosphorylated Mff recruits Drp1 to the mitochondria (Zhou et al. 2018) and Mff-dependent fission can lead to

apoptosis of endothelial cells (Zhou et al. 2017), we did neither observe increased Drp1 recruitment in the cold (Fig. 7) nor cell injury or apoptosis (Fig. 1J, K). The parallel phosphorylation of Mff and of Drp1 at both phosphorylation sites might suggest that the phosphorylation is either a stress response or that kinases are less cold-sensitive (i.e. have higher residual activity in the cold) than phosphatases. In all cases, strong phosphorylation occurred only after prolonged cold incubation, when most of the fission had already occurred (Fig. 6B–D). And most importantly, immunofluorescence did not show increased mitochondrial Drp1 localization during hypothermia but rather less mitochondrial Drp1 localization than under warm control conditions (Fig. 7). In addition, the small molecule Drp1 inhibitor Mdivi-1, known to be very effective (Smith et al. 2017) and targeting the GTPase activity of Drp1 (Cassidy-Stone et al. 2008) did, in line with our results on Drp1 localization (Fig. 7), only slightly delay cold-induced mitochondrial fission but not prevent it (despite pre-incubation and high concentration; Fig. 8A–H, Q). Furthermore it did not alter Drp1 localization (Fig. 8I–P). Together, this could mean that cold-induced mitochondrial fission is partially or largely Drp1-independent—in contrast to mitochondrial fission in most models (Kraus et al. 2021; Smirnova et al. 2001).

Not only enhanced fission but also reduced fusion could lead to fragmented mitochondria at 4 °C. The central enzyme for fusion of the inner mitochondrial membrane Opa1 exists in different isoforms: Three short isoforms (s-Opa1) involved in the maintenance of cristae structure, and two long isoforms (l-Opa1) required for fusion (Lee et al. 2017). Opa1 is highly regulated by differential splicing and proteolytic processing by Yme1l or the stress-induced metalloprotease Oma1 (Pernas et al. 2016), which itself has been described to get activated by uncoupling and depolarisation of mitochondria (Baker et al. 2014; Jones et al. 2017; Toyama et al. 2016; Zhang et al. 2014). However, marked Opa1 cleavage only occurred after ≥ 6 h of cold incubation (Fig. 9A, B), while marked mitochondrial fragmentation was already present after 3 h of cold incubation (Fig. 2). In addition, even after 48 h of cold incubation mitochondria were still fusion-competent despite the decreased levels of l-Opa1 (Fig. 9) as rapid re-fusion after rewarming demonstrated (Fig. 1). This—in conjunction with the fact that reduced fusion would not lead to mitochondrial fragmentation

(See figure on next page.)

Fig. 8 Cold-induced mitochondrial fission despite the presence of the Drp1 inhibitor Mdivi-1. Porcine aortic endothelial cells (control, **A, I**) were incubated at 4 °C for 3 h, 6 h and 24 h with 20 μ M Mdivi-1 (**E–H, M–P**), a potent Drp1 inhibitor. DMSO was added as solvent control (**A–D, I–L**). Mitochondria were stained with MitoTracker Red. Additionally, Drp1 immunofluorescence (green) staining was applied (**I–P**). The images were documented by fluorescence microscopy (MitoTracker Red: $\lambda_{exc.} = 546 \pm 6$ nm, $\lambda_{em.} \geq 590$ nm; FITC: $\lambda_{exc.} = 470 \pm 20$ nm, $\lambda_{em.} = 525 \pm 25$ nm). Representative figures of $n = 4$ experiments. For quantification of mitochondrial fission (**Q**) cells were categorised in cells with predominantly short, intermediate and long mitochondria by a person blinded to the experiment. Means \pm SD of $n = 4$ experiments



without fission occurring—renders the loss of l-Opa1 unlikely to be the central mechanism responsible for cold-induced mitochondrial fragmentation. Nevertheless, the shift in the Opa1 cleavage ratio was marked after 48 h. It appeared to be due to true processing rather than decreased expression of full-length Opa1 (Fig. 9E, F). However, Oma1 protein levels did not change during cold incubation and no activation by cleavage was detectable (Fig. 9D).

In the literature cold-induced mitochondrial fragmentation was only addressed mechanistically in a few studies. In models of cold ischemia of the kidney, i.e. in models where renal cells were subjected to both, hypothermia and hypoxia, Parajuli et al. (2017) described, for the rat kidney, a loss of diverse fission and fusion proteins, but samples were only taken 24 h after reperfusion, i.e. long after rewarming. For the mouse kidney, Zhu et al. (2020) described PKC δ -dependent phosphorylation of Drp1 at S616, but did not provide data on S637. In HEK-293 cells exposed to hypothermia in DMEM cell culture medium (without CO₂), Hendriks et al. (Hendriks et al. 2017) observed increased mitochondrial expression of Drp1 and Zhang et al. (2010) observed fluctuating levels of Drp1 and of Mfn2, findings that we did not see in endothelial cells. In addition Zhang et al. showed that silencing of Mfn2 increased injury, suggesting that refusion is important for cellular survival. Whether Drp1 is crucial for mitochondrial fission also under hypothermic conditions, was not addressed in either of these studies. Most interestingly, in plants cold-induced mitochondrial fission was also observed when *Arabidopsis thaliana* was incubated at 4 °C and described to follow a different fission pathway than under normothermic conditions (Arimura et al. 2017).

In addition to fragmented, i.e. short or very short (dot-like) mitochondria, we also observed unusual mitochondrial morphologies under cold conditions in this study, namely donuts, lassos and blobs (Fig. 4). Donuts, i.e. short mitochondria auto-fused end-to-end (Fig. 4E, F), have also been observed under hypoxia and were regarded as a protection mechanism against volume alterations (Liu et al. 2011). Lasso-like structures occur when mitochondria auto-fuse end-to-side. Blobs have

been described to be swollen donuts (Ahmad et al. 2013), but, without time-lapse images or electron microscopy cannot be safely distinguished from short, swollen mitochondria. Donut and blob formation have been shown to be related to perturbations of mitochondrial Ca²⁺ and mitochondrial ROS formation in lung cells (Ahmad et al. 2013). Most notably, as donut and lasso formation require auto-fusion, their occurrence in our study is evidence that fusion is possible in hypothermia.

While there was no indication for a role of cell injury or apoptosis for cold-induced mitochondrial fission during cold incubation (Fig. 1G–K), it is not clear whether cold-induced mitochondrial fission is a physiological adaptation to the low cellular energy demand during hypothermia or whether it is an expression of stress. Interestingly, hamster kidney cells, i.e. cells from a hibernating animal, showed already short mitochondria under warm conditions (Hendriks et al. 2017). On the contrary the finding that ATP levels severely decreased during cold incubation (Fig. 10A) suggests that the mitochondrial fragmentation is not a mere adaptation to decreased energy demand but rather a reason for or a consequence of decreased ATP formation. The finding that the prevention of re-fusion after rewarming leads to reduced ATP production (Fig. 10B) could be an indication that fission is causing the low ATP content.

In our experiments, i.e. after cold aerobic incubation in a solution of physiological extracellular ion composition, cold incubation for ≤ 48 h and in the presence of the iron chelator deferoxamine which prevented cold-induced cell injury completely in these cells (Fig. 1G–K; in line with Rauen et al. 2004), cold-induced mitochondrial fission was completely reversible during rewarming and mitochondrial function was normalized. However, there is evidence that re-fusion is hampered or completely lost and mitochondrial and/or cellular injury occurs upon rewarming/reperfusion in the absence of an iron chelator (Kerkweg et al. 2003), after prolonged cold incubation (Pless et al. 2012), in other solutions (Klüsener et al., unpublished result) and under conditions of combined hypoxia and hypothermia (Parajuli et al. 2017, Zhu et al. 2020). Whether mitochondrial fission leads to the ATP decline (Pernas et al. 2016) under these conditions or

(See figure on next page.)

Fig. 9 Qualitative and quantitative analysis of Opa1 and Oma1 protein levels in cells exposed to hypothermia. Protein lysates of porcine aortic endothelial cells (Control, Ctrl) incubated for 3 h, 6 h, 24 h or 48 h at 4 °C, part of them rewarmed for 1 h at 37 °C (e.g. 48/1) were analysed by western blot with antibodies against Opa1 and Oma1. The two heavier bands represent the long isoforms of Opa1 (l-Opa1) known to be involved in inner membrane fusion and the three lighter bands represent the short isoforms (s-Opa1) incapable of mitochondrial fusion (**A, E**). The transcription inhibitor amanitine (Aman.; 10 μ g/ml) was added to assess a potential shift to s-Opa1 by missing transcription and thus missing synthesis of l-Opa1 (**E, F**). Cleavage of Oma1 was analysed (**D**), high exposure to carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCP; 20 μ M) served as positive control. Representative figures of $n = 4$ experiments. Coomassie staining was used as loading control (coom.). The band intensity was quantified using the BioVision software and plotted as s-Opa1 to total Opa1 (**B, F**) or total Opa1 content (**C**). Means \pm SD of $n = 4$ experiments. Cold conditions are shown as grey bars, warm conditions are shown as open, dotted or hatched bars. ** Significantly different to control ($p \leq 0.01$) *** ($p \leq 0.005$)

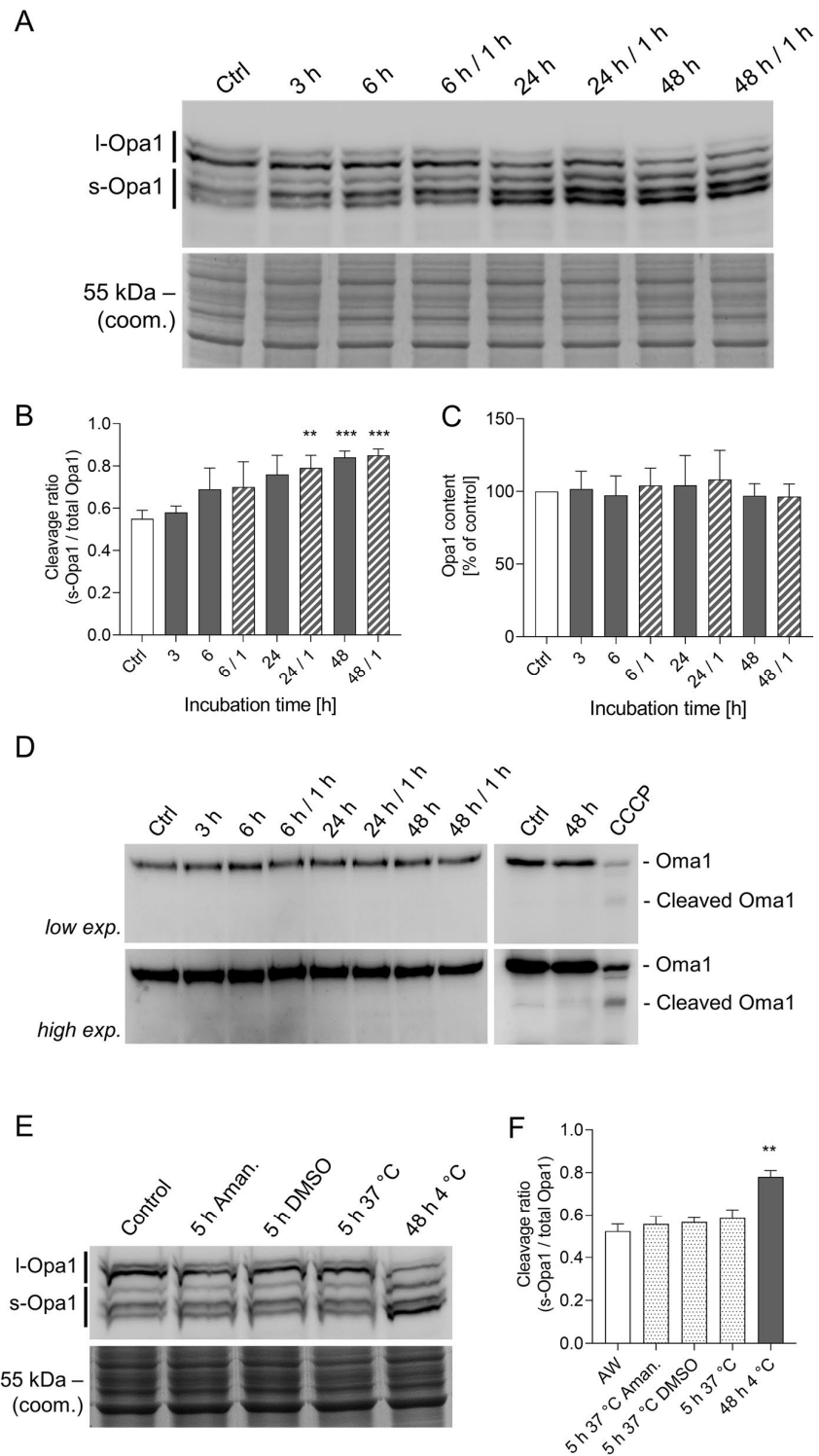
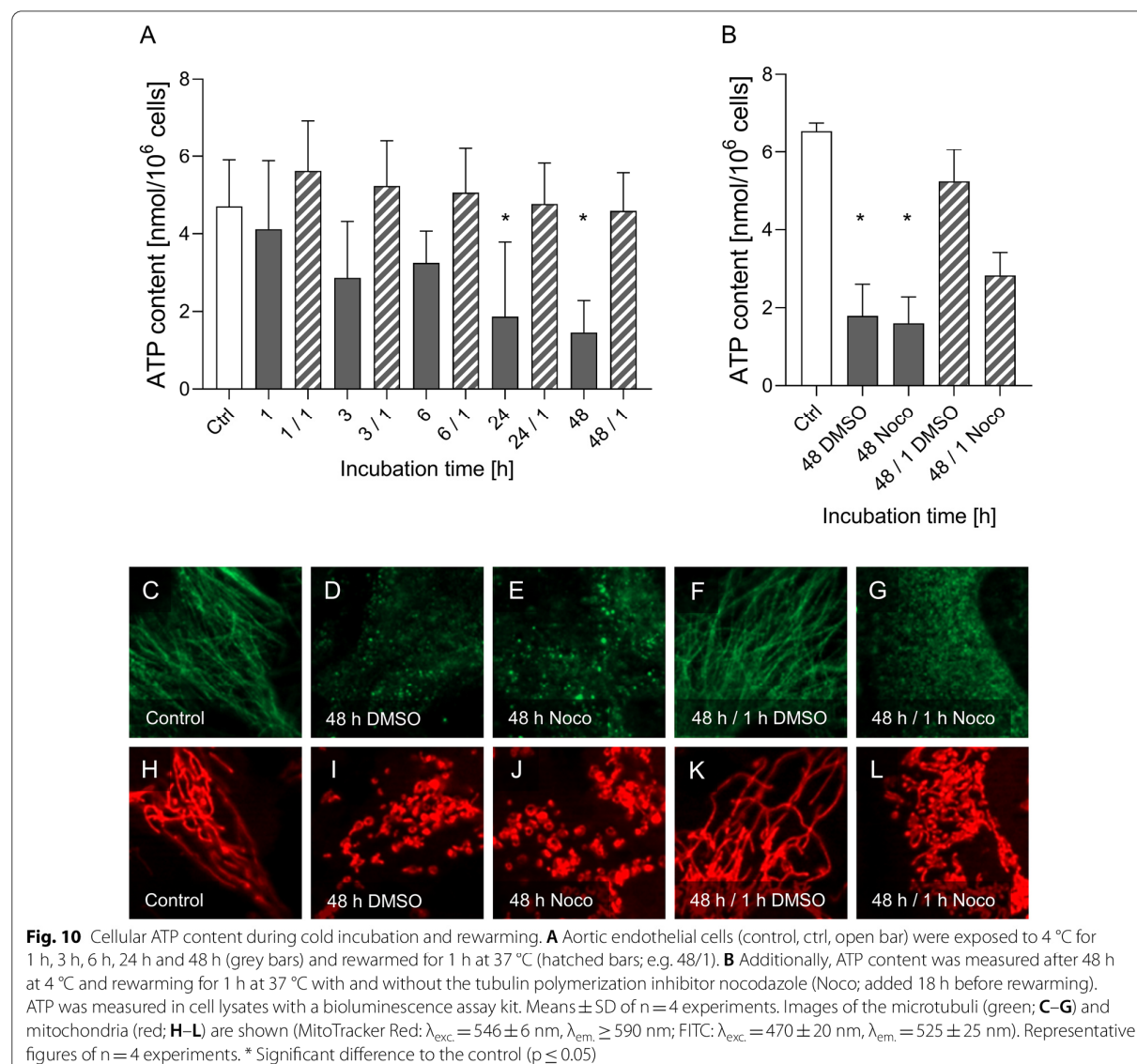


Fig. 9 (See legend on previous page.)



whether additional functional changes contribute is not known yet.

We here showed that cold-induced mitochondrial fission occurs early, over a wide temperature range, by an unusual, at least partially Drp1-independent mechanism and has functional consequences. With regard to the scarce data on cold-induced mitochondrial fission we decided to concentrate on the pure model of hypothermic exposure uncomplicated by further injurious factors to characterize cold-induced mitochondrial fission. To delineate the interplay with hypoxia and the impact of preservation solutions in diverse transplantation-relevant cell types/tissues will be the logical

next step. As mitochondrial energy generation is a prerequisite for both organ regeneration and organ function, understanding the disturbances of mitochondrial dynamics in the long run likely offers opportunities for improvements in organ preservation and particularly in the newly arising field of organ reconditioning.

Abbreviations

DMSO: Dimethyl sulfoxide; Drp1: Dynamin-related protein 1; Fis1: Mitochondrial fission 1 protein; FITC: Fluorescein isothiocyanate; HBSS: Hanks' Balanced Salt Solution; IgG: Immunoglobulin G; KH: Krebs–Henseleit; LDH: Lactate dehydrogenase; M199: Medium 199; Mdivi-1: Mitochondrial division inhibitor 1; Mff: Mitochondrial fission factor; Mfn: Mitofusin; MiD: Mitochondrial dynamics protein; Opa1: Optic atrophy 1; Oma1: Overlapping proteolytic activity

with m-AAA protease 1; ROS: Reactive oxygen species; RT: Room temperature; TMRM: Tetramethylrhodamine methyl ester; UW: University of Wisconsin.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s10020-021-00430-z>.

Additional file 1: Video file of live cell imaging of stained mitochondria of porcine aortic endothelial cells. The cells were stained with MitoTracker Red and incubated at 8 °C for 5:40 h (18 images to minimize phototoxicity).

Additional file 2: Video file of live cell imaging of stained mitochondria of porcine aortic endothelial cells slowly rewarmed after 48 h at 4 °C to 37 °C. The cells were stained with MitoTracker Red (18 images to minimize phototoxicity).

Acknowledgements

We would like to thank Mrs. L. Caponi, Mrs. K. Urban, Mrs. J. Westhues, Mr. N. Sapkota, Mr. S. Ehleben, Mr. S. Jafoui, Mrs. J. Weiß, and Mr. L. Grebe for their technical assistance. We would like to thank the staff at the IMCES imaging facility for their help and assistance with electron microscopy.

Authors' contributions

UR conceptualized the study. LQ, BW, DS and AR conducted the experiments. LQ analysed the data. NL and AD performed preliminary experiments and contributed, together with LQ, BW and UR, to interpretation of the data. UR and LQ wrote the paper, all other authors critically revised it. All authors read and agreed to the final version of the manuscript.

Funding

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. NL received a grant from the ELAN MD program funded by the Else Kröner-Fresenius-Stiftung.

Availability of data and materials

The datasets generated and analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Klinische Forschergruppe 117, Universitätsklinikum Essen, Essen, Germany.

²Institut für Physiologische Chemie, Universitätsklinikum Essen, Hufelandstr. 55, 45147 Essen, Germany. ³Present Address: Institute of Diagnostic and Interventional Radiology, University Hospital Zurich, Zurich, Switzerland.

⁴Present Address: Department Hamm 2, Hochschule Hamm-Lippstadt, Hamm, Germany.

Received: 2 September 2021 Accepted: 27 December 2021

Published online: 31 January 2022

References

Ahmad T, Aggarwal K, Pattnaik B, Mukherjee S, Sethi T, Tiwari BK, et al. Computational classification of mitochondrial shapes reflects stress and redox state. *Cell Death Dis.* 2013;4:e461.

- Alessenko AV, Boikov P, Filippova GN, Khrenov AV, Loginov AS, Makarieva ED. Mechanisms of cycloheximide-induced apoptosis in liver cells. *FEBS Lett.* 1997;416(1):113–6.
- Arimura SI, Kurisu R, Sugaya H, Kadota N, Tsutsumi N. Cold treatment induces transient mitochondrial fragmentation in *Arabidopsis thaliana* in a way that requires DRP3A but not ELM1 or an ELM1-like homologue, ELM2. *Int J Mol Sci.* 2017;18(10):2161.
- Baker MJ, Lampe PA, Stojanovski D, Korwitz A, Anand R, Tatsuta T, et al. Stress-induced OMA1 activation and autocatalytic turnover regulate OPA1-dependent mitochondrial dynamics. *EMBO J.* 2014;33(6):578–93.
- Barsoum MJ, Yuan H, Gerencser AA, Liot G, Kushnareva Y, Graber S, et al. Nitric oxide-induced mitochondrial fission is regulated by dynamin-related GTPases in neurons. *EMBO J.* 2006;25(16):3900–11.
- Bath MF, Hosgood SA, Nicholson ML. Vasoreactivity to acetylcholine during porcine kidney perfusion for the assessment of ischemic injury. *J Surg Res.* 2019;238:96–101.
- Bellini MI, Yiu J, Nozdrin M, Papalio V. The effect of preservation temperature on liver, kidney, and pancreas tissue ATP in animal and preclinical human models. *J Clin Med.* 2019;8(9):1421.
- Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation.* 1988;45(4):673–6.
- Bienholz A, Walter B, Pless-Petig G, Guberina H, Kribben A, Witzke O, et al. Characterization of injury in isolated rat proximal tubules during cold incubation and rewarming. *PLoS One.* 2017;12(7):e0180553.
- Cassidy-Stone A, Chipuk JE, Ingeman E, Song C, Yoo C, Kuwana T, et al. Chemical inhibition of the mitochondrial division dynamin reveals its role in Bax/Bak-dependent mitochondrial outer membrane permeabilization. *Dev Cell.* 2008;14(2):193–204.
- Chan DC. Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annu Rev Genet.* 2012;46:265–87.
- Cipolat S, de Brito OM, Dal Zilio B, Scorrano L. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101(45):15927–32.
- de Vries RJ, Tessier SN, Banik PD, Nagpal S, Cronin SEJ, Ozer S, et al. Supercooling extends preservation time of human livers. *Nat Biotechnol.* 2019;37(10):1131–6.
- Fuller BJ, Petrenko AY, Rodriguez JV, Somov AY, Balaban CL, Guibert EE. Bio-preservation of hepatocytes: current concepts on hypothermic preservation, cryopreservation, and vitrification. *Cryo Lett.* 2013;34(4):432–52.
- Gilbo N, Monbaliu D. Temperature and oxygenation during organ preservation: friends or foes? *Curr Opin Organ Transplant.* 2017;22(3):290–9.
- Hendriks KDW, Lupi E, Hardenberg MC, Hoogstra-Berends F, Deelman LE, Henning RH. Differences in mitochondrial function and morphology during cooling and rewarming between hibernator and non-hibernator derived kidney epithelial cells. *Sci Rep.* 2017;7(1):15482.
- Hoppins S, Lackner L, Nunnari J. The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu Rev Biochem.* 2007;76:751–80.
- Ishihara N, Eura Y, Mihara K. Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 26):6535–46.
- Jing L, Yao L, Zhao M, Peng LP, Liu M. Organ preservation: from the past to the future. *Acta Pharmacol Sin.* 2018;39(5):845–57.
- Jones E, Gaytan N, Garcia I, Herrera A, Ramos M, Agarwala D, et al. A threshold of transmembrane potential is required for mitochondrial dynamic balance mediated by DRP1 and OMA1. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74(7):1347–63.
- Kaths JM, Paul A, Robinson LA, Selzner M. Ex vivo machine perfusion for renal graft preservation. *Transplant Rev.* 2018;32(1):1–9.
- Kerkweg U, Li T, de Groot H, Rauen U. Cold-induced apoptosis of rat liver cells in University of Wisconsin solution: the central role of chelatable iron. *Hepatology.* 2002;35(3):560–7.
- Kerkweg U, Jacob M, de Groot H, Mannherz HG, Rauen U. Cold-induced apoptosis of rat liver endothelial cells: contribution of mitochondrial alterations. *Transplantation.* 2003;76(3):501–8.
- Kraus F, Roy K, Pucadyil TJ, Ryan MT. Function and regulation of the divisome for mitochondrial fission. *Nature.* 2021;590(7844):57–66.
- Lee H, Smith SB, Yoon Y. The short variant of the mitochondrial dynamin OPA1 maintains mitochondrial energetics and cristae structure. *J Biol Chem.* 2017;292(17):7115–30.
- Liu X, Hajnoczky G. Altered fusion dynamics underlie unique morphological changes in mitochondria during hypoxia-reoxygenation stress. *Cell Death Differ.* 2011;18(10):1561–72.

- McKeown CM, Edwards V, Phillips MJ, Harvey PR, Petrunka CN, Strasberg SM. Sinusoidal lining cell damage: the critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat. *Transplantation*. 1988;46(2):178–91.
- Moers C, Smits JM, Maathuis MH, Treckmann J, van Gelder F, Napieralski BP, et al. Machine perfusion or cold storage in deceased-donor kidney transplantation. *N Engl J Med*. 2009;360(1):7–19.
- Nordling S, Brannstrom J, Carlsson F, Lu B, Salvaris E, Wanders A, et al. Enhanced protection of the renal vascular endothelium improves early outcome in kidney transplantation: preclinical investigations in pig and mouse. *Sci Rep*. 2018;8(1):5220.
- Otsuga D, Keegan BR, Brisch E, Thatcher JW, Hermann GJ, Bleazard W, et al. The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast. *J Cell Biol*. 1998;143(2):333–49.
- Pagliarini DJ, Calvo SE, Chang B, Sheth SA, Vafai SB, Ong SE, et al. A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell*. 2008;134(1):112–23.
- Parajuli N, Shrum S, Tobacyk J, Harb A, Arthur JM, MacMillan-Crow LA. Renal cold storage followed by transplantation impairs expression of key mitochondrial fission and fusion proteins. *PLoS One*. 2017;12(10):e0185542.
- Pernas I, Scorrano L. Mito-morphosis: mitochondrial fusion, fission, and cristae remodeling as key mediators of cellular function. *Annu Rev Physiol*. 2016;78:505–31.
- Peters S, Reis A, Noll T. Preparation of endothelial cells from micro- and macrovascular origin. In: Dhein FMS, editor. *Practical methods in cardiovascular research*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2005. p. 610–29.
- Pless G, Sauer IM, Rauen U. Improvement of the cold storage of isolated human hepatocytes. *Cell Transplant*. 2012;21(1):23–37.
- Polishchuk EV, Polishchuk RS. Analysis of Golgi complex function using correlative light-electron microscopy. *Methods Cell Biol*. 2013;118:243–58.
- Rauen U, de Groot H. Mammalian cell injury induced by hypothermia—the emerging role for reactive oxygen species. *Biol Chem*. 2002;383(3–4):477–88.
- Rauen U, de Groot H. New insights into the cellular and molecular mechanisms of cold storage injury. *J Investig Med*. 2004;52(5):299–309.
- Rauen U, Erhard J, Kuhnhenrich P, Lange R, Moissidis M, Eigler FW, et al. Nonparenchymal cell and hepatocellular injury to human liver grafts assessed by enzyme-release into the perfusate. *Langenbecks Arch Chir*. 1994a;379(4):241–7.
- Rauen U, Noll T, Piper HM, Lauchart W, Becker HD, de Groot H. Endothelial cell toxicity of preservation solutions: comparison of endothelial cells of different origin and dependence on growth state. *Cryobiology*. 1994b;31(2):144–53.
- Rauen U, Polzar B, Stephan H, Mannherz HG, de Groot H. Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *FASEB J*. 1999;13(1):155–68.
- Rauen U, Petrat F, Li T, de Groot H. Hypothermia injury/cold-induced apoptosis—evidence of an increase in chelatable iron causing oxidative injury in spite of low O₂/H₂O₂ formation. *FASEB J*. 2000;14(13):1953–64.
- Rauen U, Kerkweg U, Weisheit D, Petrat F, Sustmann R, de Groot H. Cold-induced apoptosis of hepatocytes: mitochondrial permeability transition triggered by nonmitochondrial chelatable iron. *Free Radic Biol Med*. 2003;35(12):1664–78.
- Rauen U, Kerkweg U, Wusteman MC, de Groot H. Cold-induced injury to porcine corneal endothelial cells and its mediation by chelatable iron—implications for corneal preservation. *Cornea*. 2006;25(1):68–77.
- Schliwa M, van Blerkom J. Structural interaction of cytoskeletal components. *J Cell Biol*. 1981;90(1):222–35.
- Smirnova E, Griparic L, Shurland DL, van der Blik AM. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell*. 2001;12(8):2245–56.
- Smith G, Gallo G. To mdv1-1 or not to mdv1-1: is that the question? *Dev Neurobiol*. 2017;77(11):1260–8.
- Song Z, Ghochani M, McCaffery JM, Frey TG, Chan DC. Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion. *Mol Biol Cell*. 2009;20(15):3525–32.
- Taguchi N, Ishihara N, Jofuku A, Oka T, Mihara K. Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J Biol Chem*. 2007;282(15):11521–9.
- Toyama EQ, Herzog S, Courchet J, Lewis TL Jr, Loson OC, Hellberg K, et al. Metabolism. AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress. *Science*. 2016;351(6270):275–81.
- Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, et al. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J*. 2008;27(2):433–46.
- van der Blik AM, Shen Q, Kawajiri S. Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(6):a011072.
- Wikstrom JD, Mahdavian K, Liesa M, Sereda SB, Si Y, Las G, et al. Hormone-induced mitochondrial fission is utilized by brown adipocytes as an amplification pathway for energy expenditure. *EMBO J*. 2014;33(5):418–36.
- Yu R, Lendahl U, Nister M, Zhao J. Regulation of mammalian mitochondrial dynamics: opportunities and challenges. *Front Endocrinol*. 2020;11:374.
- Zhang W, Chen Y, Yang Q, Che H, Chen X, Yao T, et al. Mitofusin-2 protects against cold stress-induced cell injury in HEK293 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;397(2):270–6.
- Zhang K, Li H, Song Z. Membrane depolarization activates the mitochondrial protease OMA1 by stimulating self-cleavage. *EMBO Rep*. 2014;15(5):576–85.
- Zhou H, Hu S, Jin Q, Shi C, Zhang Y, Zhu P, et al. Mif-dependent mitochondrial fission contributes to the pathogenesis of cardiac microvasculature ischemia/reperfusion injury via induction of mROS-mediated cardiolipin oxidation and HK2/VDAC1 disassociation-involved mPTP opening. *J Am Heart Assoc*. 2017. <https://doi.org/10.1161/JAHA.116.005328>.
- Zhou H, Wang J, Zhu P, Zhu H, Toan S, Hu S, et al. NR4A1 aggravates the cardiac microvascular ischemia reperfusion injury through suppressing FUNDC1-mediated mitophagy and promoting Mif-required mitochondrial fission by CK2alpha. *Basic Res Cardiol*. 2018;113(4):23.
- Zhu J, Zhang G, Song Z, Xiang X, Shu S, Liu Z, et al. Protein kinase C-delta mediates kidney tubular injury in cold storage-associated kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2020;31(5):1050–65.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



3.2 Quiring et al., Front Transplant, 2022

Im Folgenden ist die Publikation 2 aus dem peer-reviewed fachspezifischen Journal *Frontiers in Transplantation*, Verlag Frontiers Media, Lausanne, angehängt.

Sie ist unter der “Creative Commons Attribution 4.0 International Licence CC BY 4.0” lizenziert, wurde am 03. November 2022 veröffentlicht und ist unter der folgenden Zitation oder dem digitalen Objektbezeichner (*digital object identifier*, DOI) zu finden:

Quiring, L., Caponi, L., Schwan, D., Rech, A., and Rauen, U. (2022). Recovery from cold-induced mitochondrial fission in endothelial cells requires reconditioning temperatures of ≥ 25 °C. *Front Transplant* 1, 1044551. <https://doi.org/10.3389/frtra.2022.1044551>



OPEN ACCESS

EDITED BY

Hirofumi Hirao,
UCLA Department of Surgery-Liver
Transplant, United States

REVIEWED BY

Shannon Noella Tessier,
Massachusetts General Hospital &
Harvard Medical School, United States
Theresa Hautz,
Innsbruck Medical University, Austria

*CORRESPONDENCE

Ursula Rauen
ursula.rauen@uni-duisburg-essen.de

SPECIALTY SECTION

This article was submitted to
Organ and Tissue Preservation,
a section of the journal
Frontiers in Transplantation

RECEIVED 14 September 2022

ACCEPTED 19 October 2022

PUBLISHED 03 November 2022

CITATION

Quiring L, Caponi L, Schwan D, Rech A
and Rauen U (2022) Recovery from
cold-induced mitochondrial fission in
endothelial cells requires
reconditioning temperatures of \geq
25°C. *Front. Transplant.* 1:1044551.
doi: 10.3389/frtra.2022.1044551

COPYRIGHT

© 2022 Quiring, Caponi, Schwan,
Rech and Rauen. This is an
open-access article distributed under
the terms of the [Creative Commons
Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use,
distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the
original author(s) and the copyright
owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use, distribution
or reproduction is permitted which
does not comply with these terms.

Recovery from cold-induced mitochondrial fission in endothelial cells requires reconditioning temperatures of $\geq 25^{\circ}\text{C}$

Leonard Quiring¹, Luisa Caponi², Dhanusha Schwan¹,
Anja Rech¹ and Ursula Rauen^{1,2*}

¹Klinische Forschergruppe 117, Universitätsklinikum Essen, Essen, Germany, ²Institut für Physiologische Chemie, Universitätsklinikum Essen, Essen, Germany

Mitochondrial integrity and function constitute a prerequisite for cellular function and repair processes. We have previously shown that mitochondria of different cell types exhibit pronounced fragmentation under hypothermic conditions. This fission, accompanied by a decline of cellular ATP content, showed reversibility at 37°C. However, it is unclear whether other temperatures as currently discussed for reconditioning of organs allow this reconstitution of mitochondria. Therefore, we here study in a model of cultured porcine aortic endothelial cells how different rewarming temperatures affect mitochondrial re-fusion and function. After 48 h cold incubation of endothelial cells in Krebs-Henseleit buffer with glucose (5 mM) and deferoxamine (1 mM) at 4°C pronounced mitochondrial fission was observed. Following 2 h rewarming in cell culture medium, marked fission was still present after rewarming at 10° or 15°C. At 21°C some re-fusion was visible, which became more marked at 25°C. Networks of tubular mitochondria similar to control cells only re-appeared at 37°C. ATP content decreased at 4°C from 3.6 ± 0.4 to 1.6 ± 0.4 nmol/10⁶ cells and decreased even further when rewarming cells to 10° and 15°C. Values after rewarming at 21°C were similar to the values before rewarming while ATP gradually increased at higher rewarming temperatures. Metabolic activity dropped to $5 \pm 11\%$ of control values during 4°C incubation and recovered with increasing temperatures to $36 \pm 10\%$ at 25°C and $78 \pm 17\%$ at 37°C. Integrity of monolayers, largely disturbed at 4°C (large gaps between endothelial cells; cell injury $\leq 1\%$), showed partial recovery from 15°C upwards, complete recovery at 37°C. Endothelial repair processes (scratch assay) at 25°C were clearly inferior to those at 37°C. These data suggest that reconditioning temperatures below 21°C are not optimal with regard to reconstitution of mitochondrial integrity and function. For this goal, temperatures of at least 25°C appear required, with 30°C being superior and 37°C yielding the best results.

KEYWORDS

mitochondrial dynamics, mitochondrial fragmentation, mitochondrial fusion, mitochondria, endothelium, transplantation, machine perfusion

Introduction

Machine perfusion has recently regained interest as a promising preservation technique for extended criteria donor organs to overcome organ shortage (1, 2). Hypothermic machine perfusion of kidneys and livers for example improved clinical outcomes in comparison with static cold storage (3, 4). Normothermic machine perfusion even allowed pre-transplantation viability assessment and repair (2, 5, 6). But with the requirement of safe, non-interrupted perfusion during organ transport, both methods are high in costs and complexity. Controlled oxygenated rewarming utilizes the advantages of conventional cold storage for transportation but enables organ reconditioning in the transplant center, where the organ is gradually rewarmed to avoid injury by rapid rewarming (7). The reconditioning approach offers the option for *ex vivo* treatment of the organ, tissue regeneration, viability assessment and immunomodulation of the graft prior to implantation into the recipient (8, 9). Even brief reconditioning periods of controlled oxygenated rewarming allowed for better energetic recovery and thus better graft function in kidneys and livers (7, 10). However, data on the optimal temperature at which organs should be reconditioned is limited (2, 8, 11, 12). Thus, cold (low potential for functional assessment and repair processes), subnormothermic (unclear potential for functional assessment and repair) and physiological temperatures (best potential for functional assessment and repair, but high oxygen requirement and disadvantage of full rewarming prior to the implantation procedure) are used (8). The scientific basis for optimizing temperature in reconditioning protocols, i.e., knowledge of the effects of different rewarming temperatures on the diverse cellular processes, is scarce.

During rewarming, injurious processes initiated during cold incubation are accelerated and result in rewarming injury (13–16). Furthermore, upon rewarming the abruptly increasing metabolism and energy demand in cells with decreased energy levels present after cold storage poses a difficult challenge for the cells (16–18). With their crucial role in energy provision, mitochondria are thus likely to be key to reconditioning and repair processes. However, mitochondria exhibit enhanced fragmentation at 4°C, a process known as cold-induced mitochondrial fission (19, 20). This phenomenon could be seen in many different cell types (20–25). Evidence of mitochondrial fission was observed after cold ischemia/reperfusion of kidneys and livers (26–28), suggesting its occurrence also in whole organs. Cold-induced mitochondrial fission was recently characterized in porcine aortic endothelial cells (19) where it occurred as early as after 3 h at 4°C and was associated with a decrease in ATP content. In healthy cells mitochondrial fission was reversible when cells were rewarmed to 37°C. However, ATP recovery after cold incubation was compromised if re-fusion was prevented. Thus, re-fusion of mitochondria and the re-establishment of

a normal mitochondrial network appear to be a prerequisite for adequate energy supply. Incomplete mitochondrial re-fusion after hypothermic storage is thus likely to compromise organ function and repair processes during reconditioning of organs. However, it is currently totally unclear, which temperature is required for the reconstitution of mitochondrial morphology and function after a cold storage period.

Therefore, we here assess in a cell culture model at which rewarming temperature mitochondrial re-fusion, ATP production and cellular regenerative capacity return after cold incubation.

Materials and methods

Isolation and culture of porcine aortic endothelial cells

For this study, we used porcine aortic endothelial cells because mitochondrial fission has already been characterized in these cells (19) and endothelial cells have been shown to be most sensitive to hypothermia (13, 29, 30). Moreover, as primary cells, they are less dedifferentiated and relatively close to the characteristics of endothelial cells *in vivo*, and they are primary endothelial cells that are available in sufficient quantities.

Porcine aortae were obtained from a local slaughterhouse and endothelial cells were isolated mechanically as described previously (31). Cells were cultured in M199 cell culture medium (Bio&Sell, Germany) supplemented with fetal calf serum (20% v/v), L-glutamine (2 mM) and antibiotics (100 U/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin). They were used for experiments in a confluent state 2 days after splitting 1:3 as described previously (19).

Cold incubation/rewarming

Cold incubation was performed as described previously (19) in modified Krebs–Henseleit (KH) buffer (143.6 mM Na⁺; 128.3 mM Cl⁻; 25.0 mM HCO₃⁻; 5.9 mM K⁺; 1.2 mM Mg²⁺; 1.2 mM SO₄²⁻; 1.2 mM H₂PO₄⁻; 2.5 mM Ca²⁺; 20.0 mM HEPES) supplemented with glucose (5 mM) and deferoxamine (1 mM, Novartis, Basel, Switzerland), the latter added to prevent iron-dependent cellular and mitochondrial injury (13, 20). After cold incubation, cells were washed once with cold HBSS, cold cell culture medium was added and cells were slowly rewarmed to the different temperatures for 1–2 h (“rewarming period”). For some assays, this “rewarming period” was followed by a “re-culture period” of 48 h at normal cell culture conditions (37°C) to simulate the return of a graft to 37°C in the recipient. Cells were kept under a 5% CO₂, 21% O₂ and 74% N₂ atmosphere (for the maintenance of the bicarbonate buffer system) at all temperatures.

Cell morphology

For phase contrast microscopy including time lapse videos, the cells were grown on 6-well plates. Microscopy was performed using an Axio Observer.Z1 (with LD A-Plan 20x/0.30 Ph1, Zeiss, Germany) equipped with an incubator and a cooling/heating incubation insert P-Set 2000 (Pecon, Germany).

For the scratch assay, the cell monolayer was scratched with a sterile tip directly after cold incubation and cellular reaction during re-culture was documented using a time lapse video for 20 h. Control scratches were performed in cultures that had not been exposed to cold incubation. For technical reasons, time lapse videos with different rewarming temperatures (i.e., 25° and 37°C) could not be performed in parallel, therefore a separate 37°C control was set up for each rewarming temperature. For evaluation, each scratch was compared before and after the rewarming and re-culture period and scratch area was measured at selected time points (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 16, 20 h) using the ImageJ software. The slope of the linear portion of scratch reduction was determined. Slopes were normalized to the corresponding control.

Mitochondrial morphology

Mitochondrial morphology was assessed as previously described (19). Cells were stained with MitoTracker Red CMXRos (150 nM; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in KH buffer with glucose (5 mM) for 20 min at 37°C. After washing, cells were incubated in glucose-containing KH buffer without dye for 2 h and then exposed to hypothermia as described above.

After hypothermia or after rewarming, the cells were fixated with paraformaldehyde (3.7% w/v) in cell culture medium for 10 min at the respective incubation temperature followed by 15 min at 37°C, then mounted and analyzed by fluorescence microscopy (Axio Observer.Z1 with Apotome1, Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC, Zeiss, Germany; $\lambda_{exc.} = 546 \pm 6 \text{ nm}$, $\lambda_{em.} \geq 590 \text{ nm}$).

ATP measurement

Cells were grown on 6-well plates and ATP content was determined after the different incubation conditions using the ATP Bioluminescence Assay Kit CLSII (Roche, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Metabolic activity

As parameter of metabolic activity the reduction of resazurin to resorufin was used. At the end of the experimental incubation, cells were washed and incubated in HBSS with

10 mM glucose for 15 min at the experimental incubation temperature. Thereafter 40 μM resazurin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added and resorufin formation was measured in a plate reader during the subsequent 20 min incubation at the respective incubation temperature ($\lambda_{exc.} = 545 \pm 20 \text{ nm}$, $\lambda_{em.} = 600 \pm 40 \text{ nm}$). Controls for all temperatures—without prior cold incubation—were included. Measurements were normalized to the corresponding warm control (measurement at 37°C without prior cold incubation).

Cell viability and proliferation

LDH activity was measured both in the supernatant and after cell lysis with 1% (v/v) Triton X-100 using a standard enzymatic assay based on pyruvate-dependent NADH oxidation (32). For assessment of cell injury extracellular, i.e., released, LDH activity was calculated as a percentage of total (i.e., released plus intracellular) LDH activity. In experiments involving re-culture periods, total LDH activity was additionally used as a marker of cell proliferation.

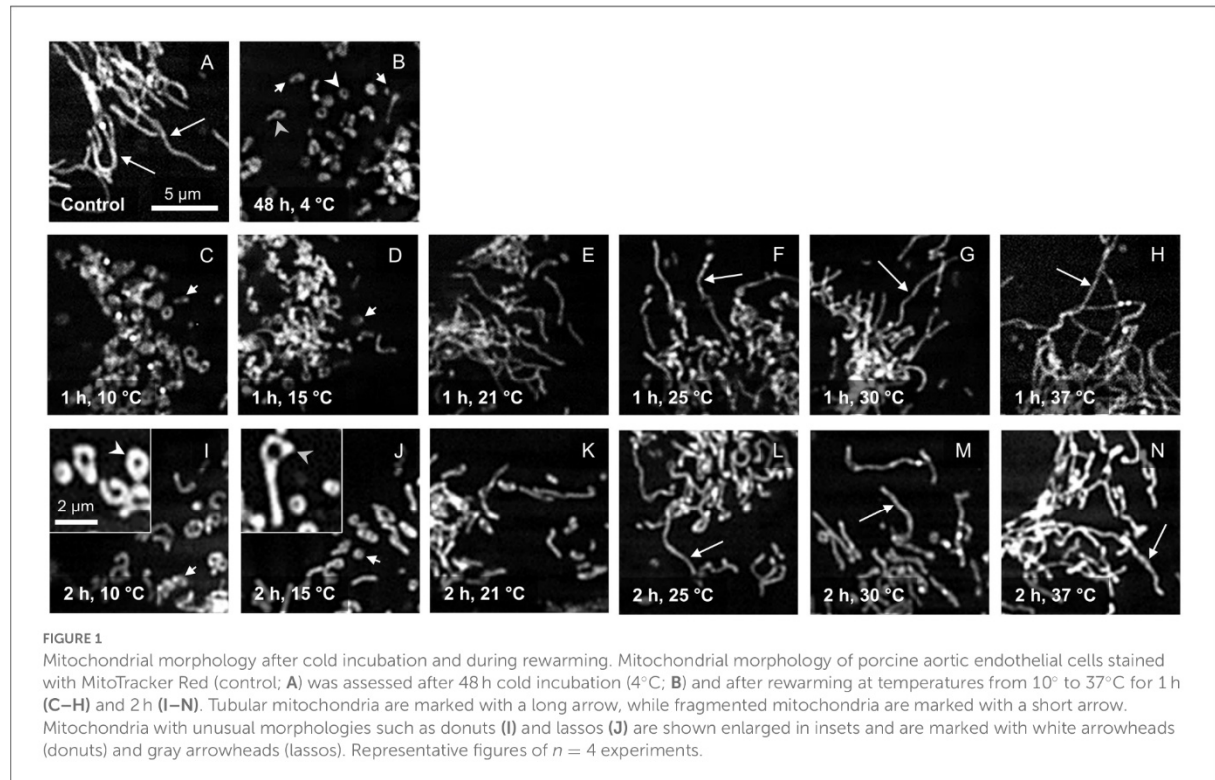
For the assessment of cell viability and cell number, cells were stained with Hoechst 33342 (1 $\mu\text{g/ml}$; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 20 min and propidium iodide (5 $\mu\text{g/ml}$; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) for 5 min at the end of the experimental incubation. Thereafter, cells were photographed by fluorescence microscopy and counted (Hoechst 33342: $\lambda_{exc.} = 359 \pm 24 \text{ nm}$, $\lambda_{em.} = 445 \pm 25 \text{ nm}$; propidium iodide: $\lambda_{exc.} = 546 \pm 6 \text{ nm}$, $\lambda_{em.} \geq 590 \text{ nm}$; 5 randomly chosen fields of view per well).

For protein content, cells were lysed with RIPA buffer (17) supplemented with Protease-Phosphatase-Inhibitor (Cell Signaling, #5870S) at 4°C for 30 min. Then the protein lysate was denatured in an ultrasonic bath and centrifuged at 17,000 $\times g$ for 15 min. Protein amount was measured by bicinchoninic acid (BCA) assay (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) at 562 nm.

Released glyocalyx components were assessed in the cell culture supernatants using the ELISA Kits for hyaluronic acid (MBS163202, MyBioSource, California, USA) and heparan sulfate (CSB-E09585h, Cusabio, Texas, USA) according to the manufacturers' instructions.

Statistics

All experiments were performed in duplicate and repeated four times. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). For analysis



of the scratch assay, the Mann-Whitney test was used. For all other analyses the Friedman test was used.

Results

Mitochondrial morphology after cold incubation and during re-warming

In porcine aortic endothelial cells cultured at 37°C, a network of long tubular mitochondria could be seen (Figure 1A). As described previously (19), extensive mitochondrial fragmentation was observed after incubation at 4°C for 48 h (Figure 1B). This cold-induced mitochondrial fission was completely reversible during re-warming at 37°C for ≥ 1 h (Figures 1H,N). Looking at the temperature dependence of this re-fusion, hardly any fusion of mitochondria was observed after “re-warming” at 10° and 15°C for 1 h (Figures 1C,D). Even after 2 h of “re-warming,” only a slight re-fusion was present at 15°C (Figure 1J). “Re-warming” at 10° and 15°C rather led to unusual morphologies such as donuts and lassos (Figures 1I,J) as previously described for 4°C (19). Longer mitochondria could be observed during re-warming at higher temperatures, starting at 21°C (Figures 1E,K), more pronounced at 25° and 30°C (Figures 1F,G). Especially when rewarmed for 2 h, the already

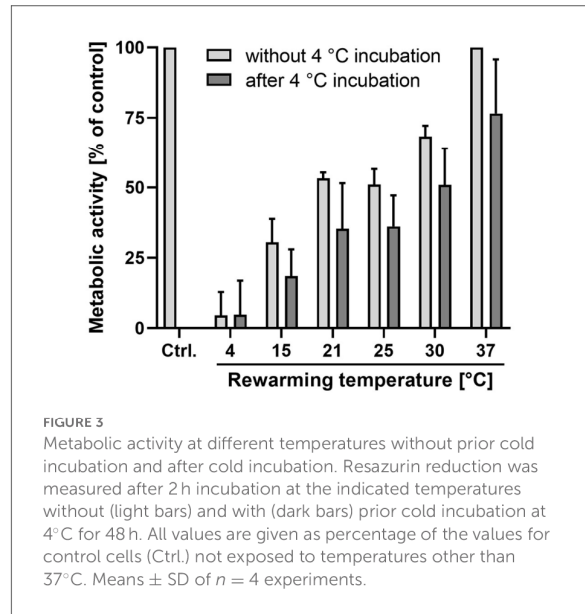
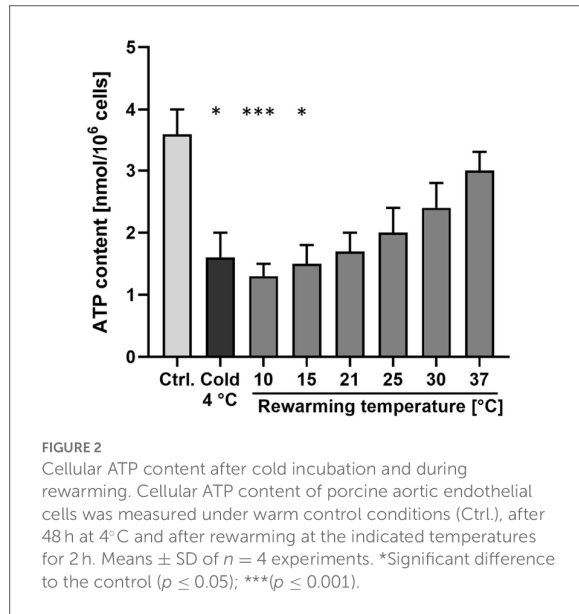
clear re-fusion was even more marked at 25° and 30°C (Figures 1L,M).

ATP content after cold incubation and during re-warming

Cellular ATP content, i.e., the result of the central function of mitochondria, decreased significantly from 3.6 ± 0.4 to 1.6 ± 0.4 nmol/ 10^6 cells after 48 h at 4°C (Figure 2), matching the previous report (19), and largely returned to control levels after re-warming to 37°C for 2 h. However, after “re-warming” at 10° and 15°C, ATP content decreased even further compared to 4°C (Figure 2). After 2 h re-warming at 21°C, a similar ATP content as at 4°C was measured. An increase in cellular ATP content could only be observed during re-warming at $\geq 25^\circ\text{C}$. ATP content increased with increasing re-warming temperature.

Metabolic activity after cold incubation

As metabolic activity itself is temperature-dependent, we measured cellular metabolic activity (resazurin reduction) at the different re-warming temperatures both in cells without prior cold incubation and during re-warming



of cells that had been exposed to 48 h cold incubation at 4°C.

Cells incubated at 4°C showed expectedly a large reduction in metabolic activity (Figure 3), which was reduced to 5 ± 7% of that of the control cells at 37°C. The other incubation temperatures also resulted in reductions in metabolic activity, amounting to 53 ± 2% at 21° and to 68 ± 3% of control values at 30°C (Figure 3). After 48 h of cold incubation at 4°C, the cells rewarmed to the different temperatures showed a similar temperature profile as the cells not exposed to 48 h cold incubation. However, the mean values of metabolic activity of rewarmed cells always remained below the respective value of cells not exposed to prior incubation at 4°C. Thus, in cells rewarmed at 21°C, 35 ± 15% of the control value was reached, in cells rewarmed at 30°C it amounted to 51 ± 12%. Cells rewarmed at 37°C reached 78 ± 17% of the control value.

Cell morphology during rewarming

Cell morphology and monolayer integrity were judged using phase contrast microscopy. Control cells showed a confluent monolayer (Figure 4A). Endothelial cells incubated for 48 h at 4°C exhibited marked intercellular gaps (Figure 4B). These gaps were still present after 2 h “rewarming” at 10°C (Figure 4C). During “rewarming” at 15°C the gaps started to close (Figure 4D). They were substantially closed after rewarming at 21°, 25°, and 30°C (Figures 4E–G), completely closed after rewarming to 37°C (Figure 4H).

Closure of endothelial wounds during reconditioning at intermediate and physiological temperature

To assess how healing of injuries in the endothelial monolayer was affected by intermediate vs. physiological reconditioning temperatures, a scratch assay was performed. The scratch was introduced directly after cold incubation (Figures 5A,D). Then, for comparison of reconditioning protocols, cold incubated cells were directly rewarmed to 37°C (Figures 5B,C) or rewarmed to an intermediate temperature of 25°C for 2 h (Figure 5E) followed by re-culture at 37°C (Figure 5F). Controls were scratched without being exposed to cold incubation. Cells rewarmed at 37°C showed marked ruffles at the proliferating edges after 2 h (Figure 5B, Supplementary Data 1). At 37°C the decrease in scratch area was linear between hours 1–3 of rewarming (Figure 5G) and scratches were completely closed after 6–7 h of rewarming at 37°C. Overall, scratch closure during rewarming at 37°C was slightly more rapid than in controls not exposed to hyperthermia (Figure 5G) as indicated by a normalized slope > 1 (Figure 5H).

Cells rewarmed at 25°C showed hardly any ruffles while being at this temperature (Figure 5E, Supplementary Data 2) and hardly any decrease in scratch size during 25°C incubation (Figure 5G). During the first 2 h of subsequent 37°C re-culture, some large ruffles (less than after 37°C rewarming) appeared (Supplementary Data 2) and the cells progressively moved into the scratch area and thus the rate at which the scratch area closed increased (Figure 5G) to a rate similar to control cells (normalized slope of 1.05 ± 0.48; Figure 5H), finally yielding a

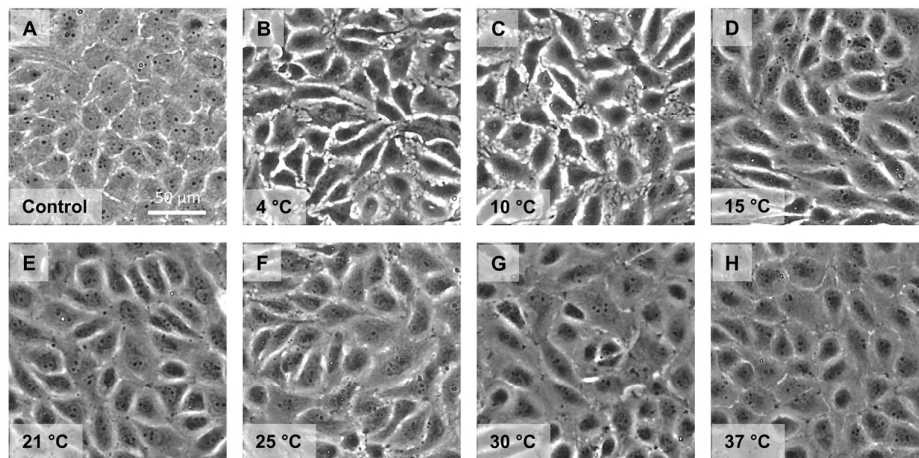


FIGURE 4

Monolayer morphology after cold incubation and during rewarming. Cell morphology of porcine aortic endothelial cells (Control, A) after cold incubation for 48 h at 4°C (B) and after subsequent rewarming at the indicated temperatures for 2 h (C–H) was assessed by phase contrast microscopy. Representative figures of $n = 4$ experiments.

relatively homogeneous scratch closure (Figure 5F). Thus, cells rewarmed at 25°C followed by 37°C re-culture showed delayed scratch closure that did not occur until re-culture.

Cell proliferation at different reconditioning temperatures

During 48 h re-culture subsequent to 48 h cold incubation and 2 h rewarming at the different rewarming temperatures, all cells proliferated as assessed by cell number, protein content and total LDH activity of the cultures (Figures 6A–C). Proliferation of cold-incubated, rewarmed cells was at least equal to that of control cells not exposed to hypothermia but cultured for 48 h (warm control): Cell numbers of re-cultured cells were marginally higher than cell numbers of warm controls (Figure 6A) and protein content of re-cultured cells was slightly higher than that of warm controls (Figure 6B). For total LDH values, values of re-cultured cells were about 45% higher than those of warm control cells (Figure 6C). For all three parameters, the temperature during the 2 h rewarming period only had minor effects on cell proliferation.

Cell injury and release of glyocalyx components

Cell injury was low throughout all conditions (<1.2% LDH release after cold incubation, <3% after rewarming); even after 48 h re-culture injury remained below 7% without significant

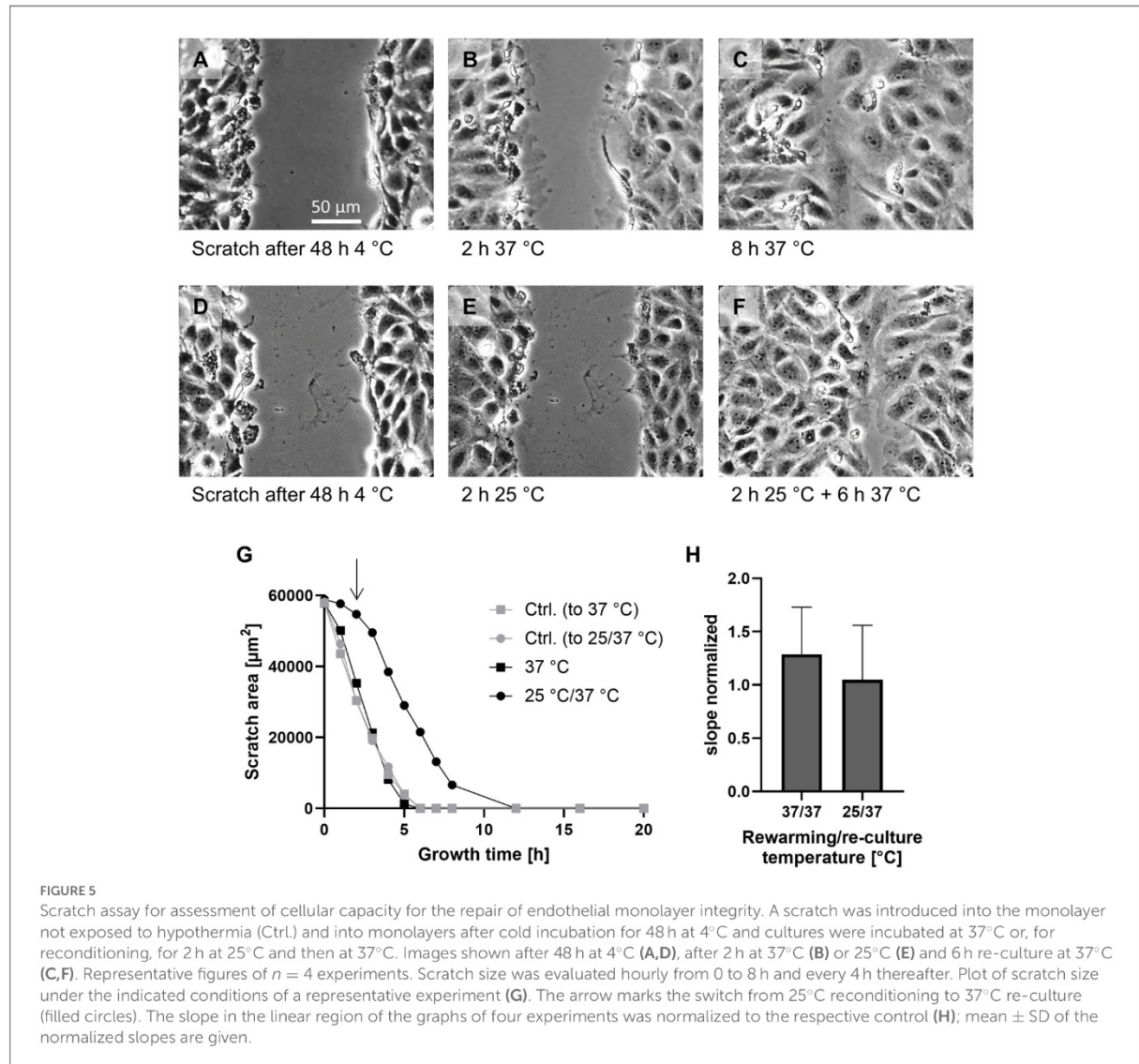
differences between the different rewarming temperatures (Table 1).

Assessment of the release of glyocalyx components showed that hyaluronic acid was released in basal amounts during normothermic incubation of control cells (Table 2). During cold incubation, the shedding of hyaluronic acid increased (Table 2) and in addition, a release of heparan sulfate was observed [17 ± 2 ng/cm² endothelium during 48 h at 4°C; < 7 ng/cm² endothelium during 48 h at 37°C (and during 2 h rewarming)]. During 2 h rewarming after cold incubation the total release of hyaluronic acid was similar to the release during 48 h warm incubation of controls suggesting a far higher release rate during rewarming (Table 2) without significant differences between rewarming temperatures.

Discussion

The results obtained here show that re-fusion of mitochondria after cold incubation occurred progressively at $\geq 21^\circ\text{C}$, while mitochondrial function came back successively at $\geq 25^\circ\text{C}$ suggesting that, from a mechanistical point of view, temperatures of $\geq 25^\circ\text{C}$, even better of $\geq 30^\circ\text{C}$ are preferable for reconditioning.

Mitochondrial fission and fusion are physiological processes needed to adjust energy provision to energy demand (33), to ensure distribution of mitochondria to daughter cells (34) and to allow mitochondrial quality control and mitophagy (35, 36). While for the latter processes fission is required, mitochondrial fusion yields mitochondria that are more efficient in energy production (36). The increasingly higher ATP levels

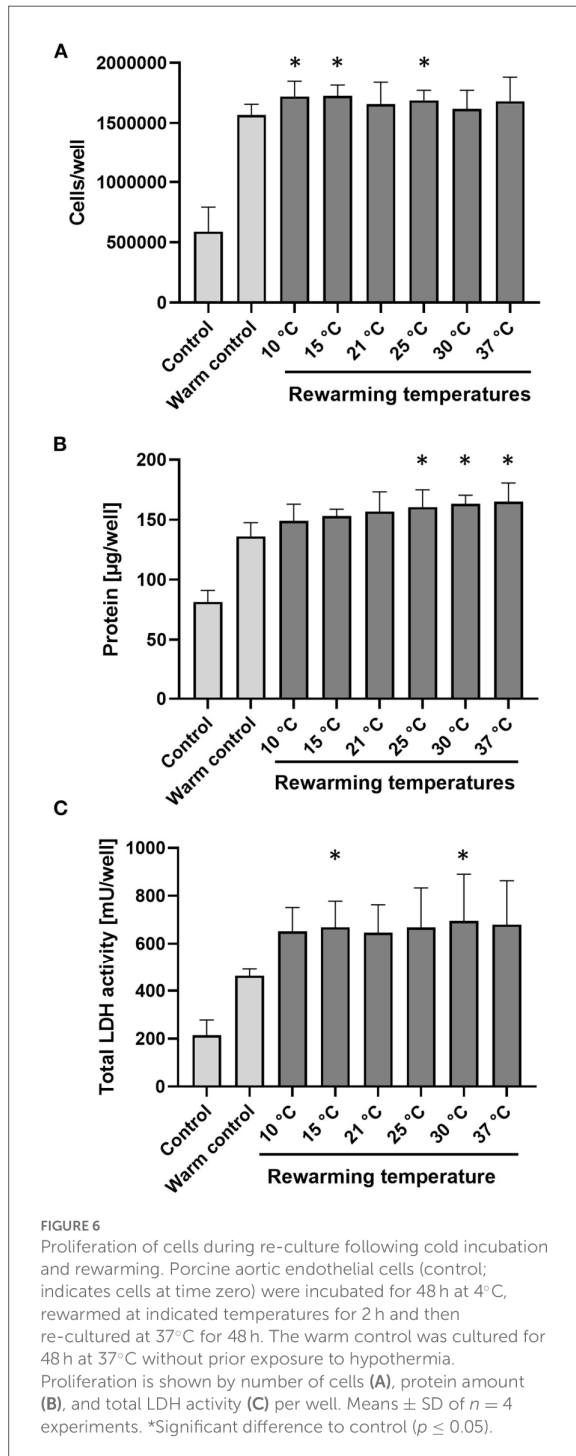


of cells rewarmed at $\geq 21^{\circ}\text{C}$ (Figure 2) with progressively fused mitochondria (Figure 1) goes in line with this latter notion.

Under normothermic conditions, mitofusins 1 and 2 together with optic atrophy protein 1 (Opa1) are the major factors responsible for mitochondrial fusion (37–39). Dynamin-related protein 1 (Drp1) is regarded to play the key role in fission together with its receptors fission 1 protein, mitochondrial fission factor, and mitochondrial dynamics proteins 49 and 51 (40–42). Under physiological conditions, both, fission and fusion, are highly regulated; fission, in particular, is activated by phosphorylation of Drp1 at S616.

Cold-induced mitochondrial fission was very pronounced (Figure 1), as described previously (19, 20), and has been observed in many cell types relevant for transplantation

medicine, such as vascular endothelial cells (19, 20), hepatocytes (21, 25), corneal endothelial cells (22), kidney epithelial cells (23, 24), and renal tubules (17) and there is evidence for its occurrence in mouse and rat kidneys (26, 27) as well as human livers (28). However, in these whole organs, mitochondrial fission is not yet unequivocally proven because mitochondrial length determined by transmission electron microscopy, as in these studies, always has the inherent uncertainty of the section plane. Furthermore, in the whole organ studies, the described mitochondrial fragmentation occurring after cold ischemia/reperfusion cannot be attributed to hypothermia alone as hypothermia, ischemia, preservation solution and reperfusion might contribute. Cold-induced mitochondrial fission, as studied in cultured cells, is mechanistically not yet



the temperature range commonly used for organ preservation; however, it was so far unclear at what temperature re-fusion occurs after mitochondrial fragmentation at 4°C.

Here, we observed that at low “rewarming” temperatures of 10° and 15°C, hardly any re-fusion of mitochondria occurred (Figure 1). There are a number of possibilities for the lack of fusion: lack of mitofusins 1 and 2, the GTPase known to mediate outer mitochondrial membrane fusion, cleavage of Opa1, the GTPase mediating inner mitochondrial membrane fusion [which is known to be processed by Oma1 (36)], lack of GTP for these GTPases, low activity of the GTPases at low temperatures, rigidity of the inner and outer mitochondrial membrane and/or lack of mitochondrial motility at the low temperatures. While the fact that rapid mitochondrial fusion was possible at higher rewarming temperatures (Figures 1F–H) renders insufficient levels of the fusion proteins mitofusins 1 and 2 and Opa1 after 48 h cold incubation unlikely, the other reasons all might contribute to low fusion activity. The unusual morphologies observed after “rewarming” at 10° and 15°C, i.e., donut and lasso structures (Figures 1I, J), however, have been described to be a result of auto-fusion of mitochondria, either end-to-end (yielding donuts) or end-to-side (yielding lasso structures) (43). Their occurrence thus might suggest that limited fusion processes can occur at 10° and 15°C and render limited mitochondrial motility at low temperature, required for mitochondria to encounter each other to allow fusion, a likely contributing factor. Mitochondria move, with the aid of dynamin and kinesin motor complexes, along microtubules (44), and mammalian microtubules are well-known to disintegrate at low temperature (45).

Exchange of metabolites, Ca²⁺ and mitochondrial DNA are considered to contribute to the higher efficiency of fused long mitochondria/mitochondrial networks in ATP production (36). Therefore, it is not surprising that the unusual auto-fused mitochondria at 10° and 15°C did not lead to increases in ATP levels (Figure 2). ATP rather decreased at these temperatures, a finding that is likely explained by increasing metabolism, i.e., ATP consumption, in the presence of low ATP production.

At ≥ 21°C mitochondria increasingly fused and ATP levels progressively increased reconstituting a normal mitochondrial network and reaching about 85% of pre-cold-storage ATP values after rewarming at 37°C. However, it is important to note that return to 37°C does not always lead to normalization of mitochondrial morphology and function: Dependent on cold incubation/storage time, the solution used for cold incubation and/or the presence of inhibitors of cold-induced injury, re-fusion of mitochondria was either possible or not (17, 20, 22, 25). Re-fusion was hampered under conditions under which cold-induced cell injury occurred (20, 22, 25), pointing to the requirement of “healthy cells”; otherwise fragmented mitochondria remained and subsequently underwent mitochondrial ultra-condensation or swelling and loss of membrane potential.

fully understood as it appears to occur in a at least partially Drp1-independent manner (19). In cultured endothelial cells cold-induced mitochondrial fission has been described to occur at temperatures ≤ 15°C, and was most marked at 4°C, i.e., in

TABLE 1 Cell injury in endothelial cells after cold incubation and subsequent rewarming.

Condition/Temperature	Propidium iodide uptake (%)	LDH release (%)
Control	0.6 ± 0.4	-
Warm control	1.6 ± 0.9	0.6 ± 0.5
48 h, 4°C	0.6 ± 0.5	0.4 ± 0.4
Rewarming 10°C + re-culture	3.2 ± 0.7	5.9 ± 3.7
Rewarming 15°C + re-culture	3.7 ± 1.6	6.3 ± 4.6
Rewarming 21°C + re-culture	3.7 ± 1.5	4.5 ± 2.9
Rewarming 25°C + re-culture	4.6 ± 2.7	5.0 ± 3.4
Rewarming 30°C + re-culture	2.8 ± 0.8	5.4 ± 3.9
Rewarming 37°C + re-culture	1.8 ± 0.3	4.9 ± 3.3

Cell injury was assessed after staining with Hoechst 33342 and propidium iodide and by determination of the release of cytosolic lactate dehydrogenase (LDH) from porcine aortic endothelial cells (Control, time zero) after 48 h at 37°C (Warm control), after 48 h at 4°C and after subsequent rewarming for 2 h at the indicated temperatures followed by 48 h re-culture. Means ± SD of n = 4 experiments.

TABLE 2 Shedding of hyaluronic acid during cold incubation and rewarming.

Condition/Temperature	Hyaluronic acid release	
	Total [ng * (cm ² endothelium) ⁻¹]	Hourly release rate [ng * (cm ² endothelium*h) ⁻¹]
Warm control (48 h)	4.7 ± 0.8	0.1 ± 0.0
48 h, 4°C	10.8 ± 0.2	0.2 ± 0.0
Rewarming 10°C (2 h)	4.1 ± 0.1	2.1 ± 0.1
Rewarming 25°C (2 h)	6.6 ± 0.5	3.3 ± 0.2
Rewarming 30°C (2 h)	5.8 ± 1.4	2.9 ± 0.7
Rewarming 37°C (2 h)	5.3 ± 0.5	2.7 ± 0.3

Hyaluronic acid was detected by ELISA in supernatants from porcine aortic endothelial cells after 48 h at 37°C (Warm control), 48 h at 4°C and rewarming for 2 h at the indicated temperatures. Total release was measured and hourly release rate was calculated for better comparability. Means ± SD of n = 4 experiments.

Cell damage was low in our model used here (Table 1) due to the addition of the iron chelator deferoxamine. Cold-induced injury and a major part of rewarming injury are iron dependent (13, 21, 46–48) and endothelial cells are known to be very sensitive to cold-induced injury and rewarming injury (13, 30, 49). In particular, iron-dependent injury has been shown to lead to mitochondrial permeability transition during rewarming (21, 50). To study the temperature dependence of mitochondrial dynamics and function during rewarming, this iron-dependent injury was inhibited. Furthermore, Krebs-Henseleit solution was used for cold incubation, although it is not used for whole organ preservation. However, there is evidence of a certain toxicity of preservation solutions (51), and University of Wisconsin solution has previously been shown to contribute to endothelial injury (20, 52). As, in this study, we wanted to characterize the temperature effects, not superimposed by any preservation solution toxicity, we chose to use Krebs-Henseleit buffer. Studies in complex settings with multiple injurious factors in parallel, such as temperature, hypoxia and preservation solution, can only contribute to knowledge after the individual processes have been understood.

Although cell damage was low throughout all conditions in our study (Table 1), we nevertheless observed some functional compromises at least in the first hours after rewarming. Cellular ATP content and metabolic activity (Figure 3) were always lower after cold incubation than without cold incubation. Furthermore, the release of glycocalyx components during hypothermia and especially during rewarming also suggest a functionally impaired endothelium (Table 2). Endothelial glycocalyx shedding has recently gained attention in organ preservation and reconditioning (53, 54). In addition, during cold incubation intercellular gaps in the endothelial monolayer appeared (Figure 4). This gap formation has also been described for corneal endothelial cells, lung epithelial cells and proximal tubular cells (22, 55, 56) and, in tissue, are likely to give rise to increased permeability. During rewarming, gap size decreased at ≥ 15°C but complete closure was only observed at 37°C (Figure 4H), similar to closure of an endothelial wound not occurring during rewarming at 25°C but at 37°C (Figure 5). Whether this is related to the lower ATP levels (Figure 2) or to the temperature dependence of cytoskeletal alterations or repair processes is currently unclear.

During re-culture, cell proliferation — a complex cellular function — was not impaired, regardless of the rewarming temperature (Figure 6). Protein levels appeared to be even slightly increased and LDH activity induced. While this suggests little late endothelial injury irrespective of the rewarming temperature, this finding might not be transferable to other cell types: Endothelial cells are very resistant to hypoxic or energy deficiency injury (57) and thus likely tolerate the low ATP levels occurring at rewarming to 10–15°C (Figure 2) better than other cell types would.

Although endothelial cell proliferation and closure of wounds in the endothelial monolayer during re-culture at 37°C were not affected by the temperature during the prior rewarming period (Figures 5, 6), insufficient gap closure/injury repair during the rewarming, i.e., reconditioning period, would, in a graft, give rise to oedema formation and unshielded sub-endothelial matrix, to which, upon reperfusion with blood, coagulation factors and platelets might attach and lead to microcirculatory deterioration and inflammation (58). Thus, the finding that endothelial proliferation during re-culture was not affected by initial rewarming temperature does not necessarily mean that rewarming temperature does not affect later processes.

We here provided, in an endothelial cell culture model, first mechanistic insights into the effects of different rewarming temperatures on the integrity and function of mitochondria in endothelial cells previously exposed to hypothermia. These data need to be confirmed with other cell types and whole organ models such as precision cut tissue slices or organoids, i.e., experimental models in which cells have an almost normal environment and interaction, and finally in whole organ and in transplantation experiments. Thereafter, these results need to be combined with the temperature dependences of further processes regarded to be important for organ quality. With a better understanding of the cellular processes, an optimization and refinement of reconditioning protocols for the different organs could be achieved. While for the study of such mechanistic processes cell culture models are indispensable, results need to be confirmed in tissue/organ models with the complex interplay of the different cell types and finally derived temperatures/protocols inevitably need to be confirmed in complex animal models of organ transplantation.

In conclusion, we here obtained data in an endothelial cell model suggesting that for optimal recovery of mitochondrial network and function during reconditioning after cold storage rewarming temperatures of $\geq 25^{\circ}\text{C}$, best of 37°C are preferable from a mechanistic point of view, a finding that now awaits confirmation in tissue/organ models.

Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Author contributions

UR conceptualized the study. LQ, LC, DS, and AR conducted the experiments. LQ analyzed the data. LQ and UR contributed to interpretation of the data and wrote the paper, all other authors critically revised it. All authors read and agreed to the final version of the manuscript.

Funding

We acknowledge support by the Open Access Publication Fund of the University of Duisburg-Essen.

Acknowledgments

We would like to thank Mr. S. Ehleben for his technical assistance.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/frtra.2022.1044551/full#supplementary-material>

References

1. Michelotto J, Gassner J, Moosburner S, Muth V, Patel MS, Selzner M, et al. *Ex vivo* machine perfusion: current applications and future directions in liver transplantation. *Langenbecks Arch Surg.* (2021) 406:39–54. doi: 10.1007/s00423-020-02014-7
2. Petrenko A, Carnevale M, Somov A, Osorio J, Rodriguez J, Guibert E, et al. Organ preservation into the 2020s: the era of dynamic intervention. *Transfus Med Hemother.* (2019) 46:151–72. doi: 10.1159/000499610
3. Moers C, Smits JM, Maathuis MH, Treckmann J, van Gelder F, Napieralski BP, et al. Machine perfusion or cold storage in deceased-donor kidney transplantation. *N Engl J Med.* (2009) 360:7–19. doi: 10.1056/NEJMoa0802289
4. van Rijn R, Schurink IJ, de Vries Y, van den Berg AP, Cortes Cerisuelo M, Darwish Murad S, et al. Hypothermic machine perfusion in liver transplantation - a randomized trial. *N Engl J Med.* (2021) 384:1391–401. doi: 10.1056/NEJMoa2031532
5. Nicholson ML, Hosgood SA. Renal transplantation after *ex vivo* normothermic perfusion: the first clinical study. *Am J Transplant.* (2013) 13:1246–52. doi: 10.1111/ajt.12179
6. Panconesi R, Flores Carvalho M, Dondossola D, Muiesan P, Dutkowski P, Schlegel A. Impact of machine perfusion on the immune response after liver transplantation - a primary treatment or just a delivery tool. *Front Immunol.* (2022) 13:855263. doi: 10.3389/fimmu.2022.855263
7. Hoyer DP, Paul A, Luer S, Reis H, Efferz P, Minor T. End-ischemic reconditioning of liver allografts: controlling the rewarming. *Liver Transpl.* (2016) 22:1223–30. doi: 10.1002/lt.24515
8. Weissenbacher A, Vrakas G, Nasralla D, Ceresa CDL. The future of organ perfusion and re-conditioning. *Transpl Int.* (2019) 32:586–97. doi: 10.1111/tri.13441
9. Rosso L, Zanella A, Righi I, Barilani M, Lazzari L, Scotti E, et al. Lung transplantation, *ex-vivo* reconditioning and regeneration: state of the art and perspectives. *J Thorac Dis.* (2018) 10(Suppl 20):S2423–30. doi: 10.21037/jtd.2018.04.151
10. Minor T, Paul A. Hypothermic reconditioning in organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant.* (2013) 18:161–7. doi: 10.1097/MOT.0b013e32835e29de
11. Fard A, Pearson R, Lathan R, Mark PB, Clancy MJ. Perfusate composition and duration of *ex-vivo* normothermic perfusion in kidney transplantation: a systematic review. *Transpl Int.* (2022) 35:10236. doi: 10.3389/tri.2022.10236
12. Wang L, MacGowan GA, Ali S, Dark JH. *Ex situ* heart perfusion: the past, the present, and the future. *J Heart Lung Transplant.* (2021) 40:69–86. doi: 10.1016/j.healun.2020.10.004
13. Rauen U, de Groot H. New insights into the cellular and molecular mechanisms of cold storage injury. *J Investig Med.* (2004) 52:299–309. doi: 10.1136/jim-52-05-29
14. Rauen U, Kerkweg U, de Groot H. Iron-dependent vs. iron-independent cold-induced injury to cultured rat hepatocytes: a comparative study in physiological media and organ preservation solutions. *Cryobiology.* (2007) 54:77–86. doi: 10.1016/j.cryobiol.2006.11.008
15. Rauen U, Polzar B, Stephan H, Mannherz HG, de Groot H. Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *FASEB J.* (1999) 13:155–68. doi: 10.1096/fasebj.13.1.155
16. Minor T, von Horn C. Rewarming injury after cold preservation. *Int J Mol Sci.* (2019) 20(9). doi: 10.3390/ijms20092059
17. Bienholz A, Walter B, Pless-Petig G, Guberina H, Kribben A, Witzke O, et al. Characterization of injury in isolated rat proximal tubules during cold incubation and rewarming. *PLoS ONE.* (2017) 12:e0180553. doi: 10.1371/journal.pone.0180553
18. Pless-Petig G, Walter B, Bienholz A, Rauen U. Mitochondrial impairment as a key factor for the lack of attachment after cold storage of hepatocyte suspensions. *Cell Transplant.* (2017) 26:1855–67. doi: 10.1177/0963689717743254
19. Quiring L, Walter B, Lohaus N, Schwan D, Rech A, Dlugos A, et al. Characterisation of cold-induced mitochondrial fission in porcine aortic endothelial cells. *Mol Med.* (2022) 28:13. doi: 10.1186/s10020-021-00430-z
20. Kerkweg U, Jacob M, de Groot H, Mannherz HG, Rauen U. Cold-induced apoptosis of rat liver endothelial cells: contribution of mitochondrial alterations. *Transplantation.* (2003) 76:501–8. doi: 10.1097/01.TP.0000069830.78758.1C
21. Rauen U, Kerkweg U, Weisheit D, Petrat F, Sustmann R, de Groot H. Cold-induced apoptosis of hepatocytes: mitochondrial permeability transition triggered by nonmitochondrial chelatable iron. *Free Radic Biol Med.* (2003) 35:1664–78. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2003.09.018
22. Rauen U, Kerkweg U, Wusteman MC, de Groot H. Cold-induced injury to porcine corneal endothelial cells and its mediation by chelatable iron - implications for corneal preservation. *Cornea.* (2006) 25:68–77. doi: 10.1097/01.icc.0000167880.96439.c6
23. Hendriks KDW, Lupi E, Hardenberg MC, Hoogstra-Berends F, Deelman LE, Henning RH. Differences in mitochondrial function and morphology during cooling and rewarming between hibernator and non-hibernator derived kidney epithelial cells. *Sci Rep.* (2017) 7:15482. doi: 10.1038/s41598-017-15606-z
24. Zhang W, Chen Y, Yang Q, Che H, Chen X, Yao T, et al. Mitofusin-2 protects against cold stress-induced cell injury in Hek293 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* (2010) 397:270–6. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.05.099
25. Pless G, Sauer IM, Rauen U. Improvement of the cold storage of isolated human hepatocytes. *Cell Transplant.* (2012) 21:23–37. doi: 10.3727/096368911X580509
26. Parajuli N, Shrum S, Tobacyk J, Harb A, Arthur JM, MacMillan-Crow LA. Renal cold storage followed by transplantation impairs expression of key mitochondrial fission and fusion proteins. *PLoS ONE.* (2017) 12:e0185542. doi: 10.1371/journal.pone.0185542
27. Zhu J, Zhang G, Song Z, Xiang X, Shu S, Liu Z, et al. Protein Kinase C-delta mediates kidney tubular injury in cold storage-associated kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol.* (2020) 31:1050–65. doi: 10.1681/ASN.2019101060
28. Huang J, Xie P, Dong Y, An W. Inhibition of Drp1 sumoylation by alr protects the liver from ischemia-reperfusion injury. *Cell Death Differ.* (2021) 28:1174–92. doi: 10.1038/s41418-020-00641-7
29. Bath ME, Hosgood SA, Nicholson ML. Vasoreactivity to acetylcholine during porcine kidney perfusion for the assessment of ischemic injury. *J Surg Res.* (2019) 238:96–101. doi: 10.1016/j.jss.2019.01.019
30. Nordling S, Brannstrom J, Carlsson F, Lu B, Salvaris E, Wanders A, et al. Enhanced protection of the renal vascular endothelium improves early outcome in kidney transplantation: preclinical investigations in pig and mouse. *Sci Rep.* (2018) 8:5220. doi: 10.1038/s41598-018-21463-1
31. Peters S, Reis A, Noll T. Preparation of endothelial cells from micro- and macrovascular origin. In: F.M. S. Dhein MD, editor. *Practical Methods in Cardiovascular Research.* Berlin, Heidelberg: Springer (2005). p. 610–29. doi: 10.1007/3-540-26574-0_32
32. Bergmeyer HU. *Enzymes I: Oxidoreductases, Transferases.* Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft (1985).
33. Pagliarini DJ, Calvo SE, Chang B, Sheth SA, Vafai SB, Ong SE, et al. A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell.* (2008) 134:112–23. doi: 10.1016/j.cell.2008.06.016
34. Taguchi N, Ishihara N, Jofuku A, Oka T, Mihara K. Mitotic phosphorylation of dynamin-related gtpase drp1 participates in mitochondrial fission. *J Biol Chem.* (2007) 282:11521–9. doi: 10.1074/jbc.M607279200
35. Chan DC. Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annu Rev Genet.* (2012) 46:265–87. doi: 10.1146/annurev-genet-110410-132529
36. Pernas L, Scorrano L. Mito-morphosis: mitochondrial fusion, fission, and cristae remodeling as key mediators of cellular function. *Annu Rev Physiol.* (2016) 78:505–31. doi: 10.1146/annurev-physiol-021115-105011
37. Cipolat S, de Brito OM, Dal Zilio B, Scorrano L. Opa1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2004) 101:15927–32. doi: 10.1073/pnas.0407043101
38. Ishihara N, Eura Y, Mihara K. Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via gtpase activity. *J Cell Sci.* (2004) 117(Pt 26):6535–46. doi: 10.1242/jcs.01565
39. Song Z, Ghochani M, McCaffery JM, Frey TG, Chan DC. Mitofusins and Opa1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion. *Mol Biol Cell.* (2009) 20:3525–32. doi: 10.1091/mbc.e09-03-0252
40. Hoppins S, Lackner L, Nunnari J. The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu Rev Biochem.* (2007) 76:751–80. doi: 10.1146/annurev.biochem.76.071905.090048
41. Kraus F, Roy K, Pucadyil TJ, Ryan MT. Function and regulation of the divisome for mitochondrial fission. *Nature.* (2021) 590:57–66. doi: 10.1038/s41586-021-03214-x
42. van der Blik AM, Shen Q, Kawajiri S. Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* (2013) 5:a011072. doi: 10.1101/cshperspect.a011072

43. Ahmad T, Aggarwal K, Pattnaik B, Mukherjee S, Sethi T, Tiwari BK, et al. Computational classification of mitochondrial shapes reflects stress and redox state. *Cell Death Dis.* (2013) 4:e461. doi: 10.1038/cddis.2012.213
44. Saxton WM, Hollenbeck PJ. The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci.* (2012) 125(Pt 9):2095–104. doi: 10.1242/jcs.053850
45. Wallin M, Stromberg E. Cold-stable and cold-adapted microtubules. *Int Rev Cytol.* (1995) 157:1–31. doi: 10.1016/S0074-7696(08)62155-5
46. Kerkweg U, Li T, de Groot H, Rauen U. Cold-induced apoptosis of rat liver cells in University of Wisconsin solution: the central role of chelatable iron. *Hepatology.* (2002) 35:560–7. doi: 10.1053/jhep.2002.31869
47. Rauen U, Petrat F, Li T, de Groot H. Hypothermia injury/cold-induced apoptosis – evidence of an increase in chelatable iron causing oxidative injury in spite of low O₂/H₂O₂ formation. *FASEB J.* (2000) 14:1953–64. doi: 10.1096/fj.00-0071com
48. Salahudeen AK. Cold ischemic injury of transplanted kidneys: new insights from experimental studies. *Am J Physiol Renal Physiol.* (2004) 287:F181–7. doi: 10.1152/ajprenal.00098.2004
49. McKeown CM, Edwards V, Phillips MJ, Harvey PR, Petrunka CN, Strasberg SM. Sinusoidal lining cell damage: the critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat. *Transplantation.* (1988) 46:178–91. doi: 10.1097/00007890-198808000-00001
50. Salahudeen AK, Huang H, Joshi M, Moore NA, Jenkins JK. Involvement of the mitochondrial pathway in cold storage and rewarming-associated apoptosis of human renal proximal tubular cells. *Am J Transplant.* (2003) 3:273–80. doi: 10.1034/j.1600-6143.2003.00042.x
51. Rauen U, de Groot H. Inherent toxicity of organ preservation solutions to cultured hepatocytes. *Cryobiology.* (2008) 56:88–92. doi: 10.1016/j.cryobiol.2007.09.003
52. Rauen U, Noll T, Piper HM, Lauchart W, Becker HD, de Groot H. Endothelial cell toxicity of preservation solutions: comparison of endothelial cells of different origin and dependence on growth state. *Cryobiology.* (1994) 31:144–53. doi: 10.1006/cryo.1994.1018
53. Mathis S, Putzer G, Schneeberger S, Martini J. The endothelial glycocalyx and organ preservation - from physiology to possible clinical implications for solid organ transplantation. *Int J Mol Sci.* (2021) 22:4019. doi: 10.3390/ijms22084019
54. Sladden TM, Yerkovich S, Wall D, Tan M, Hunt W, Hill J, et al. Endothelial glycocalyx shedding occurs during *ex vivo* lung perfusion: a pilot study. *J Transplant.* (2019) 2019:6748242. doi: 10.1155/2019/6748242
55. Bartels-Stringer M, Kramers C, Wetzels JF, Russel FG, de Groot H, Rauen U. Hypothermia causes a marked injury to rat proximal tubular cells that is aggravated by all currently used preservation solutions. *Cryobiology.* (2003) 47:82–91. doi: 10.1016/S0011-2240(03)00071-3
56. Pizanis N, Gillner S, Kamler M, de Groot H, Jakob H, Rauen U. Cold-induced injury to lung epithelial cells can be inhibited by iron chelators - implications for lung preservation. *Eur J Cardiothorac Surg.* (2011) 40:948–55. doi: 10.1016/j.ejcts.2011.01.052
57. Noll T, Wissemann P, Mertens S, Krutzfeldt A, Spahr R, Piper HM. Hypoxia tolerance of coronary endothelial cells. *Adv Exp Med Biol.* (1990) 277:467–76. doi: 10.1007/978-1-4684-8181-5_52
58. Menger MD, Vollmar B. Role of microcirculation in transplantation. *Microcirculation.* (2000) 7:291–306. doi: 10.1111/j.1549-8719.2000.tb00129.x

4 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

In den hier erarbeiteten Publikationen wurden die kälteinduzierten Veränderungen der mitochondrialen Dynamik von Endothelzellen beschrieben. In der ersten Publikation [72] konnte gezeigt werden, dass Mitochondrien bereits nach 3 h Kaltinkubation (4 °C; Publ. 1, Abb. 2) und ab Temperaturen unter 15 °C (Publ. 1, Abb. 3) eine starke Fragmentation aufweisen. Dabei sank der interzelluläre ATP-Gehalt über die Dauer der Kaltinkubation stark ab (Publ. 1, Abb. 10). In Abb. 7 ist die kälteinduzierte mitochondriale Fragmentation und der Bezug zum ATP exemplarisch dargestellt und annotiert.

Das Membranpotential blieb bei der Kaltinkubation erhalten (Publ. 1, Abb. 1D-F), während der Kälte traten jedoch ungewöhnliche mitochondriale Morphologien auf (Publ. 1, Abb. 4). Das Fissionsprotein DRP1 zeigte keine Veränderung in der Proteinmenge, allerdings war die Phosphorylierung sowohl an Position S616 als auch an Position S637 erhöht (Publ. 1, Abb. 6). In der Kälte konnte keine erhöhte Rekrutierung von DRP1 an die Mitochondrien beobachtet werden (Publ. 1, Abb. 7) und die mitochondriale Fragmentation trat auch unter Zugabe des DRP1-Hemmstoffs Mdivi-1 auf (Publ. 1, Abb. 8). Die kälteinduzierte mitochondriale Fragmentation war auch nach langen Inkubationszeiten von 48 h reversibel. Das Fusionsprotein OPA1 wurde jedoch während der Kälte in seine kurze Isoform prozessiert (Publ. 1, Abb. 9).

Wie die zweite Publikation [73] zeigen konnte, war die Reversibilität temperaturabhängig und ab einer Erwärmung auf 21 °C zu beobachten, wobei sie schneller und deutlicher bei höheren Temperaturen stattfand (Publ. 2, Abb. 1). Der intrazelluläre ATP-Gehalt und die Monolayerintegrität nahmen in der Kälte ab, und in der Wiedererwärmung konnte eine Zunahme mit steigender Wiedererwärmungstemperatur beobachtet werden (Publ. 2, Abb. 2, Abb. 4). Wurde die Re-Fusion gehemmt, blieb der ATP-Gehalt niedrig (Publ. 1, Abb. 10). Die metabolische Aktivität sank ebenfalls in der Kälte stark ab und stieg mit steigender Temperatur an (Publ. 2, Abb. 3). Grundsätzlich führten höhere Wiedererwärmungstemperaturen zur schnelleren Rückkehr auf das physiologische normotherme Niveau. Die Zellschädigung war dabei konstant niedrig (Publ. 2, Tab. 1). Zellproliferation und Reparaturprozesse waren nach Wiedererwärmung auf 37 °C weiterhin möglich (Publ. 2, Abb. 6). Gerade die Reparaturprozesse liefen bei Erwärmung auf 37 °C deutlich schneller ab als mit Rekonditionierung bei 25 °C (Publ. 2, Abb. 5).

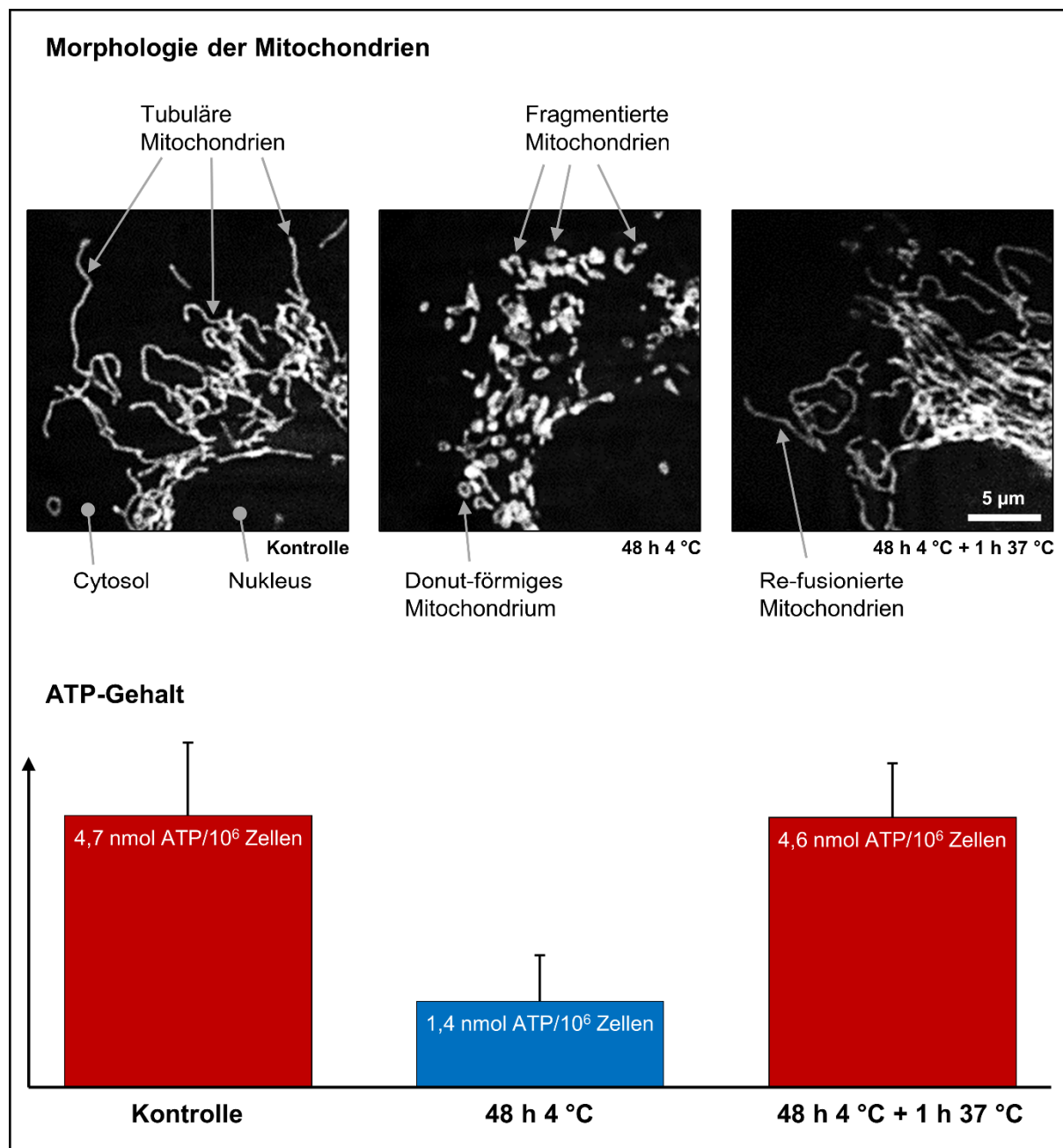


Abbildung 7: Zusammenfassende Darstellung der kälteinduzierten mitochondrialen Fragmentation und der Bezug zum ATP-Gehalt mit Erläuterungen. Die Mitochondrien wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker Red angefärbt und sind hier wegen des besseren Kontrastes weiß dargestellt. In der Kontrolle ist ein Netzwerk aus langen tubulären Mitochondrien vorhanden. Nach Kaltinkubation für 48 h bei 4 °C ist eine starke Fragmentation zu erkennen, die mit einer Abnahme des ATP-Gehalts einhergeht. Durch Erwärmung für 1 h bei 37 °C findet eine Re-Fusion statt, sodass sich wieder das Netzwerk aus tubulären Mitochondrien bildet. Der ATP-Gehalt steigt ebenfalls wieder auf das Ausgangsniveau an (vgl. Publ. 1, Abb. 1A-C; 10A [72]).

5 Diskussion

5.1 Charakteristika der kälteinduzierten mitochondrialen Fragmentation

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die kälteinduzierte mitochondriale Fragmentation deutlich früher auftritt, als es bisher in der Literatur beschrieben wurde. In den bisherigen Publikationen wurden die Mitochondrien überwiegend erst nach 18-48 h untersucht. Nach 18 h Kälte wurde eine mitochondriale Fragmentation etwa in Rattenleberendothelzellen [21], Rattennieren [74] und Rattenhepatozyten [18] beschrieben. Darüber hinaus trat sie nach 24 h in porcinem Nierenendothel [75] und humanem Nierenepithel [71] auf. Auch nach 48 h [71, 76] und nach bis zu 5 Tagen [69] Kälte wurde eine mitochondriale Fragmentation beschrieben. Die bisher kürzeste Untersuchung lieferte Hinweise auf eine beginnende Fragmentation nach 8 h in humanen embryonalen Nierenzellen [77] und liegt damit immer noch deutlich von den in dieser Arbeit beobachteten 3 h (Publ. 1, Abb. 2) entfernt.

Seit der Veröffentlichung der beiden Publikationen dieser Arbeit konnten die Ergebnisse der kälteinduzierten mitochondrialen Fragmentation zusätzlich in einer porcinen Nierenepithelzelllinie und einer humanen Lungenepithelzelllinie reproduziert werden (unveröffentlichte Ergebnisse).

Die Temperaturabhängigkeit der mitochondrialen Fragmentation wurde bisher nicht untersucht, obwohl sie gerade im Hinblick auf die vielen unterschiedlichen Konservierungsstrategien (Abb. 2) eine wichtige Erkenntnis darstellt. In dieser Arbeit konnte eine breite Temperaturabhängigkeit mit einer deutlichen Fragmentation unter 21 °C (Publ. 1, Abb. 3) beschrieben werden, sodass das Auftreten bei den klinischen Konservierungstemperaturen unvermeidlich ist [38, 39].

Hinzu kommt, dass andere Publikationen zu kälteinduzierten mitochondrialen Veränderungen nicht klar zwischen Kälteeffekten und Schädigungseffekten unterscheiden. Meist werden die Mitochondrien als Nebenbefund bei Transplantationsstudien untersucht, und wenn Veränderungen an Mitochondrien beobachtet werden, werden sie als Folge der Schädigung interpretiert [74, 78]. In dieser Arbeit wurde klar unter Nicht-Schädigungsbedingungen gearbeitet, was bisher in der Literatur selten dokumentiert wurde. Es gab bereits Hinweise, dass die mitochondriale Fragmentation grundsätzlich reversibel ist, wenn die Schädigung verhindert wird [21]. Dies wurde in dieser Arbeit eindeutig belegt (Abb. 7; Publ. 1, Abb. 1A-C). Um die Fragmentation zweifelsfrei als Kälteeffekt und nicht als Schädigungseffekt zu untersuchen, wurde die gesamte Charakterisierung in dieser Arbeit in einer physiologischen Lösung und unter Zugabe eines Eisenchelators durchgeführt. Es ist bekannt, dass die Kälteschädigung und der Großteil

der Wiedererwärmungsschädigung eisenabhängig sind [18] und somit durch Zugabe eines Chelators verhindert werden können [21]. Es konnte auch gezeigt werden, dass die mitochondriale Fragmentation sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit eines Eisenchelators zu beobachten ist, es sich also um einen Kälteeffekt handelt und der Chelator das Auftreten nicht beeinträchtigt [21]. Die hier gemachten Beobachtungen können also klar von Schädigungseffekten abgegrenzt und auf Kälte zurückgeführt werden.

In Publikation 1 wurde beobachtet, dass bei niedrigen Inkubationstemperaturen ungewöhnliche mitochondriale Morphologien wie z.B. Donuts (Publ. 1, Abb. 4) auftreten. In der Literatur wurden diese bisher mit Membranpotentialverlust oder zellulärem Stress in Verbindung gebracht [79]. Bei Zugabe des Komplex I-Inhibitors Rotenon wurden z. B. ähnliche Strukturen beobachtet [80]. Auch unter Hypoxie treten ungewöhnliche Morphologien wie Donuts auf und wurden in diesem Fall als Schutzmechanismus der Mitochondrien gegen Volumenveränderungen interpretiert [81]. Das Auftreten von ungewöhnlichen Morphologien wie Donuts deutet auf eine Auto-Fusion der Mitochondrien hin. Damit wäre eine Fusion in der Kälte grundsätzlich möglich, nicht aber die Verbindung zweier benachbarter Mitochondrien, was durch eine mögliche Cytoskelettdegradation begründet werden kann [82].

Die hier beobachtete kälteinduzierte mitochondriale Fission kann zudem nicht mit dem bisher bekannten Phänomen erklärt werden, wie man es aus dem braunen Fettgewebe kennt: Im Gesamtorganismus wird die mitochondriale Dynamik unter Hypothermie zur Wärmeproduktion angepasst [53]. Dies geschieht allerdings hormongesteuert [53]. In isolierten Organen oder Zellen – wie in dieser Arbeit – ist eine hormonelle Regulation nicht möglich, es muss sich also um eine intrazelluläre Reaktion auf die Kälte handeln.

In dieser Arbeit wurde in der Kälte eine klare Korrelation zwischen der steigenden Fragmentation und dem sinkenden ATP-Gehalt beobachtet (Publ. 1, Abb. 2, 10). Es ist beschrieben, dass die mitochondriale Fission mit einer Abnahme der ATP-Produktion einhergeht [46, 83]. Jedoch ist auch eine Fragmentation als Reaktion auf einen sinkenden ATP-Bedarf bekannt [46]. In diesem Fall ist es also nicht klar, ob die Fragmentation der Auslöser oder die Folge des niedrigen ATP-Gehalts ist. Wenn die Fragmentation jedoch durch den niedrigen ATP-Bedarf ausgelöst würde, sollte der ATP-Gehalt nicht so stark sinken wie beobachtet (Publ. 1, Abb. 10). Außerdem konnten wir beobachten, dass bei inhibierter Re-Fusion der ATP-Gehalt auch in der Wärme nicht wieder anstieg (Publ. 1, Abb. 10B).

Eine Zusammenfassung der in dieser Arbeit herausgearbeiteten Charakteristika der kälteinduzierten mitochondrialen Fragmentation (und der weiteren Ergebnisse) ist in Abb. 8 gezeigt.

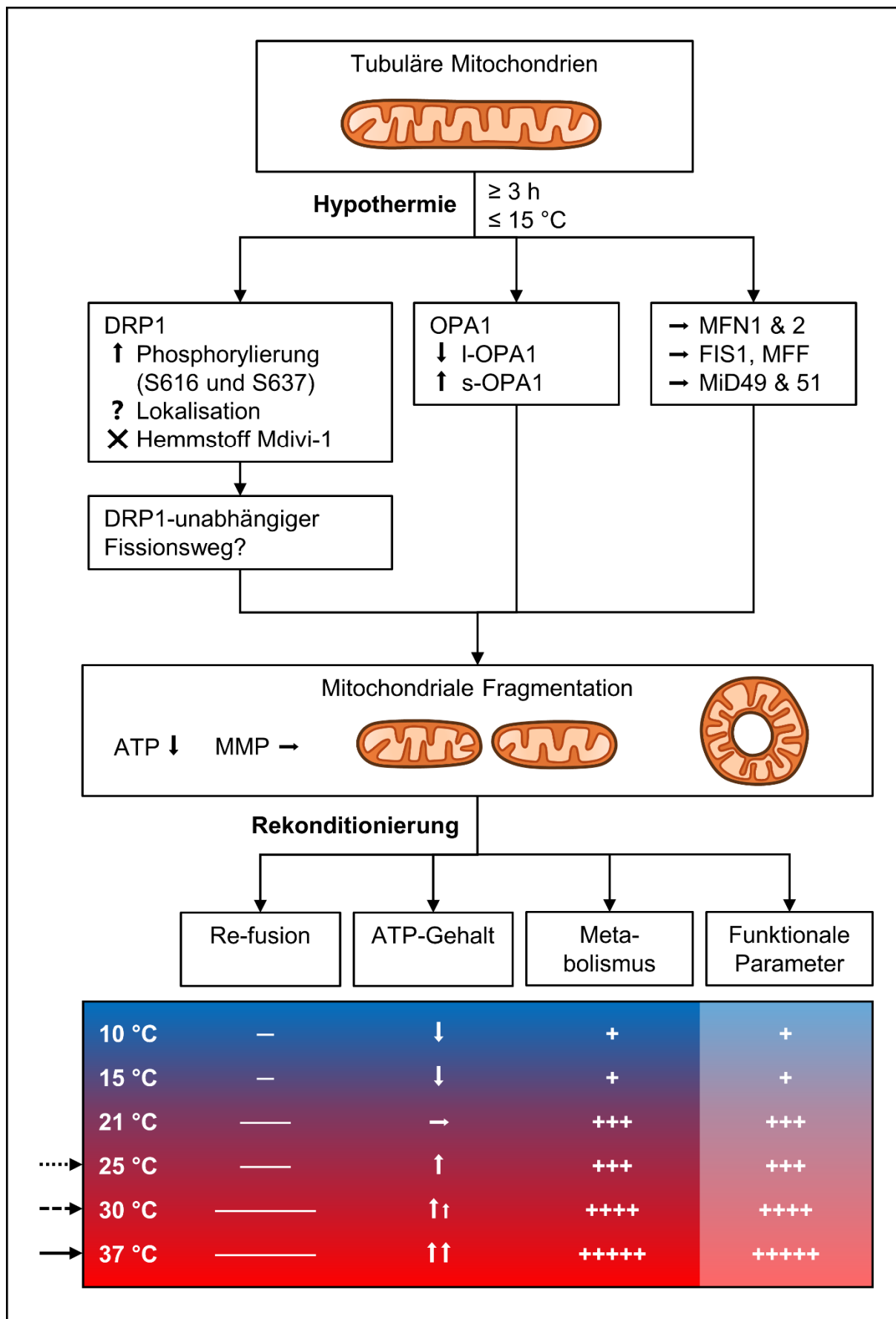


Abbildung 8: Übersicht über die kälteinduzierte mitochondriale Fragmentation und ihre Reversibilität. Die unter physiologischen Bedingungen tubulären Mitochondrien zeigen unter **Hypothermie** für ≥ 3 h und ≤ 15 °C mitochondriale Fragmentation. Dabei zeigt das Schlüsselenzym für Fission DRP1 eine erhöhte Phosphorylierung (sowohl aktivierend als auch inaktivierend), keine erhöhte Lokalisation an den Mitochondrien während der Kälte, und der DRP1-Hemmstoff Mdivi-1 konnte die Fission nicht aufhalten. Diese Ergebnisse deuten auf einen möglichen DRP1-*unabhängigen* Fissionsweg hin. OPA1 zeigte eine Prozessierung von der langen zur kurzen Isoform, allerdings war das verbleibende s-OPA1 ausreichend für die Re-Fusion. Alle weiteren untersuchten Proteine zeigten keine Veränderungen. Neben der Fragmentation der Mitochondrien sank der ATP-Gehalt der Zellen und es konnten ungewöhnliche mitochondriale Morphologien beobachtet werden. Das Membranpotential veränderte sich über die Kaltinkubation nicht. Die **Rekonditionierung** zeigte erst ab 21 °C eine beginnende Re-Fusion, keinen Abfall des ATP-Gehalts und einen Anstieg des Metabolismus. Mit steigender Rekonditionierungstemperatur stiegen auch die Ausprägung der Re-Fusion, der ATP-Gehalt und der Metabolismus wieder an. Für eine optimale Rekonditionierung ist eine Temperatur von mindestens 21 °C, besser 30 °C oder 37 °C zu empfehlen.

5.2 Mechanismus der kälteinduzierten mitochondrialen Fragmentation

In Publikation 1 wurde erstmalig der Mechanismus hinter der kälteinduzierten mitochondrialen Fragmentation systematisch untersucht. Den ersten Anlaufpunkt stellt die GTPase DRP1 dar. DRP1 ist das zentrale Enzym bei der mitochondrialen Fission unter physiologischen Bedingungen [49, 54]. Interessanterweise konnte in dieser Arbeit keine Evidenz für die Beteiligung von DRP1 in der Kälte gefunden werden.

Es ist bekannt, dass DRP1 durch Phosphorylierung an S616 verstärkt zu den Mitochondrien rekrutiert wird [54]. Diese Phosphorylierung nahm in der Kälte auch tatsächlich zu, jedoch nahm zusätzlich die Phosphorylierung an S637 zu (Publ. 1, Abb. 6A-C), was eine Hemmung von DRP1 zur Folge hat [54]. Damit konnte keine schlüssige Aktivierung von DRP1 beschrieben werden. Auch durch Lokalisationsuntersuchungen konnte keine erhöhte mitochondriale Rekrutierung in der Kälte beobachtet werden (Publ. 1, Abb. 7). Außerdem wurde die kälteinduzierte Fragmentation selbst unter Zugabe des DRP1-Inhibitors Mdivi-1 nicht verhindert (Publ. 1, Abb. 8). Zwar fand sie leicht verzögert statt, jedoch konnte weiterhin eine deutliche Fragmentation beobachtet werden. Mdivi-1 inhibiert die GTPase-Aktivität von DRP1, sodass das Enzym nicht mehr in der Lage ist, die Fission zu katalysieren [84]. Der Einsatz von Mdivi-1 ist zwar umstritten, allerdings nicht wegen Zweifel an seiner Effektivität, sondern wegen einer eingeschränkten Spezifität [85]. Für die hier beobachteten Ergebnisse ist letzteres allerdings nebensächlich, weil trotz DRP1-Inhibitors eine Fragmentation in der Kälte auftrat. Um einen mangelnden Inhibitionseffekt auszuschließen, wurde die Konzentration mit 20 μ M sehr hoch angesetzt und bereits mit einer Vorinkubationszeit zu den Zellen geben.

Von den anderen untersuchten Proteinen zeigte nur MFF eine erhöhte Phosphorylierung an S146 über die Inkubationsdauer (Publ. 1, Abb. 6). Durch die Phosphorylierung ist jedoch lediglich eine erhöhte Rekrutierung von DRP1 an die Mitochondrien beschrieben [86, 87], was in dieser Arbeit nicht beobachtet wurde (Publ. 1, Abb. 7).

Die zuvor genannten Ergebnisse (Abb. 8) deuten alle darauf hin, dass DRP1 nicht die zentrale Rolle bei der kälteinduzierten Fragmentation spielt, wie sie aus der Wärme bisher bekannt ist. Auch wenn bisher beschrieben ist, dass DRP1 unter physiologischen Bedingungen für 95 % der Fissionsereignisse verantwortlich ist, wurden in seltenen Fällen DRP1-unabhängige Fragmentationsmechanismen beschrieben [88]. Die Teilung der Mitochondrien während der Mitophagie beispielsweise wurde als DRP1-unabhängig beschrieben [89]. Außerdem wurde beschrieben, dass sowohl OPA3 [90] als auch die Herunterregulierung von LETM1 [91] zu einer DRP1-unabhängigen mitochondrialen Fragmentation führen können. Die von Mitochondrien abgeleiteten Vesikel werden ebenfalls statt durch DRP1 über einen Parkin- und Pink1-abhängigen Weg gebildet [92]. Obwohl sie also nicht die Mehrheit ausmachen, sind DRP1-unabhängige Fissionsereignisse durchaus bekannt.

Unter normalen physiologischen Bedingungen besteht ein stark reguliertes Gleichgewicht zwischen Fission und Fusion [49]. Daher könnte die beobachtete Fragmentation statt durch eine gesteigerte Fissionsaktivität auch durch eine reduzierte Fusionsaktivität erklärt werden. Hierfür wäre allerdings ebenfalls eine funktionierende Fissionsmaschinerie nötig, denn auch wenn die Fusion in der Kälte gehemmt sein sollte, muss für eine Fragmentation der Mitochondrien weiterhin die Fission stattfinden. Also auch hier würde nach aktuellem Kenntnisstand DRP1 eine zentrale Rolle spielen müssen.

Es gibt nur wenige Arbeiten in der Literatur, die sich mit den Enzymen der Fission in der Kälte beschäftigt haben. In einer Nierentransplantationsstudie an Ratten wurde beispielsweise nach 18-stündiger Kaltlagerung eine abnehmende Proteinmenge von DRP1 nachgewiesen [74]. Dabei handelt es sich aber nicht um Untersuchungen bei reiner Kälte, sondern einer Kombination aus Kälte und Hypoxie. Außerdem wurden die Enzyme erst spät nach Kälteexposition untersucht, sodass ein Vergleich nur bedingt herangezogen werden kann.

5.3 Re-Fusion in der Wiedererwärmung

Auch wenn die kälteinduzierte mitochondriale Fission früh und stark auftrat, war sie in unserem Modell nach Wiedererwärmung reversibel. In der Literatur sind allerdings Bedingungen bekannt, bei denen die Mitochondrien auch bei normothermer Wiedererwärmung nicht re-fusionieren und es stattdessen zum Zelltod kommt [21, 43, 70]. Dies ist besonders unter

Zellschädigungsbedingungen der Fall. In physiologischer Lösung konnte selbst nach 48 h Hypothermie eine klare Re-Fusion in der Wiedererwärmung verzeichnet werden (Publ. 2, Abb. 1). Diese ging mit einer Zunahme des ATP-Gehalts und der metabolischen Aktivität einher. Auch die Monolayer-Integrität konnte nach Kälte durch Erwärmung wiederhergestellt werden. Die Beobachtung, dass der intrazelluläre ATP-Gehalt bei „Erwärmung“ auf 10 °C und 15 °C statt anzusteigen gesunken ist, deutet darauf hin, dass die metabolische Aktivität und damit der ATP-Verbrauch ansteigt, die Mitochondrien allerdings noch nicht in der Lage sind, ausreichend ATP zu produzieren (Publ. 2, Abb. 2) [3]. Diese Annahme wird ebenfalls durch die geringe bis nicht-vorhandene Re-Fusion bei diesen Temperaturen (Publ. 2, Abb. 1) gestützt. Dass die Re-Fusion für die Zellen in der Wiedererwärmung von besonderer Bedeutung ist, zeigt der niedrigbleibende ATP-Gehalt, wenn die Re-Fusion durch Hemmung der Polymerisierung des Cytoskeletts inhibiert wird (Publ. 1, Abb. 10).

Mechanistisch wird die Fusion besonders durch OPA1 reguliert. Das Enzym wird durch Proteasen gespalten und kann in unterschiedlichen Isoformen vorliegen [63, 64]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die lange Isoform des Enzyms (l-OPA1) über die Dauer der Kaltinkubation hinweg zur kurzen Isoform (s-OPA1) prozessiert wurde (Publ. 1, Abb. 9). Nur l-OPA1 ist in der Lage, die Fusion der Mitochondrienmembran zu vermitteln, während s-OPA1 regulatorische Funktionen übernimmt [64]. Trotzdem ist bei der Reduktion von l-OPA1 auf unter 20 % der Gesamt-OPA-Menge nach 48 h bei 4 °C noch eine Re-Fusion möglich; es muss also eine hinreichende Menge l-OPA1 für die Fusionskatalyse vorhanden sein. Lediglich die Geschwindigkeit der Re-Fusion war nach längerer Kaltinkubation nicht mehr so hoch wie bei kürzerer Kaltinkubation.

In der Literatur wird beschrieben, dass nach sehr langen Kaltinkubationszeiten die Fusion ebenfalls nicht mehr so ausgeprägt war wie bei kürzeren Zeiten [70]. Auch dieses Ergebnis könnte auf eine schleichende OPA1-Prozessierung in der Kälte hindeuten, denn je weniger l-OPA1 vorliegt, desto weniger Re-Fusion kann katalysiert werden [61]. Die Prozessierung von OPA1 scheint bei Kälte die einzige Veränderung an der Fusionsmaschinerie zu sein. Es konnte keine (Selbst-) Prozessierung von OMA1, der zentralen Protease zur Regulation von OPA1 [63], beobachtet werden. Auch Änderungen im Proteingehalt von MFN1 und 2 (mitofusion-1 und 2), den Fusionsenzymen der äußeren Membran [93] wurden nicht nachgewiesen. Ebenso konnte die fehlende Synthese von l-OPA1 als Grund für die Abnahme durch Zugabe des Transkriptioninhibitors α -Amanitin ausgeschlossen werden (Publ. 1, Abb. 9E). Diese Ergebnisse sind neben weiteren in Abb. 8 zusammengefasst.

In bisher unveröffentlichten Daten konnte beobachtet werden, dass die Prozessierung von OPA1 unter chloridarmen Bedingungen noch stärker ausgeprägt war (Walter, B., [...], Quiring, L., et al., Manuskript in Vorbereitung). Außerdem wurde gezeigt, dass nach 48 h Kaltinkubation unter chloridarmen Bedingungen keine Re-Fusion stattfindet und es zum Zelltod kommt [94]. Dies legt die Hypothese nahe, dass durch die erhöhte OPA1-Prozessierung keine Re-Fusion der Mitochondrien möglich ist, der ATP-Gehalt daher niedrig bleibt und die Zellen sterben. Diese Beobachtungen sind besonders bemerkenswert, wenn man in Betracht zieht, dass die meisten verwendeten Konservierungslösungen eine chloridarme Zusammensetzung aufweisen [44].

Die hier gezogenen Schlüsse können ebenfalls auf die Temperaturabhängigkeit der Rekonditionierung angewendet werden. Je höher die Rekonditionierungstemperatur, desto längere tubuläre Mitochondrien lagen vor. Mit längeren Mitochondrien geht ebenfalls eine erhöhte ATP-Produktion einher und eine bessere Funktion der Zellen.

Es konnte gezeigt werden, dass das Cytoskelett in der Kälte degradiert (siehe dazu auch Publ. 1, Abb. 10) und unter chloridarmen Bedingungen nicht wieder polymerisiert [82]. Die Zellen zeigten daher auch in der Wiedererwärmung keine Rückkehr zu ihrer ursprünglichen Morphologie [82]. Hier kann ebenfalls die fehlende Re-Fusion zur Erklärung herangezogen werden, denn für die Reparatur des Cytoskeletts wird nach der Kälte ATP benötigt [95]. Wenn die Re-Fusion der Mitochondrien unter chloridarmen Bedingungen nicht eintritt, steht entsprechend wenig ATP zur Verfügung und die Zellen können sich nicht ausspreiten. Andersherum kann durch Re-Fusion und ATP-Produktion die Funktion der Endothelzellen in der Wiedererwärmung wiederaufgenommen werden und sich ein Monolayer bilden. Nach den bisher unveröffentlichten Daten ist davon auszugehen, dass die erhöhte OPA1-Prozessierung unter chloridarmen Bedingungen einen erheblichen Einfluss auf die fehlende Re-Fusionsfähigkeit und somit die Vitalität der Zellen nach der Kaltinkubation hat (Walter, B., [...], Quiring, L., et al., Manuskript in Vorbereitung).

Neben der Re-Fusion zeigten auch die funktionellen Parameter eine Temperaturabhängigkeit in der Wiedererwärmung. Auch die eingefügte Wunde wies nach Rekonditionierung einen deutlich langsameren Heilungsverlauf auf, als bei direkter Erwärmung auf 37 °C (Publ. 2, Abb. 5). Es ist bekannt, dass das endotheliale Verhalten stark vom mitochondrialen Metabolismus abhängt [45], der bei 25 °C deutlich niedriger war als bei 37 °C (Publ. 2, Abb. 3).

Zur Wahl der optimalen Konditionierungstemperatur kann in dieser Arbeit eine klare Aussage getätigt werden. Dennoch muss klargestellt werden, dass die Wahl der Konditionierungstemperatur von vielen verschiedenen Faktoren abhängt und sich nicht ausschließlich nach der

mitochondrialen Re-Fusion oder dem Schließen von Monolayerschäden richtet. Dennoch sprechen die hier gemachten Beobachtungen für eine Rekonditionierung bei annähernd normothermen Bedingungen. Bei allen untersuchten Parametern zeigte die Erwärmung auf normothermes Niveau die besten Resultate. Es ist jedoch bekannt, dass Endothelzellen widerstandsfähiger gegenüber Hypoxie oder Energiemangel sind als andere Zelltypen [96]. Dadurch könnte die optimale Rekonditionierungstemperatur im Gesamtorgan natürlich eine andere sein und ähnliche Untersuchung mit anderen Zelltypen müssen folgen. Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass am Organ ein gradueller Temperaturanstieg – so wie er auch in den Experimenten dieser Arbeit durchgeführt wurde – deutlich schonender ist als ein abruptes Erwärmen auf 37 °C [33].

5.4 Relevanz der Ergebnisse für das Gesamtorgan

Mit einem Auftreten nach bereits 3 h ist die kälteinduzierte mitochondriale Fragmentation für die Transplantationsmedizin hoch relevant. Bei der Organkonservierung kommen Temperaturen von 4 °C über 6-12 h durchaus vor [8]. Die Fragmentation tritt außerdem bei Temperaturen unter 15 °C auf, was die Relevanz nur weiter unterstützt, da die meisten aktuell verwendeten Konservierungsstrategien bei Temperaturen unter 15 °C ablaufen (Abb. 2) [26]. Die beobachtete Wachstumsabhängigkeit ist ebenfalls ein Indiz dafür, dass die auftretende Fission im Organ stärker ausfallen kann, als in den Experimenten mit isolierten oder kultivierten Zellen (Publ. 1, Abb. 5).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eindrücklich, dass die kälteinduzierte mitochondriale Fission in den hier untersuchten Endothelzellen zu einem starken ATP-Abfall führt. Die bisher unveröffentlichten Daten deuten darauf hin, dass dies unter Konservierungsbedingungen noch kritischer zu sehen ist. In metabolisch aktiveren Parenchymzellen könnte die kälteinduzierte mitochondriale Fragmentation demnach eine noch wichtigere Rolle spielen.

Jedoch ist das intakte Endothel für eine funktionierende Transplantation von besonderer Bedeutung. Endothelschäden führen zu Inflammation im transplantierten Gewebe und erhöhen Abstoßungsreaktionen [3, 41].

Die kälteinduzierte mitochondriale Fragmentation ist im Gesamtorgan bisher kaum untersucht worden. Es gibt lediglich erste Hinweise, dass die Fragmentation im Organ ebenfalls auftritt [74]. In den meisten Arbeiten wird die Mitochondrienlänge allerdings durch Transmissions-elektronenmikroskopie ermittelt [74, 97, 98]. Wegen der schmalen Schnittebene kann durch diese Methode nicht zweifelsfrei die Länge von Mitochondrien bestimmt werden. Dennoch wurde die kälteinduzierte Fragmentation bereits im Gewebemodell [42] und in Lungenschnitten

der Ratte beobachtet (Schwan, D., unveröffentlichte Daten). Außerdem gab es nach Veröffentlichung von Publikation 1 und 2 erste Hinweise darauf, dass auch in anderen Zelltypen ein möglicher DRP1-*unabhängiger* Mechanismus für die kälteinduzierte mitochondriale Fragmentation verantwortlich ist (unveröffentlichte Daten).

Besonders die Ergebnisse von Publikation 1 sollten als Grundlage für Untersuchungen am chloridarmen Modell dienen, bei dem die kälteinduzierte mitochondriale Fragmentation noch viel wichtiger ist. Die Untersuchungen zum Auftreten und zum Mechanismus wurden im physiologischen Modell durchgeführt, aber die Konservierungslösungen im klinischen Einsatz sind chloridarm zusammengesetzt [44]. Auch hier deuten erste Hinweise darauf hin, dass chloridarme Bedingungen nicht nur im Endothel, sondern auch in anderen Zelltypen schlechtere Ergebnisse zeigen (unveröffentlichte Daten).

Abschließend lässt sich sagen, dass die kälteinduzierte mitochondriale Fragmentation von hohem Interesse für die Transplantationsmedizin ist und weiterer Forschung bedarf.

6 Ausblick

Die Untersuchung der kälteinduzierten mitochondrialen Fragmentation sollte auf andere Zelltypen erweitert werden. Auch die Übertragung auf das Gesamtorgan durch Untersuchungen an Geweben, Organoiden oder im Tiermodell wäre wichtig.

Inhaltlich wäre es sinnvoll, Möglichkeiten zur Hemmung der Fragmentation zu ermitteln. Wenn das nicht erforderlich ist, weil in der Kälte nur wenig ATP benötigt wird, sollte die Re-Fusion in der Erwärmung unterstützt werden. Denkbar wäre die Verhinderung der OPA1-Prozessierung durch einen Hemmstoff von OMA1, der aktuell noch nicht existiert. Durch die gehemmte OPA1-Spaltung würden die Mitochondrien in der Wärme re-fusionieren können und somit schneller Energie für Reparaturprozesse zur Verfügung stellen. Dadurch könnte die Organqualität für die Transplantation und somit das Organ-, aber auch das Empfängerüberleben verbessert werden.

7 Zusammenfassung

Organe werden für die Transplantation unter hypothermen Bedingungen transportiert. Es wurde beobachtet, dass Mitochondrien eine erhöhte Fission aufweisen, wenn Zellen unter kalten Bedingungen inkubiert werden. Das genaue Auftreten und der Mechanismus hinter dieser kälteinduzierten mitochondrialen Fragmentation waren jedoch bisher nicht bekannt. Auch die Reversibilität der kälteinduzierten Fission wurden bisher nicht untersucht. In dieser Arbeit sollte die kälteinduzierte mitochondriale Fragmentation und ihr Mechanismus charakterisiert werden, sowie die Reversibilität vor dem Hintergrund der Rekonditionierung untersucht werden.

Kultivierte Schweineortenendothelzellen wurden dafür in Krebs-Henseleit-Puffer mit Glukose und Deferoxamin unter Hypothermie (4°C) inkubiert. Während der Kaltinkubation wurde die mitochondriale Morphologie, Funktion und die zugrundeliegenden proteinbiochemischen Prozesse untersucht. Die Zellen wurden bei verschiedenen Temperaturen wiedererwärmt und die Mitochondrien morphologisch und funktionell untersucht.

Eine verstärkte mitochondriale Fission trat bereits nach 3 h bei 4 °C und bei Temperaturen unter 15 °C auf und auch der ATP-Gehalt sank in der Kälte deutlich ab. DRP1, das Schlüsselenzym der Fission, wies einen konstanten Proteingehalt über die Dauer der Kaltinkubation auf. Die hochregulierten Phosphorylierungsstellen von DRP1, die Analyse der Lokalisierung und die Inkubation mit dem Inhibitor Mdivi-1 lassen auf einen möglichen DRP1-unabhängigen Prozess bei der kälteinduzierten mitochondrialen Fragmentation schließen.

Die Fragmentation war grundsätzlich reversibel, allerdings war erst ab 21 °C Erwärmung eine Re-Fusion der Mitochondrien zu erkennen, die mit steigender Wiedererwärmungstemperatur stärker ausfiel. Auch der ATP-Gehalt der Zellen stieg erst bei einer Wiedererwärmung auf 21 °C wieder an. Die metabolische Aktivität und die Fähigkeit, Wunden im Endothel zu schließen, waren bei höheren Temperaturen ebenfalls stärker ausgeprägt.

Zusammenfassend tritt die kälteinduzierte mitochondriale Fragmentation früh auf, geht mit einem ATP-Abfall einher und ist mechanistisch komplex. Rekonditionierungstemperaturen von mindestens 21 °C, besser 30 °C oder 37 °C sind empfehlenswert. Eine weitere Charakterisierung des Mechanismus ist erforderlich und könnte Ansätze zur Optimierung der Kaltlagerung von Organen und einer Verbesserung der Organqualität bieten.

8 Summary

Organs are transported for transplantation under hypothermic conditions. It has been observed that mitochondria show increased fission when cells are incubated under hypothermic conditions. However, the exact occurrence and mechanism behind this cold-induced mitochondrial fission are still unknown. The reversibility of cold-induced mitochondrial fission has also not yet been characterized. The aim of this study was to characterize cold-induced mitochondrial fission and its mechanisms and to examine its reversibility in the context of reconditioning.

Cultured porcine aortic endothelial cells were therefore incubated under hypothermia (4 °C) in Krebs-Henseleit buffer containing glucose and deferoxamine. Mitochondrial morphology and function were examined during and after cold incubation along with the associated proteins. Cells were rewarmed at different temperatures and mitochondria were likewise examined morphologically and functionally.

Enhanced mitochondrial fission occurred after only 3 hours at 4 °C and at temperatures below 15 °C, and ATP content decreased considerably in the cold. DRP1, the key enzyme of fission, exhibited a constant protein level over the duration of cold incubation. However, upregulated levels of both activating and inactivating phosphorylation of DRP1 were observed. Analysis of the localization of DRP1 and incubation with the inhibitor Mdivi-1 suggest a possible DRP1-independent process in cold-induced mitochondrial fission.

This fission was generally reversible, but re-fusion of mitochondria was only evident from 21°C warming onwards, and was more pronounced with increased rewarming temperature. The ATP content of the cells also only increased again after rewarming to 21 °C. Metabolic activity and the ability to close wounds in the endothelium were also more pronounced at higher temperatures.

In summary, cold-induced mitochondrial fragmentation occurs early, is accompanied by ATP depletion, and is mechanistically complex. Reconditioning temperatures of min 21 °C, better 30 °C or 37 °C are recommended. Further characterisation of the mechanism is required and could provide approaches to optimize cold storage of organs and improve organ quality.

9 Literatur

1. Eurotransplant. *Annual Report 2021*. 2021 [zitiert Nov. 2023].
2. Yeung, J.C., Cypel, M., Waddell, T.K., van Raemdonck, D., and Keshavjee, S., Update on donor assessment, resuscitation, and acceptance criteria, including novel techniques – non-heart-beating donor lung retrieval and ex vivo donor lung perfusion. *Thorac Surg Clin*, 2009. 19(2): 261-274.
3. Rauen, U. and de Groot, H., New insights into the cellular and molecular mechanisms of cold storage injury. *J Investig Med*, 2004. 52(5): 299-309.
4. Rauen, U. and de Groot, H., Inherent toxicity of organ preservation solutions to cultured hepatocytes. *Cryobiology*, 2008. 56(1): 88-92.
5. Rauen, U., Kerkweg, U., and de Groot, H., Iron-dependent vs. iron-independent cold-induced injury to cultured rat hepatocytes: A comparative study in physiological media and organ preservation solutions. *Cryobiology*, 2007. 54(1): 77-86.
6. Fingas, C.D., Wu, S., Gu, Y., Wohlschlaeger, J., Scherag, A., Dahmen, U., Paul, A., de Groot, H., and Rauen, U., Assessment of a chloride-poor versus a chloride-containing version of a modified histidine-tryptophan-ketoglutarate solution in a rat liver transplantation model. *Liver Transpl*, 2011. 17(6): 650-660.
7. Rauen, U. and Paul, A., Transportschäden von Transplantaten. *Unikate*, 2013. 44: 92-105.
8. Jing, L., Yao, L., Zhao, M., Peng, L.P., and Liu, M., Organ preservation: From the past to the future. *Acta Pharmacol Sin*, 2018. 39(5): 845-857.
9. Maathuis, M.H., Leuvenink, H.G., and Ploeg, R.J., Perspectives in organ preservation. *Transplantation*, 2007. 83(10): 1289-1298.
10. Fuhrmann, D.C. and Brune, B., Mitochondrial composition and function under the control of hypoxia. *Redox Biol*, 2017. 12: 208-215.
11. Fernandez, A.R., Sanchez-Tarjuelo, R., Cravedi, P., Ochando, J., and Lopez-Hoyos, M., Review: Ischemia reperfusion injury – a translational perspective in organ transplantation. *Int J Mol Sci*, 2020. 21(22): 8549.
12. Marchi, S., Patergnani, S., Missiroli, S., Morciano, G., Rimessi, A., Wieckowski, M.R., Giorgi, C., and Pinton, P., Mitochondrial and endoplasmic reticulum calcium homeostasis and cell death. *Cell Calcium*, 2018. 69: 62-72.
13. Li, C. and Jackson, R.M., Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002. 282(2): C227-41.
14. Granger, D.N. and Kvietys, P.R., Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol*, 2015. 6: 524-551.
15. Behn, C., Araneda, O.F., Llanos, A.J., Celedon, G., and Gonzalez, G., Hypoxia-related lipid peroxidation: evidences, implications and approaches. *Respir Physiol Neurobiol*, 2007. 158(2-3): 143-150.
16. Wu, W.Y., Li, Y.D., Cui, Y.K., Wu, C., Hong, Y.X., Li, G., Wu, Y., Jie, L.J., et al., The Natural Flavone Acacetin Confers Cardiomyocyte Protection Against Hypoxia/Reoxygenation Injury via AMPK-Mediated Activation of Nrf2 Signaling Pathway. *Front Pharmacol*, 2018. 9: 497.
17. Salahudeen, A.K., Cold ischemic injury of transplanted kidneys: New insights from experimental studies. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004. 287(2): F181-7.
18. Rauen, U., Kerkweg, U., Weisheit, D., Petrat, F., Sustmann, R., and de Groot, H., Cold-induced apoptosis of hepatocytes: Mitochondrial permeability transition triggered by nonmitochondrial chelatable iron. *Free Radic Biol Med*, 2003. 35(12): 1664-1678.

-
19. Rauen, U., Petrat, F., Li, T., and de Groot, H., Hypothermia injury/cold-induced apoptosis – evidence of an increase in chelatable iron causing oxidative injury in spite of low O₂⁻/H₂O₂ formation. *FASEB J*, 2000. 14(13): 1953-1964.
 20. Rauen, U., Polzar, B., Stephan, H., Mannherz, H.G., and de Groot, H., Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *FASEB J*, 1999. 13(1): 155-168.
 21. Kerkweg, U., Jacob, M., de Groot, H., Mannherz, H.G., and Rauen, U., Cold-induced apoptosis of rat liver endothelial cells: Contribution of mitochondrial alterations. *Transplantation*, 2003. 76(3): 501-508.
 22. Kerkweg, U., Li, T., de Groot, H., and Rauen, U., Cold-induced apoptosis of rat liver cells in University of Wisconsin solution: The central role of chelatable iron. *Hepatology*, 2002. 35(3): 560-567.
 23. Hoyer, D.P., Benko, T., Gallinat, A., Lefering, R., Kathes, M., Kribben, A., Korth, J., Rauen, U., et al., HTK-N as a new preservation solution for human kidney preservation: Results of a pilot randomized controlled clinical phase II trial in living donor transplantation. *Clin Transplant*, 2022. 36(3): e14543.
 24. Mohr, A., Brockmann, J.G., and Becker, F., HTK-N: Modified Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate solution – a promising new tool in solid organ preservation. *Int J Mol Sci*, 2020. 21(18): 6468.
 25. Lopez-Martinez, S., Simon, C., and Santamaria, X., Normothermic Machine Perfusion Systems: Where Do We Go From Here? *Transplantation*, 2024. 108(1): 22-44.
 26. Verhoeven, C.J., Farid, W.R., de Jonge, J., Metselaar, H.J., Kazemier, G., and van der Laan, L.J., Biomarkers to assess graft quality during conventional and machine preservation in liver transplantation. *J Hepatol*, 2014. 61(3): 672-684.
 27. Moers, C., Smits, J.M., Maathuis, M.H., Treckmann, J., van Gelder, F., Napieralski, B.P., van Kasterop-Kutz, M., van der Heide, J.J., et al., Machine perfusion or cold storage in deceased-donor kidney transplantation. *N Engl J Med*, 2009. 360(1): 7-19.
 28. van Rijn, R., Schurink, I.J., de Vries, Y., van den Berg, A.P., Cortes Cerisuelo, M., Darwish Murad, S., Erdmann, J.I., Gilbo, N., et al., Hypothermic machine perfusion in liver transplantation - a randomized trial. *N Engl J Med*, 2021. 384(15): 1391-1401.
 29. Petrenko, A., Carnevale, M., Somov, A., Osorio, J., Rodriguez, J., Guibert, E., Fuller, B., and Froghi, F., Organ preservation into the 2020s: The era of dynamic intervention. *Transfus Med Hemother*, 2019. 46(3): 151-172.
 30. Nicholson, M.L. and Hosgood, S.A., Renal transplantation after ex vivo normothermic perfusion: The first clinical study. *Am J Transplant*, 2013. 13(5): 1246-1252.
 31. Panconesi, R., Flores Carvalho, M., Dondossola, D., Muiesan, P., Dutkowski, P., and Schlegel, A., Impact of machine perfusion on the immune response after liver transplantation – a primary treatment or just a delivery tool. *Front Immunol*, 2022. 13: 855263.
 32. Eshmuminov, D., Leoni, F., Schneider, M.A., Becker, D., Muller, X., Onder, C., Hefti, M., Schuler, M.J., et al., Perfusion settings and additives in liver normothermic machine perfusion with red blood cells as oxygen carrier. A systematic review of human and porcine perfusion protocols. *Transpl Int*, 2018. 31(9): 943-1054.
 33. Hoyer, D.P., Paul, A., Luer, S., Reis, H., Efferz, P., and Minor, T., End-ischemic reconditioning of liver allografts: Controlling the rewarming. *Liver Transpl*, 2016. 22(9): 1223-1230.
 34. Weissenbacher, A., Vrakas, G., Nasralla, D., and Ceresa, C.D.L., The future of organ perfusion and re-conditioning. *Transpl Int*, 2019. 32(6): 586-597.
 35. Rosso, L., Zanella, A., Righi, I., Barilani, M., Lazzari, L., Scotti, E., Gori, F., and Mendogni, P., Lung transplantation, ex-vivo reconditioning and regeneration: State of the art and perspectives. *J Thorac Dis*, 2018. 10(Suppl 20): S2423-S2430.

36. Minor, T. and von Horn, C., Rewarming injury after cold preservation. *Int J Mol Sci*, 2019. 20(9): 2059.
37. Pless-Petig, G., Walter, B., Bienholz, A., and Rauen, U., Mitochondrial impairment as a key factor for the lack of attachment after cold storage of hepatocyte suspensions. *Cell Transplant*, 2017. 26(12): 1855-1867.
38. Kirste, G., Cold but not too cold: advances in hypothermic and normothermic organ perfusion. *Korean J Transplant*, 2022. 36(1): 2-14.
39. Zulpaite, R., Miknevičius, P., Leber, B., Strupas, K., Stiegler, P., and Schemmer, P., Ex-vivo Kidney Machine Perfusion: Therapeutic Potential. *Front Med (Lausanne)*, 2021. 8: 808719.
40. Bath, M.F., Hosgood, S.A., and Nicholson, M.L., Vasoreactivity to acetylcholine during porcine kidney perfusion for the assessment of ischemic injury. *J Surg Res*, 2019. 238: 96-101.
41. Nordling, S., Brannstrom, J., Carlsson, F., Lu, B., Salvaris, E., Wanders, A., Buijs, J., Estrada, S., et al., Enhanced protection of the renal vascular endothelium improves early outcome in kidney transplantation: Preclinical investigations in pig and mouse. *Sci Rep*, 2018. 8(1): 5220.
42. Wille, T., Optimierung der kalten Lagerung von Blutgefäßen, Institut für Physiologische Chemie, Universität Duisburg-Essen, Essen, 2009.
43. Wille, T., de Groot, H., and Rauen, U., Improvement of the cold storage of blood vessels with a vascular preservation solution. Study in porcine aortic segments. *J Vasc Surg*, 2008. 47(2): 422-431.
44. de Sousa, S.G., Nascimento da Silva, G.V., Costa Rodrigues, A.M., Meireles Fernandes da Silva, T.M., Costa, F.C., Freitas Teixeira da Silva, A., Santana de Macedo, B.F., and Brito, M.V.H., Organ preservation solutions in transplantation: A literature review. *Exp Clin Transplant*, 2021. 19(6): 511-521.
45. Parente, A., Flores Carvalho, M., and Schlegel, A., Endothelial cells and mitochondria: Two key players in liver transplantation. *Int J Mol Sci*, 2023. 24(12): 10091.
46. Giacomello, M., Pyakurel, A., Glytsou, C., and Scorrano, L., The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020. 21(4): 204-224.
47. Bauer, T.M. and Murphy, E., Role of mitochondrial calcium and the permeability transition pore in regulating cell death. *Circ Res*, 2020. 126(2): 280-293.
48. Adebayo, M., Singh, S., Singh, A.P., and Dasgupta, S., Mitochondrial fusion and fission: The fine-tune balance for cellular homeostasis. *FASEB J*, 2021. 35(6): e21620.
49. Pernas, L. and Scorrano, L., Mito-morphosis: Mitochondrial fusion, fission, and cristae remodeling as key mediators of cellular function. *Annu Rev Physiol*, 2016. 78: 505-31.
50. Fenton, A.R., Jongens, T.A., and Holzbaur, E.L.F., Mitochondrial dynamics: Shaping and remodeling an organelle network. *Curr Opin Cell Biol*, 2021. 68: 28-36.
51. Zerihun, M., Sukumaran, S., and Qvit, N., The Drp1-Mediated Mitochondrial Fission Protein Interactome as an Emerging Core Player in Mitochondrial Dynamics and Cardiovascular Disease Therapy. *Int J Mol Sci*, 2023. 24(6).
52. Sabouny, R. and Shutt, T.E., Reciprocal regulation of mitochondrial fission and fusion. *Trends Biochem Sci*, 2020. 45(7): 564-577.
53. Wikstrom, J.D., Mahdavian, K., Liesa, M., Sereda, S.B., Si, Y., Las, G., Twig, G., Petrovic, N., et al., Hormone-induced mitochondrial fission is utilized by brown adipocytes as an amplification pathway for energy expenditure. *EMBO J*, 2014. 33(5): 418-436.
54. Kraus, F., Roy, K., Pucadyil, T.J., and Ryan, M.T., Function and regulation of the divisome for mitochondrial fission. *Nature*, 2021. 590(7844): 57-66.

-
55. Chang, C.R. and Blackstone, C., Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1. *Ann N Y Acad Sci*, 2010. 1201: 34-39.
 56. Roe, A.J. and Qi, X., Drp1 phosphorylation by MAPK1 causes mitochondrial dysfunction in cell culture model of Huntington's disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018. 496(2): 706-711.
 57. Chang, C.R. and Blackstone, C., Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology. *J Biol Chem*, 2007. 282(30): 21583-21587.
 58. Loson, O.C., Song, Z., Chen, H., and Chan, D.C., Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Mol Biol Cell*, 2013. 24(5): 659-667.
 59. Friedman, J.R., Lackner, L.L., West, M., DiBenedetto, J.R., Nunnari, J., and Voeltz, G.K., ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science*, 2011. 334(6054): 358-362.
 60. Al Ojaimi, M., Salah, A., and El-Hattab, A.W., Mitochondrial fission and fusion: molecular mechanisms, biological functions, and related disorders. *Membranes (Basel)*, 2022. 12(9): 893.
 61. Gao, S. and Hu, J., Mitochondrial fusion: The machineries in and out. *Trends Cell Biol*, 2021. 31(1): 62-74.
 62. van der Blik, A.M., Shen, Q., and Kawajiri, S., Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2013. 5(6): a011072.
 63. Gilkerson, R., De La Torre, P., and St Vallier, S., Mitochondrial OMA1 and OPA1 as gatekeepers of organellar structure/function and cellular stress response. *Front Cell Dev Biol*, 2021. 9: 626117.
 64. Wang, R., Mishra, P., Garbis, S.D., Moradian, A., Sweredoski, M.J., and Chan, D.C., Identification of new OPA1 cleavage site reveals that short isoforms regulate mitochondrial fusion. *Mol Biol Cell*, 2021. 32(2): 157-168.
 65. Song, Z., Chen, H., Fiket, M., Alexander, C., and Chan, D.C., OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *J Cell Biol*, 2007. 178(5): 749-755.
 66. Zhang, K., Li, H., and Song, Z., Membrane depolarization activates the mitochondrial protease OMA1 by stimulating self-cleavage. *EMBO Rep*, 2014. 15(5): 576-585.
 67. Anand, R., Wai, T., Baker, M.J., Kladt, N., Schauss, A.C., Rugarli, E., and Langer, T., The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. *J Cell Biol*, 2014. 204(6): 919-929.
 68. Ohba, Y., MacVicar, T., and Langer, T., Regulation of mitochondrial plasticity by the i-AAA protease YME1L. *Biol Chem*, 2020. 401(6-7): 877-890.
 69. Rauen, U., Kerkweg, U., Wusteman, M.C., and de Groot, H., Cold-induced injury to porcine corneal endothelial cells and its mediation by chelatable iron – implications for corneal preservation. *Cornea*, 2006. 25(1): 68-77.
 70. Pless, G., Sauer, I.M., and Rauen, U., Improvement of the cold storage of isolated human hepatocytes. *Cell Transplant*, 2012. 21(1): 23-37.
 71. Hendriks, K.D.W., Lupi, E., Hardenberg, M.C., Hoogstra-Berends, F., Deelman, L.E., and Henning, R.H., Differences in mitochondrial function and morphology during cooling and rewarming between hibernator and non-hibernator derived kidney epithelial cells. *Sci Rep*, 2017. 7(1): 15482.
 72. Quiring, L., Walter, B., Lohaus, N., Schwan, D., Rech, A., Dlugos, A., and Rauen, U., Characterisation of cold-induced mitochondrial fission in porcine aortic endothelial cells. *Mol Med*, 2022. 28(1): 13.

73. Quiring, L., Caponi, L., Schwan, D., Rech, A., and Rauen, U., Recovery from cold-induced mitochondrial fission in endothelial cells requires reconditioning temperatures of ≥ 25 °C. *Front Transplant*, 2022. 1: 1044551.
74. Parajuli, N., Shrum, S., Tobacyk, J., Harb, A., Arthur, J.M., and MacMillan-Crow, L.A., Renal cold storage followed by transplantation impairs expression of key mitochondrial fission and fusion proteins. *PLoS One*, 2017. 12(10): e0185542.
75. Giraud, S., Steichen, C., Couturier, P., Tillet, S., Mallet, V., Coudroy, R., Goujon, J.M., Hannaert, P., and Hauet, T., Influence of hypoxic preservation temperature on endothelial cells and kidney integrity. *Biomed Res Int*, 2019. 2019: 8572138.
76. Bienholz, A., Walter, B., Pless-Petig, G., Guberina, H., Kribben, A., Witzke, O., and Rauen, U., Characterization of injury in isolated rat proximal tubules during cold incubation and rewarming. *PLoS One*, 2017. 12(7): e0180553.
77. Zhang, W., Chen, Y., Yang, Q., Che, H., Chen, X., Yao, T., Zhao, F., Liu, M., et al., Mitofusin-2 protects against cold stress-induced cell injury in HEK293 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. 397(2): 270-276.
78. Funk, J.A. and Schnellmann, R.G., Persistent disruption of mitochondrial homeostasis after acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2012. 302(7): F853-64.
79. Ahmad, T., Aggarwal, K., Pattnaik, B., Mukherjee, S., Sethi, T., Tiwari, B.K., Kumar, M., Micheal, A., et al., Computational classification of mitochondrial shapes reflects stress and redox state. *Cell Death Dis.*, 2013. 4: e461.
80. Toyama, E.Q., Herzig, S., Courchet, J., Lewis, T.L., Jr., Loson, O.C., Hellberg, K., Young, N.P., Chen, H., et al., Metabolism. AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress. *Science*, 2016. 351(6270): 275-281.
81. Liu, X. and Hajnoczky, G., Altered fusion dynamics underlie unique morphological changes in mitochondria during hypoxia-reoxygenation stress. *Cell Death Differ*, 2011. 18(10): 1561-1572.
82. Knoop, S., Untersuchungen zur Beteiligung der Lysosomen und des Cytoskeletts an der kälteinduzierten Zell- und Gewebeschädigung., Institut für Physiologische Chemie, Universität Duisburg-Essen, Essen, 2011.
83. Liesa, M. and Shirihai, O.S., Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab*, 2013. 17(4): 491-506.
84. Cassidy-Stone, A., Chipuk, J.E., Ingerman, E., Song, C., Yoo, C., Kuwana, T., Kurth, M.J., Shaw, J.T., et al., Chemical inhibition of the mitochondrial division dynamin reveals its role in Bax/Bak-dependent mitochondrial outer membrane permeabilization. *Dev. Cell*, 2008. 14(2): 193-204.
85. Smith, G. and Gallo, G., To mdivi-1 or not to mdivi-1: Is that the question? *Dev. Neurobiol.*, 2017. 77(11): 1260-1268.
86. Zhou, H., Hu, S., Jin, Q., Shi, C., Zhang, Y., Zhu, P., Ma, Q., Tian, F., and Chen, Y., Mff-dependent mitochondrial fission contributes to the pathogenesis of cardiac microvasculature ischemia/reperfusion injury via induction of mROS-mediated cardiolipin oxidation and HK2/VDAC1 disassociation-involved mPTP opening. *J Am Heart Assoc*, 2017. 6(3): e005328.
87. Zhou, H., Wang, J., Zhu, P., Zhu, H., Toan, S., Hu, S., Ren, J., and Chen, Y., NR4A1 aggravates the cardiac microvascular ischemia reperfusion injury through suppressing FUNDC1-mediated mitophagy and promoting Mff-required mitochondrial fission by CK2alpha. *Basic Res Cardiol*, 2018. 113(4): 23.
88. Roy, M., Itoh, K., Iijima, M., and Sesaki, H., Parkin suppresses Drp1-independent mitochondrial division. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016. 475(3): 283-288.
89. Yamashita, S.I., Jin, X., Furukawa, K., Hamasaki, M., Nezu, A., Otera, H., Saigusa, T., Yoshimori, T., et al., Mitochondrial division occurs concurrently with autophagosome

-
- formation but independently of Drp1 during mitophagy. *J Cell Biol*, 2016. 215(5): 649-665.
90. Ryu, S.W., Jeong, H.J., Choi, M., Karbowski, M., and Choi, C., Optic atrophy 3 as a protein of the mitochondrial outer membrane induces mitochondrial fragmentation. *Cell Mol Life Sci*, 2010. 67(16): 2839-2850.
 91. Dimmer, K.S., Navoni, F., Casarin, A., Trevisson, E., Endeley, S., Winterpacht, A., Salviati, L., and Scorrano, L., LETM1, deleted in Wolf-Hirschhorn syndrome is required for normal mitochondrial morphology and cellular viability. *Hum Mol Genet*, 2008. 17(2): 201-214.
 92. McLelland, G.L., Soubannier, V., Chen, C.X., McBride, H.M., and Fon, E.A., Parkin and PINK1 function in a vesicular trafficking pathway regulating mitochondrial quality control. *EMBO J*, 2014. 33(4): 282-295.
 93. Wai, T. and Langer, T., Mitochondrial dynamics and metabolic regulation. *Trends Endocrinol Metab*, 2016. 27(2): 105-117.
 94. Lohaus, N., Untersuchungen zu den Mechanismen der kälteinduzierten mitochondrialen Fragmentation und gestörten Mitochondrienfusion unter chloridarmen Bedingungen, Institut für Physiologische Chemie, Universität Duisburg-Essen, Essen, 2019.
 95. Lappalainen, P., Kotila, T., Jegou, A., and Romet-Lemonne, G., Biochemical and mechanical regulation of actin dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022. 23(12): 836-852.
 96. Noll, T., Wissemann, P., Mertens, S., Krutzfeldt, A., Spahr, R., and Piper, H.M., Hypoxia tolerance of coronary endothelial cells. *Adv Exp Med Biol*, 1990. 277: 467-476.
 97. Zhu, J., Zhang, G., Song, Z., Xiang, X., Shu, S., Liu, Z., Yang, D., Wei, Q., and Dong, Z., Protein kinase C-delta mediates kidney tubular injury in cold storage-associated kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*, 2020. 31(5): 1050-1065.
 98. Huang, J., Xie, P., Dong, Y., and An, W., Inhibition of Drp1 SUMOylation by ALR protects the liver from ischemia-reperfusion injury. *Cell Death Differ*, 2021. 28(4): 1174-1192.

10 Danksagung

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. Ursula Rauen, die mir diese Arbeit ermöglicht hat und mich über die gesamte Zeit eng begleitet hat. Immer ansprechbar und stets mit hilfreichen Ratschlägen war sie eine gute Mentorin für diese intensive Phase meiner wissenschaftlichen Ausbildung. Ich danke für ihre Anregungen und die vielen Dinge, die ich gelernt habe.

Außerdem danke ich Prof. Dr. Christian Mayer für die Übernahme des Zweitgutachtens und die interessanten Gespräche in Xanten von der Entstehung des Lebens bis zur künstlichen Intelligenz.

Auch Prof. Dr. Sabrina Disch möchte ich für die Übernahme des Vorsitzes herzlich danken.

Während meiner Arbeit habe ich durch meine Kolleginnen und Kollegen vom Institut für Physiologische Chemie immer viel Unterstützung erhalten. Ohne die unvergleichliche Arbeitsgruppe hätte ich die Arbeiten nicht in dieser Art leisten können. Die wertvollen Beziehungen, die ich mit meinen Kolleginnen und Kollegen aufgebaut habe, sind ein wichtiger Teil meines beruflichen Erfolgs, und ich bin dankbar für die Freundschaft und Unterstützung, die sie mir entgegengebracht haben.

Dabei danke ich Dr. Björn Walter, Dr. Gesine Pless-Petig und Dr. Dhanusha Schwan für die enge Zusammenarbeit und die wunderbare Atmosphäre bei der Arbeit. Der Austausch, auch wenn nicht immer fachlich, hat meine Motivation in großem Maße gestärkt um diese Arbeit zu verwirklichen.

Für die Einarbeitung und die vorangegangenen Experimente, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, bedanke ich mich bei Dr. Anja Rech und Dr. Niklas Lohaus.

Ich danke Lucas Grebe, Jelena Weiß, Sami Jafoui, Simon Ehleben, Luisa Caponi, Jana Westhues und Kristina Urban für ihren Beitrag zur fröhlichen Arbeitsatmosphäre innerhalb der Arbeitsgruppe und darüber hinaus für die Hilfe im Labor.

Meine Danksagung gilt auch meinen neuen Kolleginnen und Kollegen, die immer Verständnis für meine Doppelbelastung hatten und mir stets den Rücken freihielten.

Dank auch den vielen ungenannten, die mich in dieser Phase begleitet haben.

11 Erklärung

Characterisation of cold-induced mitochondrial fission in porcine aortic endothelial cells

Leonard Quiring, Björn Walter, Niklas Lohaus, Dhanusha Schwan, Anja Rech, Andrea Dlugos und Ursula Rauen

Die Publikation wurde maßgeblich durch Prof. Ursula Rauen konzipiert. In frühen Konzeptionsphasen der Publikation waren Dr. Niklas Lohaus und Dr. Anja Rech beteiligt. Das finale Konzept wurde durch Prof. Ursula Rauen und Leonard Quiring angepasst und finalisiert.

Die Experimente und die Datenanalysen sowie die statistische Analyse für Abbildungen 2, 3, 7, 8 und 10 wurden komplett durch Leonard Quiring durchgeführt. Die in Abbildung 1 und 4 dargestellten Experimente hat Leonard Quiring zu großen Teilen durchgeführt. Bei der Erhebung der Daten für Abbildungen 5, 6 und 9 war Leonard Quiring bei der Planung und Auswertung beteiligt.

Die Manuskripterstellung wurde unter Betreuung von Prof. Ursula Rauen durch Leonard Quiring durchgeführt. Die Manuskriptüberarbeitung wurde durch Leonard Quiring und Prof. Ursula Rauen mit kritischer Durchsicht aller Koautoren durchgeführt.

Recovery from cold-induced mitochondrial fission in endothelial cells requires reconditioning temperatures of ≥ 25 °C

Leonard Quiring, Luisa Caponi, Dhanusha Schwan, Anja Rech und Ursula Rauen

Das Konzept zur Publikation wurde maßgeblich durch Prof. Ursula Rauen erstellt. Leonard Quiring wurde in den Prozess einbezogen und konnte sich aktiv beteiligen.

Die Experimente für Abbildungen 4 und 5 sowie Tabelle 1 und 2 wurden komplett durch Leonard Quiring durchgeführt. Bei der Datenerhebung zu Abbildungen 1, 2, 3 und 6 hat Leonard Quiring große Teile durchgeführt und war bei Planung und Auswertung maßgeblich beteiligt. Die Datenanalyse und statistische Analyse wurde durch Leonard Quiring durchgeführt.

Die Manuskripterstellung und die Überarbeitung des Manuskripts wurden durch Leonard Quiring und Prof. Ursula Rauen unter Rücksprache mit allen Koautoren durchgeführt.