

Aus der Klinik für angeborene Herzfehler und Kinderkardiologie
des Deutschen Herzzentrum Berlin

DISSERTATION

Hypothermie zur Kardioprotektion:
Einfluss therapeutischer Hypothermie während simulierter
Ischämie/Reperfusion auf HL-1 Zellen und primäre
Kardiomyozyten

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jana Krech

aus Kaiserslautern

Datum der Promotion: 01.03.2019

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	6
Abstrakt	7
Abstract	9
1 Einleitung	11
1.1 Ischämie/Reperfusion des Myokards	11
1.1.1 Klinischer Hintergrund	11
1.1.2 Pathomechanismen des Ischämie-/Reperfusionsschadens.....	12
1.2 Therapeutische Hypothermie	15
1.2.1 Anwendungsgebiete	16
1.2.2 Therapeutische Hypothermie und Kardioprotektion	17
1.3 Wirkungen der Hypothermie	18
1.3.1 Zellulärer Stoffwechsel	18
1.3.2 Oxidativer Stress	19
1.3.3 Mitochondriale Dysfunktion und intrinsische Apoptose	19
1.3.4 Autophagie	22
1.4 Ziele der Arbeit	24
2 Materialien	25
2.1 Geräte	25
2.2 Zellkultur	25
2.3 Chemikalien	26
2.4 Antikörper	27
2.5 Kit	28
2.6 Sonstige Materialien	28
3 Methoden	29
3.1 Teil 1: Versuche mit HL-1 Zellen	29
3.1.1 Kultivierung der HL-1 Kardiomyozyten	29

3.1.2	Durchführung der Ischämie/Reperfusionen-Versuche.....	29
3.1.3	Mitochondriales Membranpotential.....	31
3.1.4	Western Blot.....	32
3.2	Teil 2: Versuche mit primären Kardiomyozyten	37
3.2.1	Isolierung und Kultivierung primärer Kardiomyozyten.....	37
3.2.2	Durchführung der Ischämie/Reperfusionen-Versuche.....	38
3.2.3	Bestimmung der Zellviabilität.....	38
3.3	Statistische Analyse.....	39
4	Ergebnisse	40
4.1	Teil 1: Hypothermie und HL-1 Kardiomyozyten.....	40
4.1.1	Einfluss auf mitochondriale Membranintegrität.....	40
4.1.2	Einfluss auf die Bcl-2 und Bax Proteinexpression	47
4.1.3	Einfluss auf die Hsp70 Proteinexpression.....	51
4.1.4	Einfluss auf Autophagie-Aktivität.....	53
4.2	Teil 2: Hypothermie und primäre Kardiomyozyten.....	54
4.2.1	Etablierung eines Zeit-Temperatur-Protokolls für primäre Kardiomyozyten	54
4.2.2	Einfluss der Hypothermie auf die Zellvitalität.....	55
5	Diskussion.....	57
5.1	Teil 1: Hypothermie und HL-1 Kardiomyozyten.....	57
5.1.1	Hypothermie und intrinsische Apoptose.....	57
5.1.2	Hypothermie und Autophagie	62
5.2	Teil 2: Hypothermie und primäre Kardiomyozyten.....	64
5.2.1	Limitationen der OGD/R-Versuche an HL-1 Zellen	64
5.2.2	Hypothermie und primäre Kardiomyozyten	65
5.3	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	65
6	Bibliographie.....	68
7	Eidesstattliche Versicherung	82
8	Lebenslauf.....	84
9	Publikationsliste	85
10	Danksagung	86

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ADP	Adenosindiphosphat
AIF	Apoptosis Inducing Factor
AMI	Akuter Myokardinfarkt
APS	Ammoniumpersulfat
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calcium-Ion
COX IV	Cytochrom c Oxidase IV
Cyt c	Cytochrom c
$\Delta\Psi_m$	Mitochondriales Membranpotential
FBS	Fetal Bovine Serum
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
HCL	Hydrogenchlorid/Salzsäure
HKS	HerzKreislaufstillstand
HL-1	Atriale Kardiomyozyten-Zelllinie der Maus
Hsp70	Heatshockprotein 70
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
IHK	Ischämische Herzkrankheit
IOTH	Intra-OGD Therapeutische Hypothermie
I/R	Ischämie/Reperfusion
K ⁺	Kalium-Ion
LC-3	Microtubule-associated protein 1 light chain 3
LDH	Laktatdehydrogenase
mPTP	Mitochondrial permeability transition pore
Na ⁺	Natrium-Ion

NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
OGD	Oxygen-glucose deprivation
PCI	Perkutane Katheterintervention
PVDF	Polyvinylidendifluorid
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TH	Therapeutische Hypothermie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline with Tween20
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTM	Targeted Temperature Management
WHO	World Health Organisation

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.	Schematische Darstellung der Regulation der intrinsischen Apoptose.	20
Abbildung 2.	Schematische Darstellung der Autophagie dysfunktionaler Mitochondrien (Mitophagie).	23
Abbildung 3.	Schema des Zeit-Temperatur-Protokolls.	30
Abbildung 4.	Schematische Darstellung der Mitochondrien Isolierung.	33
Abbildung 5.	Effekte der IOTH auf die zytosolische und mitochondriale Cyt c Expression.	42
Abbildung 6.	Effekte der IOTH auf die zytosolische und mitochondriale AIF Expression.	44
Abbildung 7.	Effekte der IOTH auf die mitochondriale Membranintegrität 1.	45
Abbildung 8.	Effekte der IOTH auf die mitochondriale Membranintegrität 2.	46
Abbildung 9.	Effekte der IOTH auf die Expression des pro-apoptotischen Bax.	48
Abbildung 10.	Effekte der IOTH auf die Expression des anti-apoptotischen Bcl-2.	50
Abbildung 11.	Effekte der IOTH auf die Expression von Hsp70.	52
Abbildung 12.	Effekte der IOTH auf die Expression von LC3-II.	53
Abbildung 13.	Etablierung eines Zeit-Temperatur-Protokolls für primäre Kardiomyozyten.	55
Abbildung 14.	Effekte der IOTH auf die Viabilität primärer Kardiomyozyten.	56
Abbildung 15.	Zusammenfassung der Wirkungsmechanismen der therapeutischen Hypothermie auf das Zellüberleben der HL-1 Kardiomyozyten	66

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.	Temperaturabhängige Definitionen der therapeutischer Hypothermie.	16
Tabelle 2.	Simulation der Ischämie und Reperfusion.	30
Tabelle 3.	Zusammensetzung der Versuchsmedien für HL-1 Zellen.	31
Tabelle 4.	Zusammensetzung der 15% Gele für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.	34
Tabelle 5.	Zusammensetzung des Elektrophorese- und Blotting-Puffers.	35
Tabelle 6.	Anwendung der verwendeten Antikörper.	36
Tabelle 7.	Zusammensetzung des Waschpuffers TBST und des Stripping-Puffers.	37
Tabelle 8.	Zusammensetzung der Versuchsmedien für primäre Kardiomyozyten.	38

Abstrakt

Einleitung: Die ischämische Herzkrankheit ist eine der häufigsten Todesursachen weltweit. Während sich die therapeutische Hypothermie (TH) bei ischämischen Ereignissen wie dem Herzkreislaufstillstand bei Erwachsenen oder der perinatalen Asphyxie als neuroprotektive Therapie etabliert hat, sind die kardioprotektiven Mechanismen der TH bisher nicht vollständig geklärt. Experimentelle Studien zeigen, dass TH den myokardialen Zelluntergang nach Ischämie/Reperfusion (I/R) vermindert, allerdings konnten klinische Studien diese Effekte nicht eindeutig nachweisen. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit die zellulären Mechanismen der intra-ischämischen TH (33,5 °C) an Kardiomyozyten untersucht. Dabei wurde zunächst der Einfluss der Hypothermie auf die Einleitung der mitochondrialen Apoptose an HL-1 Zellen analysiert. Im zweiten Teil der Arbeit wurde das Versuchsprotokoll auf primäre Kardiomyozyten übertragen.

Methoden: Die HL-1 Kardiomyozyten und die primären Kardiomyozyten wurden einer sechsstündigen simulierten Ischämie ausgesetzt, bei der die Zellen mit 0,2% Sauerstoff und Mangelmedium (ohne Glukose und ohne Serum) behandelt wurden. Anschließend wurde die Reperfusion simuliert, indem die Zellen bei 21% Sauerstoff und Vollmedium inkubiert wurden. Ein bis drei Stunden nach Beginn der simulierten Ischämie wurden die Kardiomyozyten auf 33,5 °C gekühlt. Für die Analyse der mitochondrialen Apoptose-Einleitung wurden mitochondriale und zytosolische Proteinfractionen gewonnen. Die mitochondriale Membranintegrität wurde sowohl mittels Western Blot- als auch mit Hilfe einer Fluoreszenzmikroskopischer-Analyse bestimmt. Hierfür wurden die pro-apoptotischen Proteine Cytochrom c, AIF und Bax untersucht und die intrazelluläre Verteilung von Cytochrom c mit der Verteilung der durch MitoTracker Red markierten Mitochondrien verglichen. Außerdem wurden die anti-apoptotischen Proteine Hsp70 und Bcl-2 sowie das Autophagie induzierende LC3-II mittels Western Blot-Analyse bestimmt. Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss der Kühlung auf die Viabilität primärer Kardiomyozyten anhand der Freisetzung von LDH und Troponin T untersucht.

Ergebnisse: Intra-ischämische TH verminderte den mitochondrialen Ausstrom der Apoptose-Induktoren Cytochrom c und AIF signifikant. Neben dem Erhalt der mitochondrialen Integrität kam es durch TH zu einer Regulation der anti-apoptotischen Proteine Hsp70 und Bcl-2. Außerdem konnte eine erhöhte Aktivität mitochondrialer

Autophagie in gekühlten Zellen beobachtet werden. Bei der Übertragung des Versuchsprotokolls auf primäre Kardiomyozyten konnte gezeigt werden, dass eine frühe Kühlung während der Ischämie die Viabilität der Zellen signifikant erhöhte.

Schlussfolgerung: Intra-ischämische TH aktivierte verschiedene Signaltransduktionswege, die zum Schutz des Mitochondriums während der Reperfusion beitrugen und die Einleitung der mitochondrialen Apoptose signifikant reduzierten. Insbesondere bei der Übertragung des Versuchsprotokolls auf primäre Kardiomyozyten wurde deutlich, dass der frühe Kühlungsbeginn die kardioprotektiven Effekte der Hypothermie entscheidend beeinflusst. Um die klinische Anwendung der Hypothermie zu etablieren, müssen zukünftige Studien die zellulären Effekte der Wiedererwärmung untersuchen.

Abstract

Objective: Ischemic heart disease is one of the leading causes of death worldwide. Although, Therapeutic Hypothermia (TH) is an established neuroprotective intervention in patients suffering from cardiac arrest or perinatal asphyxia its protective effects against myocardial ischemia reperfusion (I/R) injury remain to be elucidated. While experimental studies have observed a reduction in myocardial I/R injury due to TH, clinical studies have not been able to show this correlation. Therefore, the aim of this study was to investigate the cellular mechanisms induced by intra-ischemic moderate hypothermia (33.5 °C) in I/R-injured HL-1 cells, with a special focus on mitochondrial apoptosis induction during reperfusion. In order to investigate cardioprotective mechanisms more thoroughly, the protocol of intra-ischemic TH was transferred into a murine primary cardiomyocyte model.

Methods: Both HL-1 and primary cardiomyocytes were deprived of oxygen and glucose for 6 hours in glucose/serum-free starvation medium at 0.2% O₂. Intra-ischemic cooling was initiated after 1-3 hours of simulated ischemia. Reperfusion was simulated by incubation in complete supplemented medium and 21% O₂. Mitochondrial membrane integrity was assessed by Western blot analysis of the pro-apoptotic proteins cytochrome c, AIF and Bax. Furthermore, intracellular localization of cytochrome c was analyzed via immunofluorescence staining and mitochondria were labeled with MitoTracker Red. Moreover, anti-apoptotic Hsp70 and Bcl-2 as well as autophagic activity marker LC3-II were analyzed via Western blot analysis. Finally, the effects of intra-ischemic TH on primary cardiomyocytes viability were assessed by LDH and Troponin T releases.

Results: Intra-ischemic TH significantly attenuated the mitochondrial release of cytochrome c and AIF in HL-1 cardiomyocytes during reperfusion. Furthermore, TH promoted an anti-apoptotic effect as assessed by Bcl-2/Bax ratio and Hsp70 protein expression. Moreover, hypothermia induced mitochondrial autophagy during reperfusion. Lastly, intra-ischemic TH significantly increased primary cardiomyocytes viability when initiated one hour after exposure to simulated ischemia as seen in attenuated LDH and Troponin T releases.

Conclusion: Early initiation of TH activated multi-modal pathways protecting the mitochondria from I/R-injury. Mitochondria mediated apoptosis was significantly decreased in cardiomyocytes treated with TH. Furthermore, the translation of intra-

ischemic TH into a primary cardiomyocyte model emphasized the influence of time-temperature management for cardioprotection. In conclusion, early initiation of TH is crucial for achieving maximal protection against myocardial I/R-induced injury. In order to evaluate TH as a cardioprotective intervention, future studies need to explore the impact of rewarming on cell survival.

1 Einleitung

1.1 Ischämie/Reperfusion des Myokards

1.1.1 Klinischer Hintergrund

Die ischämische Herzkrankheit (IHK) gehört zu den führenden Todesursachen weltweit. Jedes Jahr sterben ungefähr 7,4 Millionen Menschen in Folge der IHK und der Anteil an der globalen Mortalität beträgt 13,2%. Die Bedeutung der ischämischen Herzkrankheit wird in Bezug auf Mortalität und die durch Behinderung eingeschränkte Lebensqualität immer größer. So belegte die IHK in den letzten Jahren den ersten Platz auf der Liste der WHO zum Global Disease Burden, während sie im Jahr 2000 noch an dritter Stelle stand [1].

Bei der IHK liegt eine Arteriosklerose der Koronararterien vor, die zu einer Minderperfusion des Myokards führen kann. Klinisch kommt es zu dem meist retrosternal lokalisierten Brustschmerz, der Angina Pectoris. Die stabile Angina Pectoris tritt nur unter vermehrter Belastung auf, während eine bereits in Ruhe oder erstmalig auftretende Angina Pectoris als instabil bezeichnet wird. Von einem Myokardinfarkt spricht man, wenn es durch die myokardiale Ischämie zu einem Zelluntergang kommt. Die Therapie des akuten Myokardinfarkts (AMI) beruht auf der möglichst schnellen Reperfusion des Infarktareals. Generell kann diese durch die perkutane Koronarintervention (PCI), eine Fibrinolyse oder durch eine Bypass-Operation erreicht werden. Um die Mortalität und Morbidität der Patienten während und nach dem Infarktgeschehen zu senken, wird die Gabe von Nitraten, Beta-Rezeptorblockern, ASS und ADP-Rezeptor Antagonisten als duale Plättchenhemmung sowie die Gabe von Statinen und ACE-Hemmern empfohlen [2, 3].

Zu den häufigen Komplikationen des AMI gehören Herzrhythmusstörungen und Erregungsleitungsstörungen, die vor allem in den ersten Stunden nach Infarktgeschehen auftreten können. Kammerflimmern kann bereits sehr früh auftreten und führt meist außerhalb des Krankenhauses zu einem Herzkreislaufstillstand (HKS) [2]. Neben systemischen und hirnorganischen Auswirkungen kommt es im Rahmen des Post-HKS-Syndroms zu einer myokardialen Dysfunktion, die über ein verringertes Schlagvolumen, Herzrhythmusstörungen und Hypotension zu einer instabilen

Hämodynamik und einer erhöhten Letalität der Patienten führt [4]. Obwohl sowohl die Komplikationsrate als auch die Mortalität in den letzten Jahrzehnten durch die schnelle Reperfusion des Infarktareals und die pharmakologischen Therapieempfehlungen signifikant gesenkt werden konnten, nimmt die Prävalenz der Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt weiterhin zu [5-7]. So entwickeln circa 25% der Patienten nach AMI eine Herzinsuffizienz [8].

1.1.2 Pathomechanismen des Ischämie-/Reperfusionsschadens

Das Herz weist durch seine kontinuierliche Pumpfunktion einen hohen Energiebedarf auf und ist auf eine aerobe Stoffwechsellage angewiesen [9]. Durch die Ischämie kommt es zu einer Minderversorgung an Nährstoffen und Sauerstoff und der Energiebedarf des Myokards kann nicht mehr gedeckt werden. Zunächst kommt es zu einem ischämischen Schaden des Myokards. Andererseits führt die Reperfusion sekundär zu dem sogenannten Reperfusionsschaden, der bis zu 50% des gesamten Infarktareals ausmachen kann [10].

1.1.2.1 Schädigung durch Ischämie

Der hohe Energiebedarf des Myokards wird durch ATP gedeckt, welches mittels oxidativer Phosphorylierung im Mitochondrium gewonnen wird. Aus diesem Grund weisen Kardiomyozyten morphologisch eine hohe mitochondriale Dichte auf [11]. Neben ATP stellt Kreatininphosphat eine weitere Energiequelle dar. Während der Ischämie werden die vorhandenen Energiereserven an ATP und Kreatininphosphat schnell aufgebraucht. Der Vorrat an Kreatininphosphat ist innerhalb von Minuten aufgebraucht und verlangsamt die Depletion des ATP [12]. Normalerweise wird der Energiebedarf des Myokards zu 90% aus der Oxidation freier Fettsäuren gedeckt. Durch den Nährstoff- und Sauerstoffmangel kommt die oxidative Phosphorylierung allerdings zum Erliegen und die Zellen stellen ihren Stoffwechsel auf anaerobe Glykolyse um [13]. Hierfür nutzen die Zellen vor allem ihre intrazellulären Glykogenspeicher [14]. Durch die Entkopplung der Glykolyse von der oxidativen Phosphorylierung entsteht Laktat, welches im Zytosol der Zelle akkumuliert und so zu einem Abfall des intrazellulären pH-Werts führt [15, 16]. Der niedrige pH-Wert stellt einen Schlüsselmechanismus der Schädigung durch Ischämie dar. Zum einen wird die anaerobe Glykolyse letztendlich inhibiert. Hierbei spielen neben dem pH-Wert auch die anfallenden Metaboliten des anaeroben Stoffwechsels eine Rolle. Durch die fehlende

oxidative Phosphorylierung fällt das Reduktionsäquivalent NADH vermehrt an, das nicht mehr oxidiert werden kann. Außerdem liegt das anorganische Phosphat als Abbauprodukt des ATP vermehrt in der Zelle vor [14]. Des Weiteren führt der niedrige pH-Wert letztlich zu einer kontraktile Dysfunktion, da die Troponin C Sensitivität gegenüber Ca^{2+} herabgesenkt wird [17]. Andererseits kommt es durch den niedrigen pH-Wert während der Ischämie auch zu erheblichen Veränderungen des Ionenhaushaltes der Zelle. Die erhöhte intrazelluläre Konzentration von H^+ -Ionen stimuliert den Na^+/H^+ -Austauscher, der H^+ -Ionen im Austausch gegen Na^+ nach extrazellulär pumpt [12]. Da die ATP Depletion dazu führt, dass die $\text{Na}^{2+}/\text{K}^+$ -ATPase deaktiviert wird, erhöht sich die intrazelluläre Natrium-Konzentration [9]. Der dadurch bedingte Kalium-Ausstrom aus der Zelle kann zu Veränderungen in der Elektrokardiographie (EKG) und Herzrhythmusstörungen führen. Letztendlich kommt es durch die erhöhte intrazelluläre Natriumkonzentration auch zu einer erhöhten intrazellulären Calcium-Konzentration. Einerseits hemmt die Natriumkonzentration die Aktivität des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers, andererseits hat die Depletion des ATP zur Folge, dass Calcium weder aktiv über die SERCA (sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase) noch über die Ca^{2+} -ATPase aus dem Zytosol transportiert werden kann [12]. Dieser „Calcium-Overload“ aktiviert Proteasen wie Calpain, die Proteine des Zytoskeletts, des Mitochondriums und des endoplasmatischen Retikulums degradieren [9].

Das Ausmaß des ischämischen Schadens ist abhängig von der Dauer der Ischämie. Hält die Ischämie nur für kurze Zeit an (< 15 Minuten), so ist der Schädigung des Myokards reversibel. Besteht die Minderperfusion jedoch länger, kommt es zu einem irreversiblen myokardialen Gewebsuntergang. Gleichermaßen steigt die Anfälligkeit der Kardiomyozyten gegenüber dem Reperfusionsschaden in Abhängigkeit von der Dauer der Ischämie [18].

1.1.2.2 Schädigung durch Reperfusion

Die schnelle Reperfusion der akuten myokardialen Ischämie mittels PCI oder Thrombolyse ist die Therapie der Wahl, um die Größe des Infarktareals zu reduzieren. Allerdings führt auch die Reperfusion auf verschiedene Arten zu einer myokardialen Schädigung. Einerseits kann es zu Arrhythmien und zu kontraktile Dysfunktion (*Stunning*) der Kardiomyozyten kommen. Andererseits kann die Reperfusion auch irreversible Folgen wie Durchblutungsstörungen auf mikrovaskulärer Ebene und den

Zelluntergang der Kardiomyozyten zu Folge haben [19]. Durch den wiederhergestellten Blutfluss werden Sauerstoff und die Substrate der ATP-Synthese wieder zur Verfügung gestellt und der extrazelluläre pH-Wert wird normalisiert. Dies führt jedoch über verschiedene Mechanismen wie oxidativen Stress, intrazelluläre Calcium-Überladung und pH-Wert Normalisierung sowie Inflammation zu einer Exazerbation der Zellschädigung [9].

Oxidativer Stress entsteht durch eine erhöhte Bildung reaktiver Sauerstoff Spezies (ROS) aufgrund einer insuffizienten oxidativen Phosphorylierung im Mitochondrium, die über die Enzyme Xanthin-Oxidase, NADPH-Oxidase und NO-Synthase vermittelt wird. Da die intrazellulären anti-oxidativen Schutzmechanismen der Kardiomyozyten ausgeschöpft sind, führt der oxidative Stress zu einer direkten Zellschädigung. So werden Proteine denaturiert, Membran-Schäden durch Lipidperoxidation verursacht und DNA oxidativ geschädigt. ROS schädigt aber auch indirekt, indem es pro-inflammatorisch wirkt und Proteasen aktiviert. Außerdem fördert ROS die Permeabilisierung der mitochondrialen Membran und führt damit zu einer mitochondrialen Dysfunktion [20].

Durch den physiologischen extrazellulären pH-Wert entsteht ein Protonengradient, der den Austausch von Protonen gegen Natrium durch den Na^+/H^+ -Austauscher antreibt. Der massive Natrium-Influx hat jedoch zur Folge, dass der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher aktiviert wird und es durch eine vermehrte Exkretion von Na^+ nach extrazellulär zu einer intrazellulären Calcium Überladung kommt [9]. Die gestörte Calcium-Homöostase kann verschiedene Folgen haben. Zum einen kann es zu Arrhythmien kommen, die oft tödlich enden. Bleibt die intrazelluläre Calcium-Konzentration während der Reperfusion erhöht, wird es durch das wiederhergestellte mitochondriale Membranpotenzial über den Calcium-Uniporter in das Mitochondrium aufgenommen [10, 21]. Der saure pH-Wert während der Ischämie wirkt inhibierend auf den kontraktilen Apparat des Kardiomyozyten. Durch die Normalisierung des pH-Wertes und die intrazelluläre Calcium-Überladung können Hyperkontraktionen verursacht werden, die den ATP-Verbrauch der Kardiomyozyten stark erhöhen und zum Zelluntergang führen [21, 22].

Eine wichtige Rolle in der Schädigung durch Reperfusion spielt die Öffnung der mitochondrialen Pore (mPTP) [23-26]. Dabei handelt es sich um eine unspezifische

Pore, die in der inneren Mitochondrien Membran lokalisiert ist und für Moleküle von bis zu 1,5 kDa durchlässig ist [10, 27]. Die Pore wird durch verschiedenen Signale geöffnet: *In vitro* Studien konnten zeigen, dass eine hohe Calcium-Konzentration in der mitochondrialen Matrix dazu führt, dass die Pore geöffnet wird [27, 28]. Auch oxidativer Stress, Depletion von ATP und Adenin-Nukleotiden sowie erhöhte Phosphat-Konzentrationen führen zur Öffnung der mPTP [26, 29, 30]. Da die Öffnung der mPTP durch H^+ -Ionen inhibiert wird, bleibt die Pore während der Ischämie geschlossen [27]. Sobald allerdings der intrazelluläre pH-Wert ansteigt, entfällt diese Inhibition und die Pore öffnet sich [10]. Das mitochondriale Membranpotenzial ($\Delta\Psi_m$) kann durch die Öffnung der Pore nicht aufrecht erhalten werden und der elektrochemische Gradient bricht zusammen, sodass die oxidative Phosphorylierung nicht mehr stattfinden kann. Dadurch kann kein ATP erzeugt werden, zusätzlich dreht die ATPase ihren Mechanismus um und spaltet das in der Zelle vorhandene ATP, sodass es zu einer ATP Depletion kommt. Andererseits entsteht durch die Öffnung der mPTP ein kolloid-osmotischer Druck zwischen Mitochondrium und Zytosol, der zu einem Anschwellen der Mitochondrien und Platzen der äußeren mitochondrialen Membran führt [30]. Durch die Ruptur der äußeren mitochondrialen Membran (outer mitochondrial membrane, OMM) gelangen Intermembranproteine wie Cytochrom c (Cyt c) und Apoptose induzierende Faktor (AIF) in das Zytosol. Im Zytosol induzieren Cyt c und AIF die Caspase-abhängige und Caspase-unabhängige Apoptose (siehe Abbildung 1). Da die Öffnung der mPTP eine entscheidende Rolle für das Ausmaß des Reperfusionsschadens spielt, stellt die Integrität der mitochondrialen Membran ein wichtiges kardioprotektives Ziel dar [31-33].

1.2 Therapeutische Hypothermie

Die therapeutische Hypothermie (TH) bezeichnet das gezielte Herabsetzen der Körpertemperatur auf unter 36 °C bei Erwachsenen und unter 36,5 °C bei Kleinkindern und Säuglingen. Dabei werden verschiedene Arten der Hypothermie unterschieden (siehe Tabelle 1). Da sich die Anwendung der TH in Einleitungs-, Aufrechterhaltungs- und Wiedererwärmungsphase gliedert, hat sich in der Klinik der Begriff des *Targeted Temperature Managements (TTM)* etabliert.

Tabelle 1. Temperaturabhängige Definitionen der therapeutischer Hypothermie [34].

milde Hypothermie	34 - 35,9 °C
moderate Hypothermie	32 - 33,9 °C
moderat-tiefe Hypothermie	30 - 31,9 °C
tiefe Hypothermie	<30 °C

1.2.1 Anwendungsgebiete

Hypothermie ist eine der ältesten Therapieverfahren zur Organprotektion und wird so beispielsweise während Operationen am Herzen angewendet um Gehirn, Herz und Nieren vor Ischämie zu schützen [35-37]. Vor allem im Bereich der Neuroprotektion hat sich die Anwendung der TH etabliert. Die Grundlage hierfür bilden randomisiert kontrollierte Studien, die bewusstlose Erwachsene nach Herzkreislaufstillstand (HKS) direkt nach Reanimation für 12 bis 24 Stunden kühlten. Bernard et al. zeigten, dass TH (33 °C) die Mortalität und die Morbidität von Patienten mit Herzkreislaufstillstand nach Kammerflimmern signifikant reduziert [38]. In der hypothermen Patientengruppe überlebten 49% den HKS, verglichen mit nur 26% der normotherm behandelten Patienten. Auch die Studie der Hypothermia after Cardiac Arrest Study Group untersuchte den Einfluss von TH (32-34 °C) nach HKS und berichtete von einer Reduktion der Mortalität durch Hypothermie von 55% auf 41% [39]. Die neurologische Morbidität wurde ebenfalls signifikant verringert (55% vs. 39%), während die Komplikationsrate sich in den beiden Versuchsgruppen nicht wesentlich unterschied. Neueste Studien stellen allerdings die neuroprotektiven Effekte der Hypothermie in Frage. Moler et al. verglichen moderate TH (33 °C) und kontrollierte Normothermie (36,8 °C) bei Kindern nach HKS außerhalb des Krankenhauses und konnten keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf die Mortalität berichten [40]. Eine weitere Analyse dieser Bedingungen bei Kindern nach HKS innerhalb des Krankenhauses wurde abgebrochen, da sich keine Unterschiede in Bezug auf die Mortalität und das neurologische Verhalten der Kinder nach einem Jahr zeigten [41]. Die Studie von Nielsen et al. verglich zum ersten Mal Kühlung (33 °C) mit einer kontrollierten Körpertemperatur (36 °C) bei Erwachsenen nach HKS. Die moderate Hypothermie reduzierte in dieser Studie weder die Mortalität noch die Morbidität [42]. Ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse zu dem protektiven Potenzial der TH liegt womöglich

in der kontrollierten Körpertemperatur der normothermen Kontrollgruppe. Die aktuellen Leitlinien des European Resuscitation Council empfehlen daher bei bewusstlosen Erwachsenen nach HKS durch ventrikuläre Tachykardie neben den bisherigen 32 – 34 °C ein TTM bei 36 °C [43].

Obwohl das neuroprotektive Potential bei Erwachsenen nach HKS momentan umstritten ist, hat sich die TH in der Neonatologie als Therapie der hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie nach perinataler Asphyxie etabliert. Shankaran et al. zeigten, dass TH bei 33,5 °C für 72 Stunden die Mortalität und Morbidität der Neugeborenen reduziert [44]. Die TOBY-Studie (Total Body Hypothermie for Neonatal Encephalopathy Trial) konnte nachweisen, dass die TH einen positiven Einfluss auf das neurologische Outcome nimmt. Dabei konnte ein signifikanter Unterschied in Bezug auf den Intelligenzquotienten der Kinder festgestellt werden, der sowohl im Alter von 18 Monaten als auch im Alter von 6 bis 7 Jahren nachweisbar war [45, 46]. Die Anwendung der TH als Therapie nach Schädel-Hirn-Trauma und bei Patienten mit Schlaganfall ist bisher umstritten und Gegenstand aktueller klinischer Studien [47-49].

1.2.2 Therapeutische Hypothermie und Kardioprotektion

In Tierstudien konnte gezeigt werden, dass die myokardiale Temperatur des akut ischämischen Myokards die Infarktgröße entscheidend beeinflusst [50-52]. So konnte eine frühe Studie von Chien et al. am schlagenden Kaninchenherzen beobachten, dass die Größe des Infarktareals in einem Temperaturbereich von 35 – 42 °C mit jeder Erwärmung um 1 °C um bis zu 10% zunimmt [50]. Auf Grundlage der bisherigen klinischen Studien lässt sich jedoch keine klare Aussage zu dem kardioprotektiven Potenzial der TH machen. Dixon et al. untersuchten eine kleine Patientengruppe von 42 Patienten mit AMI, die während der Katheterintervention endovaskulär auf 33 °C gekühlt wurden. Es war ein nicht signifikanter Trend erkennbar, dass Hypothermie die Infarktgröße reduziert [53]. Auf Grundlage dieser Beobachtung wurden die beiden randomisiert kontrollierten Studien COOL-MI und ICE-T durchgeführt, deren Ergebnisse bisher nur in Reviews zusammengefasst wurden. Beide Studien kühlten endovaskulär vor der Reperfusion auf 33 °C und konnten keinen protektiven Einfluss der TH auf die Infarktgröße ausmachen. Insgesamt wurde die Zieltemperatur nicht schnell genug erreicht. Eine Subgruppenanalyse ergab, dass Patienten mit Vorderwandinfarkt und

einer Temperatur von $< 35\text{ }^{\circ}\text{C}$ vor Reperfusion signifikant geringere Infarktgrößen aufwiesen [54]. Des Weiteren ergab eine Subgruppenanalyse der Hypothermia after Cardiac Arrest Studie, dass eine signifikante Reduktion der Infarktgröße nur bei Patienten beobachtet werden konnte, die innerhalb von 8 Stunden auf $32 - 34\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt wurden [55]. In den letzten Jahren wird aus diesem Grund zunehmend an schnell induzierbarer Hypothermie geforscht. Dazu gehört beispielsweise die Kombination aus endovaskulärer Kühlung und Infusionen mit kalter Kochsalzlösung [56]. Erlinge et al. zeigten mit dieser Methode in der CHILL-MI Studie zwar eine Reduktion der Herzinsuffizienz als Langzeitfolge der myokardialen I/R, allerdings verringerte die Kühlung nicht die Infarktgröße [57]. Eine weitere Methode der schnell induzierbaren Hypothermie stellt die Peritoneallavage dar, die bei Patienten nach HKS eine weitere nebenwirkungsarme und schnelle Kühlungsmethode darstellt [58, 59]. Insgesamt scheint der Zeitpunkt der Kühlungsinduktion entscheidend zu sein, der nur durch ein schnelles Herabsenken der Körpertemperatur erreicht werden kann. In Tierexperimenten konnte bereits gezeigt werden, dass intra-ischämische Hypothermie die Infarktgröße um bis zu 80% reduziert und die kardiale Funktion verbessert, während eine Kühlung nach Reperfusion keinen kardioprotektiven Effekt hat [60-63].

1.3 Wirkungen der Hypothermie

Die Wirkungen der Hypothermie sind vielfältig und spielen in den unterschiedlichen Phasen der Ischämie/Reperfusion (I/R) eine protektive Rolle.

1.3.1 Zellulärer Stoffwechsel

Hypothermie reduziert den zellulären Stoffwechsel und führt so zu einem geringeren Umsatz von Glukose und Sauerstoff. Polderman et al. beschrieben in einer Übersichtsarbeit, dass bei Herabsenken der Körpertemperatur um $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ die zerebrale metabolische Rate um jeweils 6-10% gesenkt wird [64]. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass der anaerobe Metabolismus während der Ischämie durch moderate Hypothermie verhindert wird [65]. Eine zentrale kardioprotektive Rolle der Hypothermie bei I/R wird außerdem dem verminderten ATP-Umsatz zugeschrieben, der die myokardiale Funktion aufrechterhält. Simkhovich et al. zeigten, dass regionale Hypothermie während Ischämie an Kaninchenherzen zu dem Erhalt der Glykogenspeicher und der ATP-Spiegel führt [66]. In einer weiteren *in vivo* Studie konnte ebenfalls beobachtet

werden, dass TH die myokardialen ATP-Spiegel signifikant erhöht [67]. Die reduzierte Stoffwechselrate und die damit einhergehenden stabilen ATP-Spiegel sind von großer Bedeutung für das Aufrechterhalten der mitochondrialen Funktion.

1.3.2 Oxidativer Stress

Wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben trägt oxidativer Stress entscheidend zu dem Zelluntergang durch I/R bei. Die Überproduktion an ROS während der frühen Reperfusionphase führt zu der Öffnung der mPTP und somit zu der Einleitung der intrinsischen Apoptose. So zeigten Kagan et al., dass ROS an der Freisetzung des mitochondrialen Cyt c in das Zytosol beteiligt ist [68]. Da TH die Überproduktion von ROS während der I/R wesentlich vermindert, können die antioxidativen Schutzmechanismen der Zelle greifen und diese effizient schützen [64]. Dadurch kann der zelluläre Schaden, der direkt durch ROS entsteht, vermindert und die Einleitung der intrinsischen Apoptose verhindert werden.

1.3.3 Mitochondriale Dysfunktion und intrinsische Apoptose

Die mitochondriale Funktion besteht vor allem in der Synthese von ATP. Durch I/R kommt es wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials ($\Delta\Psi_m$). Durch den fehlenden elektrochemischen Gradienten über der mitochondrialen Membran kann die ATP-Synthase kein ATP erzeugen und es kommt zu einer mitochondrialen Dysfunktion. Studien konnten zeigen, dass Hypothermie die mitochondriale Integrität erhält und somit die mitochondriale Dysfunktion verhindern kann [69-71]. Tissier et al. konnten zeigen, dass schnell induzierte Hypothermie durch Flüssigkeitsbeatmung die mitochondriale Funktion während der frühen Reperfusion signifikant verbessert. Unter Kühlung wurde nicht nur die ATP-Synthase aufrecht erhalten, sondern auch die Calcium-induzierte Öffnung der mPTP verhindert [69].

Neben der gestörten ATP-Synthese, spielt die mitochondriale Dysfunktion eine bedeutende Rolle für die Einleitung der intrinsischen Apoptose. Die Apoptose ist eine energieverbrauchende Art des Zelluntergangs. Extrazelluläre apoptotische Signale werden über den Todesrezeptor, der die extrinsische Apoptose einleitet, aufgenommen.

Intrazelluläre Stressfaktoren wie Nährstoffmangel, Hypoxie und oxidativer Stress induzieren dagegen die Freisetzung mitochondrialer Proteine, die zu der Einleitung der intrinsischen Apoptose führen (siehe Abbildung 1). Myokardiale I/R führt sowohl zu einem apoptotischen als auch zu einem nekrotischen Zelluntergang [72, 73]. Dabei ist die Nekrose ein ATP-unabhängiger Prozess, der inflammatorische Abbauprozesse aktiviert [74]. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Studien zeigten, dass TH den apoptotischen Zelluntergang nach I/R signifikant reduzieren kann [67, 75-78]. Lee et al. konnten in einer *in vivo* Studie zeigen, dass eine Kühlung für 24 Stunden bei 32 – 34 °C die aktivierten Caspase 3 - Spiegel signifikant vermindert [67]. Auch Tong et al. beobachteten an HL-1 Kardiomyozyten, dass intra-ischämische Hypothermie (33,5 °C) die Aktivierung der Caspase 3 signifikant vermindert [77]. Da die aufgeführten Studien zeigen, dass TH sowohl die mitochondriale Dysfunktion als auch die Aktivierung der Caspase-Kaskade verhindern kann, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der TH auf die intrinsische Apoptose untersucht.

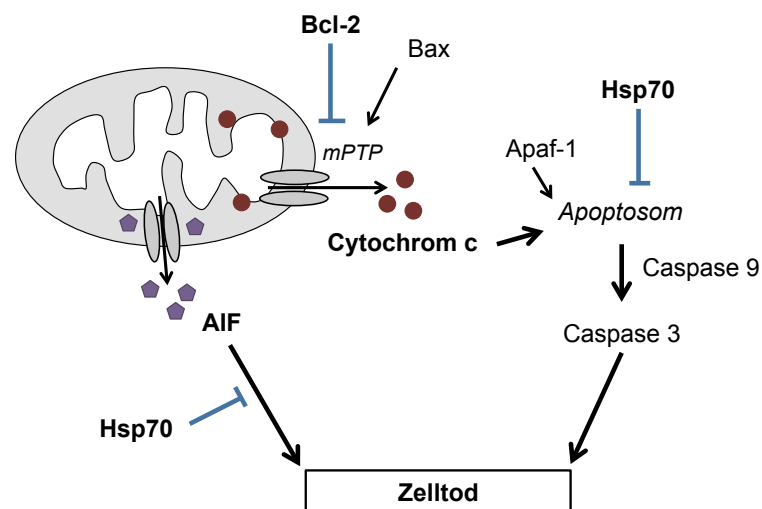


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Regulation der intrinsischen Apoptose. Der Austritt von Cyt c über die mitochondriale Pore (mPTP) induziert die Caspase-abhängige Apoptose Einleitung, während AIF zur Caspase-unabhängigen Apoptose der Zelle führt [79].

1.3.3.1 Cytochrom c

Cyt c ist ein mitochondriales Protein, das im Intermembranraum des Mitochondriums lokalisiert ist. Es ist über anionische Phospholipide wie Cardiolipin mit der inneren mitochondrialen Membran assoziiert [80]. Sobald es durch die Öffnung der mPTP und die daraus folgende Ruptur der äußeren mitochondrialen Membran in das Zytosol gelangt, aktiviert es Apaf-1 und trägt so zu der Bildung des Apoptosoms bei. Dadurch wird die Caspase-abhängige Apoptose eingeleitet, die über Caspase 9 die Effektor-Caspase 3 aktiviert (siehe Abbildung 1) [81, 82]. Die Effektor-Caspasen initiieren die entscheidenden apoptotischen Signale, zu denen die Fragmentierung der DNA, die Isolation und das Schrumpfen der apoptotischen Zellen sowie die Bildung von Membran-Vesikeln (*Membran-Blebbing*) gehören [83].

1.3.3.2 AIF

AIF ist ein Flavoprotein, das über ein Ankerprotein mit der inneren mitochondrialen Membran verbunden ist. Durch einen apoptotischen Stimulus findet eine Proteolyse des mitochondrialen AIF (62 kDa) statt. Sobald das prozessierte AIF (57 kDa) in das Zytosol gelangt, transloziert es direkt zum Zellkern und induziert die Kondensation des Chromatins und die Fragmentierung der DNA [84]. Somit wird die Apoptose der Zelle Caspase-unabhängig induziert (siehe Abbildung 1) [85].

1.3.3.3 Die Familie der Bcl-2 Proteine

Die Familie der B-Zell Lymphom-2 Proteine (Bcl-2) besteht sowohl aus pro-apoptotischen Proteinen (Bax, BAD, Bak und Bok) als auch aus anti-apoptotischen Proteinen (Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-w) [86]. Bax wirkt pro-apoptotisch, indem es die Freisetzung mitochondrialer Apoptose-Induktoren unterstützt. Es liegt im Zytosol der Zelle vor und transloziert bei einem apoptotischen Stimulus an die äußere mitochondriale Membran. Dort bilden sich Bax-Oligomere und ermöglichen die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran [87, 88]. Das anti-apoptotische Bcl-2 ist hingegen an die äußere mitochondriale Membran gebunden und stabilisiert die mitochondriale Membranintegrität, indem es Bax bindet und seine Wirkung antagonisiert [89, 90]. Liegt das anti-apoptotische Bcl-2 vermehrt vor, wird die Permeabilisierung der mitochondrialen Membran und somit die Einleitung der intrinsischen Apoptose verhindert (siehe Abbildung 1) [89, 91-93].

1.3.3.4 Hsp70

Das Hitzeschockprotein 70 (Heatshock-Protein 70, Hsp70) ist ein wichtiges *Housekeeping*-Gen. Die verschiedenen Subformen der Hsp70-Familie unterscheiden sich in ihrer Gewebespezifität und subzellulären Lokalisation. Während einige im Zytosol vorliegen, sind andere in Zellorganellen wie dem Mitochondrium vorzufinden [94]. Das mitochondriale Hsp70 (mHsp70) befindet sich in der mitochondrialen Matrix und ist an ein Protein der inneren Mitochondrien-Membran gebunden. Dort ist mHsp70 an dem energieabhängigen Import mitochondrialer Proteine beteiligt, die unter anderem den oxidativen Schutz des Mitochondriums gewährleisten [95]. Das zytosolische Hsp70 wirkt als *Chaperone*, indem es die Proteinfaltung unterstützt und eine Fehlfaltung sowie Proteinaggregation verhindert [96]. So schützt Hsp70 die Zelle gegen Hitzestress, Ischämie und oxidativen Stress [94]. Hsp70 hat auch eine anti-apoptotische Wirkung. Beere et al. zeigten, dass Hsp70 die Formierung des Apoptosoms verhindert [97]. Andere Studien berichteten, dass Hsp70 die Translokation von AIF zum Zellkern inhibiert [98, 99]. Da mHsp70 am antioxidativen Schutz des Mitochondriums beteiligt ist, der während I/R besonders wichtig für die mitochondriale Funktion ist (siehe Kapitel 1.1.2), und das zytosolische Hsp70 sowohl die Caspase-abhängige als auch die Caspase-unabhängige Apoptose inhibiert, wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl das zytosolische als auch das mitochondriale Hsp70 untersucht.

1.3.4 Autophagie

Neben dem Ubiquitin-Proteasom-System stellt die Autophagie einen Weg für die Degradation intrazellulärer Proteine dar. Zu Beginn werden abzubauen Proteine oder Zellorganellen von einzelnen Membranbestandteilen umgeben, die im weiteren Prozess elongiert werden und das Autophagosom bilden. Anschließend fusioniert das Autophagosom mit einem Lysosom, sodass die eingeschlossenen Bestandteile schließlich durch lysosomale Hydrolasen aufgespalten werden (siehe Abbildung 2). Es findet eine kontinuierliche Degradation statt, die gewährleistet, dass Proteine und Zellorganellen vor ihrem Funktionsverlust ersetzt werden [100]. Die Autophagie stellt dabei einen wichtigen Prozess für die Vitalität des Myokards dar. Bei Patienten mit Morbus Danon ist die Autophagie aufgrund einer Mutation in dem Lysosom-assoziierten Membran Protein 2 (LAMP2) dysfunktional und die Abbauprodukte sammeln sich

intrazellulär an. Klinisch präsentieren sich die Patienten meist im Kindesalter unter anderem mit einer schwerwiegenden hypertrophen Kardiomyopathie und Störungen des kardialen Erregungsleitungssystems [101].

Während I/R spielt die Autophagie ebenfalls eine bedeutende Rolle, da durch den autolysosomalen Abbau während Phasen des Nährstoffmangels freie Fettsäuren und Aminosäuren für die Energiegewinnung zur Verfügung gestellt werden können [102]. Außerdem kann die Öffnung der mPTP verhindert werden, indem dysfunktionale Mitochondrien durch Autophagie der Mitochondrien, auch Mitophagie genannt, degradiert werden (siehe Abbildung 2). Somit stellt die Autophagie möglicherweise einen wichtigen Regulationsmechanismus der intrinsischen Apoptose dar [103]. Allerdings wird der kardioprotektive Effekt der Autophagie bei I/R-Schaden kontrovers diskutiert [102, 104-107]. Der Einfluss der Hypothermie auf die Autophagie ist ebenfalls noch unklar. Eine Studie von Tang et. al zeigte, dass tiefe Hypothermie (18 °C) während simulierter Ischämie die Aktivität der Autophagie bei Phäochromocytom-Zellen (PC12 Zellen) signifikant erhöht [108]. Dagegen berichteten Lu et al., dass moderate Hypothermie nach Herzkreislaufstillstand die Autophagie-Aktivität in Neuronen reduziert [109].

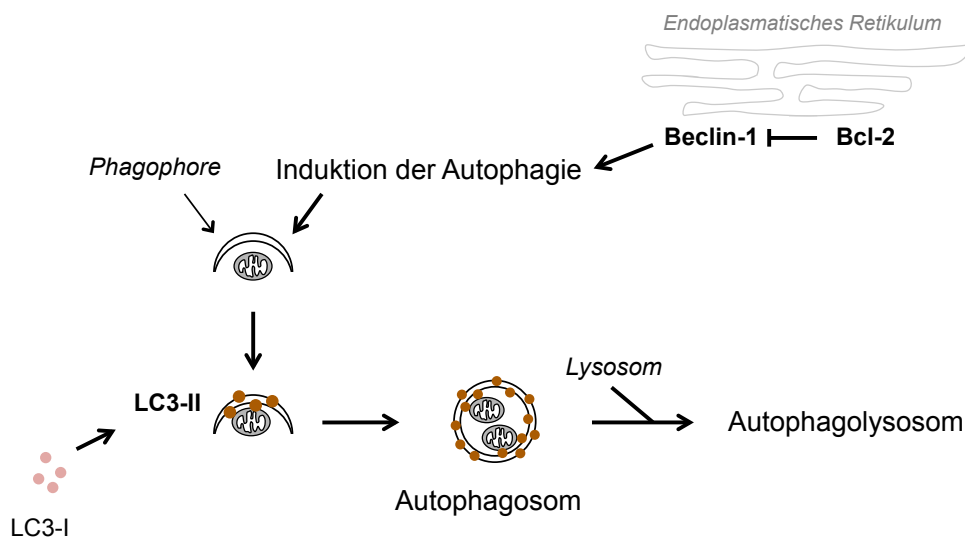


Abbildung 2. Schematische Darstellung der Autophagie dysfunktionaler Mitochondrien (Mitophagie).

1.4 Ziele der Arbeit

Da die ischämische Herzkrankheit eine bedeutende Ursache für die globale Morbidität und Mortalität darstellt, ist es wichtig zelluläre Mechanismen während I/R zu untersuchen und mögliche kardioprotektive Maßnahmen zu evaluieren. Die therapeutische Hypothermie zeigt in experimentellen Studien vielversprechende Wirkungen, die den myokardialen Zelluntergang nach I/R reduzieren können. In der vorliegenden Arbeit wurden die zellulären Wirkungen von TH auf Kardiomyozyten untersucht. In dem ersten Teil der Arbeit wurden dabei folgende Fragestellungen durch Zellkulturexperimente an **HL-1 Zellen** untersucht:

1. Welchen Einfluss nimmt moderate TH auf die intrinsische Apoptose der HL-1 Kardiomyozyten?
2. Welchen Einfluss hat die moderate TH auf die Autophagie der HL-1 Kardiomyozyten?

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung der TH während I/R an **primären Kardiomyozyten** untersucht. Dabei wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Sind die gewonnenen Daten aus den Experimenten der HL-1 Zelllinie auf primäre Kardiomyozyten übertragbar und kann der Zelluntergang durch I/R bei primären Kardiomyozyten durch TH vermindert werden?
2. Können primäre Kardiomyozyten durch ein modifiziertes Therapiemanagement der TH vor I/R geschützt werden?

2 Materialien

2.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller (Firma, Stadt, Land)
Axio Imager M1	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
CO ₂ Inkubator mit O ₂ -Regelung CB 60	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Bio-Fuge primo / fresco (Zentrifugen)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Brutschrank CO ₂ Inkubator, MCO-19AIC	Sanyo, USA
ChemiDoc XRSTM	Bio-Rad, München, Deutschland
Elektrophorese-/Blotting-Netzteil	Biometra, Göttingen, Deutschland
Elektrophorese-Kammer	Bio-Rad, München, Deutschland
Magnetrührer	Roth, München, Deutschland
Multiskan Reader Ascent	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Präzisionswaage BP4100S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Sicherheitswerkbank Lamin Air	Heraeus, Hanau, Deutschland
Schüttler Promax	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Thermoblock	Biometra, Göttingen, Deutschland
Tiefkühlschrank (-80 °C)	FRYKO, Esslingen, Deutschland
Wasserbad WB 10	Memmert, Schwabach, Deutschland
Vortex-2 Genie	Scientific Industries, Bohemia, NY USA

2.2 Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller (Firma, Stadt, Land)
Claycomb-Medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) w 3,7 g/L NaHCO ₃ w 4,5 g/L D-Glucose w stable Glutamine	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) w 3,7 g/L NaHCO ₃ w/o 4,5 g/L D-Glucose w/o L -Glutamine	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA

Fetal bovine Serum (FBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Fetal bovine Serum (FBS)	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
Fibronectin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Gelatine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Norepinephrin ±-Arterenol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
L-Ascorbinsäure, Natrium-Salz	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin 200 mM	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
Penicillin/Streptomycin [30%] (10 ⁴ U/ml P und 10 ⁴ µg/ml S)	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
PBS	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
Trypsin-EDTA (0,5% Trypsin in 0,02% EDTA-Na)	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spritzen Injekt® (20 ml)	Braun, Melsungen, Deutschland
Sterilfilter Filtropur S0.2	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflaschen (75 und 175 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturröhrchen 15 ml und 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschalen (22 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschalen (9,2 cm ²)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Vakuumfilterflaschen (250 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Vakuumfilterflaschen (500 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
96-well-Platten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2.3 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller (Firma, Stadt, Land)
Acrylamid [30%]	Roth, München, Deutschland
APS	Roth, München, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth, München, Deutschland
β-Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Mannheim, Deutschland
DAPI	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

DMSO	Roth, München, Deutschland
Dura Super Signal West	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
EDTA [99%]	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Ethanol [70%]	Roth, München, Deutschland
Guanidin Hydrochlorid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
HCL [5 M]	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Methanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
MitoTracker Red CMXRos	invitrogen, Carlsbad, USA
Dako Fluorescent Mounting Medium	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Pierce BCA-Protein Assay	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Pierce Lane Marker Reducing Sample Buffer (5x)	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Ponceau-Färbelösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
SDS	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
TEMED	Roth, München, Deutschland
TRIS	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Roth, München, Deutschland
TWEEN 20	Roth, München, Deutschland
Trypanblau [0,5%]	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

2.4 Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Hersteller	Katalog-Nummer
AIF	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling, Boston, USA	4642
Alexa Fluor 488	Kaninchen, polyklonal	BioLegend, San Diego, USA	406416
β -Aktin	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling, Boston, USA	4967
Bax	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling, Boston, USA	2772
Bcl-2	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling, Boston, USA	2876

Cytochrom c	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling, Boston, USA	4272
COX IV	Maus, monoklonal	Cell Signaling, Boston, USA	11967
Hsp70	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling, Boston, USA	4872
LC3-II	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling, Boston, USA	4108
F(ab') ₂ anti-Rabbit IgG (H+L)	Esel, polyklonal	dianova, Hamburg, Deutschland	7-11-036-152
F(ab') ₂ anti-Mouse IgG (H+L)	Esel, polyklonal	dianova, Hamburg, Deutschland	715-066-150

2.5 Kit

Bezeichnung	Hersteller (Firma, Stadt, Land)
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche, Mannheim, Deutschland
Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Pierce Primary Cardiomyocyte Isolation Kit	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland

2.6 Sonstige Materialien

Bezeichnung	Hersteller (Firma, Stadt, Land)
Chromatography Paper, 3 mm	Whatman, Maidstone, UK
Deckgläser (Ø15 mm)	VWR, Radnor, USA
Eppendorf Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Gelkämme	Bio-Rad, München, Deutschland
Menzel Gläser, Super Frost	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Zellschaber 25 cm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
PVDF Membranen Fluoro Trans®	PALL Life Sciences, Port Washington, NY

3 Methoden

3.1 Teil 1: Versuche mit HL-1 Zellen

3.1.1 Kultivierung der HL-1 Kardiomyozyten

Bei den HL-1 Kardiomyozyten handelt es sich um eine Kardiomyozyten Tumorzelllinie, welche atrialen AT1-Zellen einer weiblichen Jackson C57BL/6J Maus entstammen [110]. Die Zellen wurden freundlicherweise von William C. Claycomb, Ph.D (LSU Health Sciences Center, New Orleans, LA., USA) zur Verfügung gestellt. Zellkulturflaschen, Petrischalen sowie Multiwell-Platten wurden vor ihrer Verwendung für 1 Stunde mit $0,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Fibronektin und 0,02% Gelatine beschichtet [110]. Die HL-1 Zellen wurden bei 21% O_2 und 5% CO_2 bei 37 °C in Claycomb Medium kultiviert, welches 10% FBS (Sigma-Aldrich), 100 μM Penicillin und Streptomycin, 2 mM L-Glutamin sowie 0,1 mM Norepinephrin enthält. Ein Mediumwechsel fand alle 2 bis 3 Tage statt. Sobald die Kardiomyozyten konfluent waren, wurden sie für den Versuch ausplattiert oder in einem Verhältnis von 1:2 – 1:5 passagiert. Zum Ablösen der Zellen wurde Trypsin/EDTA verwendet (0,05/0,02%). Um einen Vorrat an HL-1 Zellen zu erstellen, wurden Kryoaliquots mit jeweils $1,5 \times 10^6$ Zellen pro Aliquot in Kryomedium erstellt. Das Kryomedium bestand aus 95% FBS und 5% DMSO.

3.1.2 Durchführung der Ischämie/Reperusions-Versuche

3.1.2.1 Simulation der Ischämie und Reperfusion

Sowohl die HL-1 Zellen als auch die primären Kardiomyozyten wurden einer simulierten I/R ausgesetzt. Dabei wurde die Ischämie mit Hilfe von Sauerstoff- und Glukoseentzug (oxygen-glucose deprivation, OGD) simuliert. Anschließend fand die Simulation der Reperfusion statt, indem die Zellen ihren normalen Kultivierungsbedingungen ausgesetzt wurden (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2. Simulation der Ischämie und Reperfusion.

<i>OGD</i>	<i>Reperfusion</i>
0,2% Sauerstoff	21% Sauerstoff
5% CO ₂	5% CO ₂
Mangelmedium ohne Glukose und ohne Serum	Vollmedium mit Glukose und Serum

3.1.2.2 Zeit-Temperatur-Protokoll und Versuchsdurchführung mit HL-1 Kardiomyozyten

Es wurde ein Zeit-Temperatur-Protokoll entwickelt, bei dem die HL-1 Zellen bereits während der OGD-Phase (intra-OGD therapeutische Hypothermie, IOTH) auf 33,5 °C gekühlt wurde. Die Zellen wurden 48 Stunden vor jedem Versuch in Claycomb-Medium ausplattiert. Für die OGD-Phase wurden die Zellen mit Mangelmedium behandelt. Die Proben wurden einmal mit dem Mangelmedium gewaschen und anschließend für 6 Stunden bei 0,2% Sauerstoff und 5% CO₂ inkubiert (Tabelle 2). Die HL-1 Zellen wurden in zwei Versuchsgruppen eingeteilt: Die normotherme Versuchsgruppe wurde der simulierten Ischämie bei 37 °C ausgesetzt, während die hypotherme Versuchsgruppe nach 3 Stunden OGD auf 33,5 °C gekühlt wurde (siehe Abbildung 3).

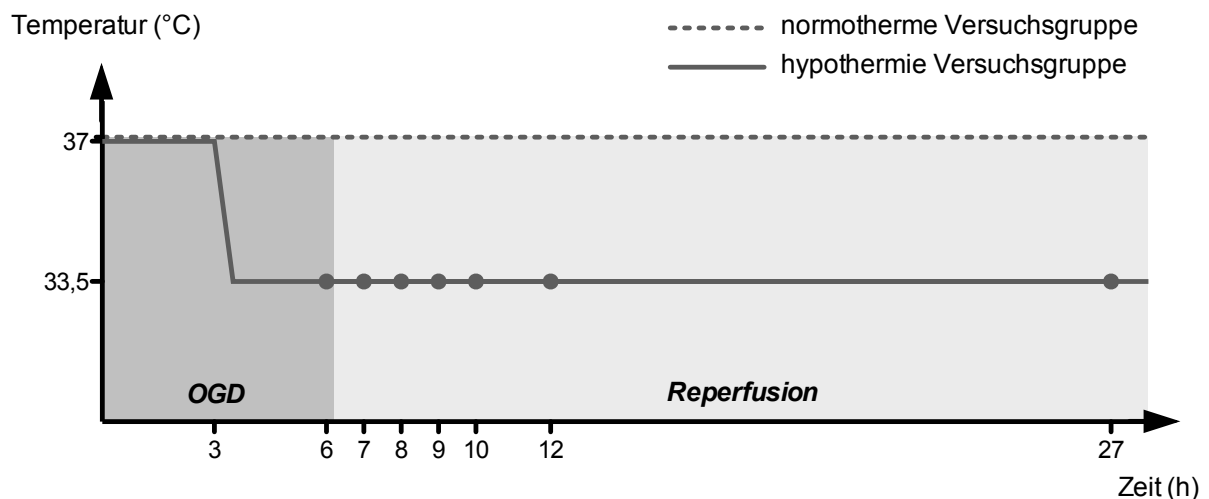


Abbildung 3. Schema des Zeit-Temperatur-Protokolls. Während der OGD-Phase wurde die hypotherme Versuchsgruppe auf 33,5 °C gekühlt. Während der Reperfusion wurde Proben zu den Versuchszeitpunkten 6, 7, 8, 9, 10, 12 und 27 Stunden entnommen.

Des Weiteren wurde zu jedem Versuchszeitpunkt eine Kontrollgruppe mitgeführt. Hierfür wurden die HL-1 Zellen in den ersten 6 Stunden des Versuchsprotokolls mit Vollmedium behandelt und bei 37 °C und Normoxie (21% Sauerstoff) inkubiert. Während der Reperfusion erhielten die Zellen aller Versuchsgruppen Reperfusionsmedium sowie 21% Sauerstoff. Die hypotherme Gruppe wurde für insgesamt 24 Stunden bei 33,5 °C gekühlt. Um die Versuchsbedingungen zwischen der OGD- und der Normoxie-Versuchsgruppe anzugleichen, wurden beide Gruppen während der ersten 6 Stunden mit DMEM-Medien behandelt. Die Zusammensetzung der Versuchsmedien ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3. Zusammensetzung der Versuchsmedien für HL-1 Zellen.

Medien	Inhaltsstoffe
Mangelmedium zuvor bei 0,2% Sauerstoff äquilibriert	<ul style="list-style-type: none"> • DMEM ohne Glukose • Penicillin (100 µM) • Streptomycin (100 µM) • L-Glutamin (2 mM)
Vollmedium	<ul style="list-style-type: none"> • DMEM mit Glukose • FBS (10%) • Penicillin (100 µM) • Streptomycin (100 µM) • L-Glutamin (2 mM)
Reperfusionsmedium	<ul style="list-style-type: none"> • Claycomb Medium • FBS (10%) • Penicillin (100 µM) • Streptomycin (100 µM) • L-Glutamin (2 mM)

3.1.3 Mitochondriales Membranpotential

3.1.3.1 Fluoreszenz-Färbung mit MitoTracker Red

Das Prinzip des MitoTracker Red CMXRos beruht auf der Akkumulation des Fluoreszenzfarbstoffes, welche abhängig von dem mitochondrialen Membranpotential ist. Durch diesen Mechanismus ist es möglich die Struktur der Mitochondrien mittels Fluoreszenzmikroskopischer-Analyse zu untersuchen. Für die Färbungen wurden wie in

Kapitel 3.1.2 beschrieben $1,5 \times 10^5$ Zellen auf Deckgläschen in 12-Well-Platten ausplattiert. Um zu vermeiden, dass der MitoTracker Red CMXRos durch Oxidasen im Serum verändert wird, wurde der Farbstoff in Mangelmedium verdünnt. Zu den Versuchszeitpunkten 6, 8, 10 und 12 Stunden wurde der Überstand abgenommen und 500 μ l pro Well der MitoTracker-Lösung in einer Konzentration von 500 nM pipettiert. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C. Der Überstand wurde abgenommen und im Anschluss konnte mit der Immunofluoreszenz-Färbung von Cyt c begonnen werden.

3.1.3.2 Immunofluoreszenz-Färbung mit Cytochrom c

Mit Hilfe einer Immunofluoreszenz-Färbung konnte die subzelluläre Lokalisation von Cyt c während unterschiedlicher Versuchszeitpunkte untersucht werden. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur mit 2% Paraformaldehyd für 15 Minuten fixiert. Daraufhin wurden die Wells dreimal für jeweils 5 Minuten mit TBS gewaschen. Anschließend wurden die Kardiomyozten mit 0,1% Triton-X-100 in TBS für 15 Minuten permeabilisiert. Die Zellen wurden für 1 Stunde in 5% BSA blockiert, welches zuvor in TBS gelöst wurde. Cyt c wurde in der Waschlösung (1% BSA in TBS) 1:50 verdünnt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde der Sekundär-Antikörper Alexa Fluor 488 1:100 in Waschlösung verdünnt und für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:4.000, verdünnt in Waschlösung) für 10 Minuten bei Raumtemperatur angefärbt und die Deckgläschen wurden dreimal für je 10 Minuten mit Waschlösung gewaschen. Abschließend wurden die Deckgläschen mit 3 μ l Mountingmedium auf Objektträger übertragen.

3.1.4 Western Blot

3.1.4.1 Gewinnung und Aufreinigung mitochondrialer und zytosolischer Proteine

Für den Versuch wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen in 60 cm² große Petrischalen ausplattiert. Zu Versuchsbeginn hatten die Kardiomyozyten eine Konfluenz von 80%. Die Kardiomyozyten wurden wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben behandelt. Zu den entsprechenden Versuchszeitpunkten wurden die Petrischalen für die Zellernte auf Eis gestellt. Die Zellen wurden einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend in 1 ml PBS mit Hilfe eines Zellschabers von der Petrischale gelöst und bei 850 xg für 2 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die mitochondrialen und zytosolischen Proteine mit Hilfe des „Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells“ von Thermo

Scientific nach dem Protokoll des Herstellers gewonnen. Reagenz A und C wurden am Anfang mit dem Protease Inhibitor Cocktail versetzt (Verhältnis 1:100).

Um eine Kontamination der mitochondrialen Proteinfraction mit zytosolischen Proteinen zu vermeiden, wurden zwei zusätzliche Waschschrirte hinzugefügt (Abbildung 4). In Vorversuchen wurden die HL-1 Zellen zu Versuchsbeginn ausgezählt (n=4) und die Reagenzien anschließend laut Herstellerinformationen an die Zellzahl zu Versuchsbeginn (3×10^6 Zellen/Petrischale) angepasst.

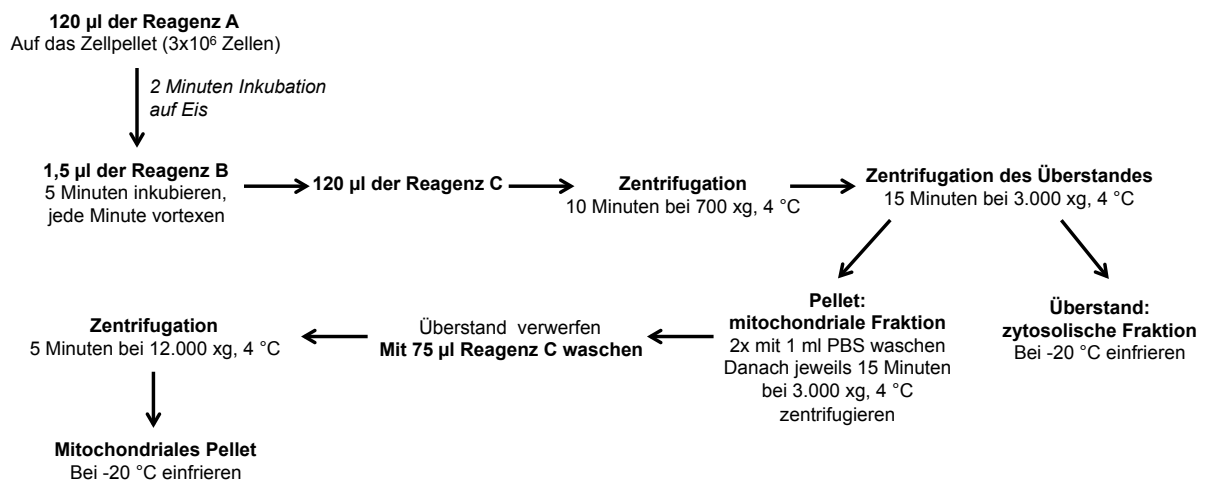


Abbildung 4. Schematische Darstellung der Mitochondrien Isolierung. Die Methode ermöglicht die Gewinnung einer mitochondrialen und einer zytosolischen Proteinfraction

3.1.4.2 Bestimmung der zytosolischen Proteinexpression

Die Proben der zytosolischen Proteinfraction wurden schonend bei 4 °C aufgetaut. Anschließend wurden sie bei mittlerer Geschwindigkeit für 5 Sekunden homogenisiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mittels BCA Protein Assay durchgeführt. Hierfür wurde die zytosolische Proteinfraction 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt. Jeweils 20 µl der Verdünnung wurde für eine Zweifachbestimmung auf eine 96-Multiwell-Platte pipettiert. Bei jeder BCA Bestimmung wurde eine Albumin-Standardreihe mitgeführt. Die BCA-Reagenz wurde nach Herstellerinformation angesetzt (Reagenz 1 und 2 in einem Verhältnis 50+1) und auf jedes Well wurden 200 µl der Reagenz pipettiert. Anschließend wurde die 96-Well Platte für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Zuletzt wurden die Extinktionen der Proben bei 570 nm mit Hilfe eines Plattenphotometers bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe der Albumin-Standardreihe berechnet.

3.1.4.3 Auftrennung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrer molekularen Masse wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS Page) verwendet. Für eine erfolgreiche Gelelektrophorese müssen die Proteine denaturiert und von ihrer dreidimensionalen Faltung in eine lineare Form überführt werden. Aus diesem Grund wurden die Proben bei 95 °C gekocht und die Disulfidbrücken der Tertiärstruktur durch Dithiothreitol (DTT) gespalten. Zusätzlich überführte Natriumdodecylsulfat (SDS) als anionische Detergenz die Proteine in ihre lineare Form.

Die Proben der zytosolischen Proteinfraction wurden auf 10 µg angepasst und mit Probenpuffer (Pierce Lane Marker Reducing Sample Buffer, 5x) versetzt, der DTT enthielt. Das mitochondriale Pellet aus der Proteingewinnung wurde direkt mit je 60 µl Probenpuffer angesetzt. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten bei 95 °C gekocht und bei 12.000 xg zentrifugiert. Zur Auftrennung der Proteine wurden 15% Acrylamid-Gele genutzt.

Tabelle 4. Zusammensetzung der 15% Gele für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

<i>Gel</i>	<i>Aqua bidest.</i>	<i>Acrylamid</i>	<i>Puffer</i>	<i>10% SDS</i>	<i>10% APS</i>	<i>TEMED</i>
<i>Trenngel</i>	4,8 ml	6 ml	3,8 ml 1,5 M TRIS/HCL pH 8,8	150 µl	75 µl	30 µl
<i>Sammelgel</i>	4,5 ml	810 µl	1,9 ml 0,5 M TRIS/HCL pH 6,8	75 µl	57 µl	19 µl

Für die Analyse der zytosolischen Proteinfraction wurden zwischen 40 und 55 µl Proteinkonzentrat geladen. Von der mitochondrialen Proteinfraction wurden jeweils 50 µl Proteinkonzentrat pro Probe geladen. Auf jedes Gel wurden zusätzlich 5 µl der PageRuler Prestained Protein Ladder als molekularer Marker aufgetragen. Die Gelelektrophorese fand zunächst bei 60 V für circa 15-20 Minuten statt bis sich die Proben im Trenngel gesammelt hatten. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine bei 80-100 V für 2 bis 3 Stunden.

3.1.4.4 Western-Blotting

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden mit der Tank-Blot-Methode auf eine PVDF-Membran transferiert. Die PVDF-Membran wurde zuerst für mindestens 10 Minuten in 100% Methanol aktiviert. Das verwendete Filterpapier sowie die Schaumstoffschwämme wurden zuvor in Blotting-Puffer (siehe Tabelle 5) gelegt. Das Gel wurde zwischen der Membran, zwei Filterpapieren, zwei Schaumstoffschwämmen und Kunststoffgittern gespannt und anschließend bei 30 V und 4 °C über Nacht geblottet. Um die Proteinbanden anzufärben und anschließend eine Kopie der Membran zu machen, wurde die Membran am nächsten Tag für 15 Minuten in Ponceau S gefärbt. Die Membranen wurden üblicherweise zwischen 35 und 40 kDa geschnitten.

Tabelle 5. Zusammensetzung des Elektrophorese- und Blotting-Puffers.

<i>Elektrophorese-Puffer</i>	<i>Blotting-Puffer</i>
25 mM TRIS	192 mM Glycin
250 mM Glycin	25 mM TRIS
0,1% SDS	20% Methanol

3.1.4.5 Immundetektion der Proteine

Zur Detektion der Proteine wurde die Membran je nach Herstellerangabe zu dem jeweiligen Primärantikörper in 5% BSA oder 5% Magermilch (jeweils in TBST gelöst) für eine Stunde geblockt. Die Primärantikörper wurden in der Blockierungslösung nach Herstellerinformationen verdünnt und über Nacht auf einem Schüttler bei 4 °C inkubiert. Als nächstes wurde die Membran viermal für je 5 Minuten in TBST gewaschen und danach für 1 Stunde mit dem jeweiligen Sekundärantikörper inkubiert. Es folgten vier weitere Waschschrte mit TBST für je 10 Minuten. Die Detektion der Proteinbanden fand mit dem Chemidoc System statt. Hierfür wurde die Membran nach Abschluss der Waschschrte für 5 Minuten mit Super Signal Dura behandelt. Die Reagenzien enthalten Peroxid und Luminol. Durch das Enzym Meerrettichperoxidase, das an dem Sekundärantikörper gebunden ist, wird das Luminol oxidiert und es entsteht ein luminiszierendes Signal, das mit dem Chemidoc System detektiert und quantifiziert werden kann.

Es wurde jeweils ein Lichtbild der Membran gemacht, um später die Banden der molekularen Masse zuordnen zu können. Die densitometrische Analyse der Banden erfolgte mit dem Programm Quantity One™, BioRad. Die hier errechnete Intensität des Lumineszenz-Signals ist proportional zu der Proteinexpression, die durch die Antikörperbindung sichtbar gemacht wird. Anschließend wurde die Intensität der Banden mittels ImageLab, Version 4.1, BioRad ausgewertet. Die Werte wurden in eine Excel-Tabelle überführt und gegen die Kontrollgruppe normalisiert. Die Antikörper Cyt c, AIF, Bcl-2, Bax und Hsp70 wurden dabei sowohl auf der Membran der zytosolischen Proteinfraction als auch auf der Membran der mitochondrialen Proteinfraction inkubiert. Dadurch konnten ein Vergleich der Proteinexpressionen gezogen werden.

Als zytosolische Ladekontrolle wurde das Protein β -Aktin verwendet, während COX IV als mitochondriale Ladekontrolle diente. Eine ungleiche Beladung der Gele konnte somit rechnerisch ausgeglichen werden. Dies war vor allem bei der mitochondrialen Proteinfraction wichtig, da keine Proteinbestimmung durchgeführt werden konnte.

Tabelle 6. Anwendung der Antikörper.

Antikörper	Verdünnung	Blockierung	sekundärer Antikörper
AIF	1:1.000 in 5% BSA	5% Serumalbumin in TBST	Esel anti-Kaninchen 1:20.000
β -Aktin	1:15.000 in TBST	5% Serumalbumin in TBST	Esel anti-Kaninchen 1:20.000
Bax	1:1.000 in 5% BSA	5% Serumalbumin in TBST	Esel anti-Kaninchen 1:20.000
Bcl-2	1:1.000 in 5% BSA	5% Serumalbumin in TBST	Esel anti-Kaninchen 1:20.000
Cytochrom c	1:1.000 in 5% Magermilch	5% Magermilchpulver in TBST	Esel anti-Kaninchen 1:20.000
COX IV	1:1.000 in 5% BSA	5% Serumalbumin in TBST	Esel anti-Maus 1:10.000
Hsp70	1:1.000 in 5% BSA	5% Serumalbumin in TBST	Esel anti-Kaninchen 1:20.000
LC3-II	1:1.000 in 5% BSA	5% Serumalbumin in TBST	Esel anti-Kaninchen 1:20.000

Um mehrere Proteine auf einer Membran zu detektieren, wurde die Membran gestriipt, das heißt die Primär- und Sekundärantikörper wurden mit Hilfe des Stripping-Buffers von der Membran gelöst. Hierfür wurde die Membran für dreimal 10 Minuten mit jeweils 3 ml Stripping-Puffer behandelt und anschließend dreimal für 10 Minuten mit TBST gewaschen (siehe Tabelle 7). Im nächsten Schritt konnte eine erneute Blockierung der

Membranen stattfinden und es erfolgte die Inkubation eines weiteren Primärantikörpers über Nacht. Dabei wurde eine Membran maximal viermal gestrippt.

Tabelle 7. Zusammensetzung des Waschpuffers TBST und des Stripping-Puffers.

1x TBST	Stripping-Puffer
20 mM TRIS	Guanidin Hydrochlorid 6 M
140 mM NaCl	Triton X-100 0,3%
0,05% Tween20	TRIS/HCL 20 mM pH 7,5
	β-Mercaptoethanol 0,1 M

3.2 Teil 2: Versuche mit primären Kardiomyozyten

3.2.1 Isolierung und Kultivierung primärer Kardiomyozyten

Die primären Kardiomyozyten wurden mithilfe des Pierce Primary Cardiomyocyte Isolation Kit gewonnen und kultiviert. Für die Isolation der Kardiomyozyten wurden einen Tag alte Mäuse des Stamms C57/BL6 N verwendet. Dabei wurde vor Versuchsbeginn eine Anzeige für die Tötung von Tieren zur Entnahme von Organen und Geweben beim Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin unter der Projektnummer T 0044/08 beantragt, die am 03.03.2008 genehmigt wurde. Die Tiere wurden aus der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin der Charité-Universitätsmedizin Berlin bezogen. Nach Entnahme der Herzen wurde die Isolation wie im Kit beschrieben durchgeführt. Zunächst wurden die Herzen in HBSS vorsichtig in 1–3 mm³ große Stücke geschnitten. Anschließend wurden die Kardiomyozyten mithilfe der Enzyme Papain und Thermolysin aus dem Verbund gelöst (30-35 Minuten Inkubation bei 37 °C). Anschließend wurde sie in Wachstumsmedium resuspendiert, welches aus DMEM-Medium (Pierce Primary Cardiomyocyte Isolation Kit), 10% FBS (Merck Millipore), 100 µM Penicillin und Streptomycin bestand. Es wurden 2,4x10⁶ Zellen auf 9,2 cm² große Petrischalen ausplattiert und für 7 Tage kultiviert. Um den Anteil der Fibroblasten zu verringern und eine möglichst reine primäre Kardiomyozytenkultur zu erreichen, wurde dem Wachstumsmedium 24 Stunden nach Isolierung ein Kardiomyozyten spezifischer Wachstumszusatz nach Herstellerinformationen beigefügt. Ein Mediumwechsel fand alle 2 bis 3 Tage statt.

3.2.2 Durchführung der Ischämie/Reperfusions-Versuche

3.2.2.1 Versuchsdurchführung mit primären Kardiomyozyten

Die primären Kardiomyozyten wurden ebenfalls einer wie in Kapitel 3.1.2.1 beschriebenen simulierten I/R ausgesetzt. Vor Beginn der simulierten Ischämie wurden die Zellen mit Mangelmedium gewaschen. Die Kontrollgruppe wurde mit Vollmedium behandelt und bei 37 °C und 21% Sauerstoff inkubiert (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8. Zusammensetzung der Versuchsmedien für primäre Kardiomyozyten.

Medien	Inhaltsstoffe
Mangelmedium zuvor bei 0,2% Sauerstoff äquilibriert	<ul style="list-style-type: none">• DMEM ohne Glukose• Penicillin (100 µM)• Streptomycin (100 µM)
Vollmedium	<ul style="list-style-type: none">• DMEM mit Glukose (Pierce Primary Cardiomyocyte Isolation Kit)• FBS (10%, Merck Millipore)• Penicillin (100 µM)• Streptomycin (100 µM)

3.2.3 Bestimmung der Zellviabilität

3.2.3.1 Zytotoxizitätsbestimmung mittels LDH-Assay

Die Bestimmung der Zytotoxizität erfolgte durch ein Zytotoxizitäts-Kit. Das Kit bestimmt mittels kolorimetrischer Messung die Aktivität der Laktat Dehydrogenase (LDH). LDH ist ein zytosolisches Protein, welches in jeder Zelle vorhanden ist. Sobald die Zellmembran beschädigt ist, wird es vermehrt in den extrazellulären Raum freigegeben. Das Prinzip des Assays beruht auf der LDH-abhängigen Reduktion des gelben Tetrazolium Salz zu dem roten Formazan Salz, welches photometrisch gemessen werden kann. Das Formazan wird direkt proportional zu der LDH-Konzentration im Überstand gebildet. Für die Bestimmung des LDH-Gehaltes wurde der Zellüberstand abgenommen und für 5 Minuten bei 12.000 xg zentrifugiert. Von jeder Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt, bei der jeweils 100 µl in eine 96-Multiwell Platte pipettiert wurden. Die Reaktionslösung setzte sich aus dem Tetrazolium Salz und Natrium-Laktat sowie dem Katalysator Diaphorase/NAD⁺ in einem Verhältnis 1:46 zusammen. Es wurden jeweils

100 µl der Reaktionslösung auf die Überstände gegeben und anschließend für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend fand die photometrische Messung der Proben mittels Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 492 nm statt. Zusätzlich wurde durch das Einfrieren der Zellen bei -80°C für 15 Minuten eine maximale LDH-Konzentration bestimmt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, die weder Ischämie noch Hypothermie erfahren hatten und für 6 Stunden mit Vollmedium behandelt worden waren. Die optische Dichte der verschiedenen Medien wurde ebenfalls bestimmt. Abschließend wurde die Zytotoxizität nach Herstellerinformation berechnet:

$$\text{Zytotoxizität (\%)} = \frac{\text{Messwert}_{\text{Zeitpunkt x}} - \text{Kontrolle}_{\text{Zeitpunkt x}}}{\text{Maximal LDH} - \text{Kontrolle}_{\text{Zeitpunkt x}}} \times 100$$

3.2.3.2 Bestimmung der Troponin-T-Konzentration als Zelltodmarker

Kardiales Troponin T (cTnT) ist ein spezifischer Biomarker für myokardiale Schädigung. Da cTnT in der gesunden Herzmuskelzelle ein Bestandteil des kontraktiles Apparates ist, deutet eine Freisetzung von Troponin T auf einen Zelluntergang hin. Daher wurde für die Beurteilung der Zellviabilität cTnT in Zellüberständen analysiert. Die quantitative Bestimmung des freigesetzten cTnT erfolgte im Labor Berlin mittels Elektrochemilumineszenz-Immunoassays (Charité Vivantes GmbH).

3.3 Statistische Analyse

Die Daten wurden mittels GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) graphisch dargestellt und statistisch analysiert. Die statistische Analyse wurde nur bei Experimenten durchgeführt, die mindestens viermal mit unterschiedlichen Zellpassagen unabhängig voneinander wiederholt wurden. Gruppenanalysen wurden mittels One-Way ANOVA mit dem Newman-Keuls als post-hoc-Test ausgewertet. Die statistische Auswertung zweier nicht gepaarter Stichproben zu den jeweiligen Versuchszeitpunkten erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test, da nicht von einer Normalverteilung der Proben auszugehen war. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. P-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet und mit * markiert.

4 Ergebnisse

4.1 Teil 1: Hypothermie und HL-1 Kardiomyozyten

Die folgenden Ergebnisse konzentrieren sich auf die molekularen Mechanismen der Kardioprotektion durch früh induzierte Hypothermie (intra-OGD therapeutische Hypothermie, IOTH) mit einem Fokus auf die Induktion der mitochondrialen Apoptose.

4.1.1 Einfluss auf mitochondriale Membranintegrität

Die Integrität der mitochondrialen Membran wurde sowohl mittels Western Blot- als auch mittels Fluoreszenzmikroskopischen-Analysen ausgewertet. Hierfür wurde die Proteinexpression von Cyt c und AIF bestimmt. Um die intrazelluläre Translokation dieser beiden mitochondrialen Proteine zu erfassen, wurden sowohl mitochondriale als auch zytosolische Proteinfractionen ausgewertet. Die subzelluläre Lokalisation von Cyt c wurde zusätzlich mittels Immunofluoreszenz-Färbung visualisiert und als Kontrolle wurden die Mitochondrien mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker Red markiert.

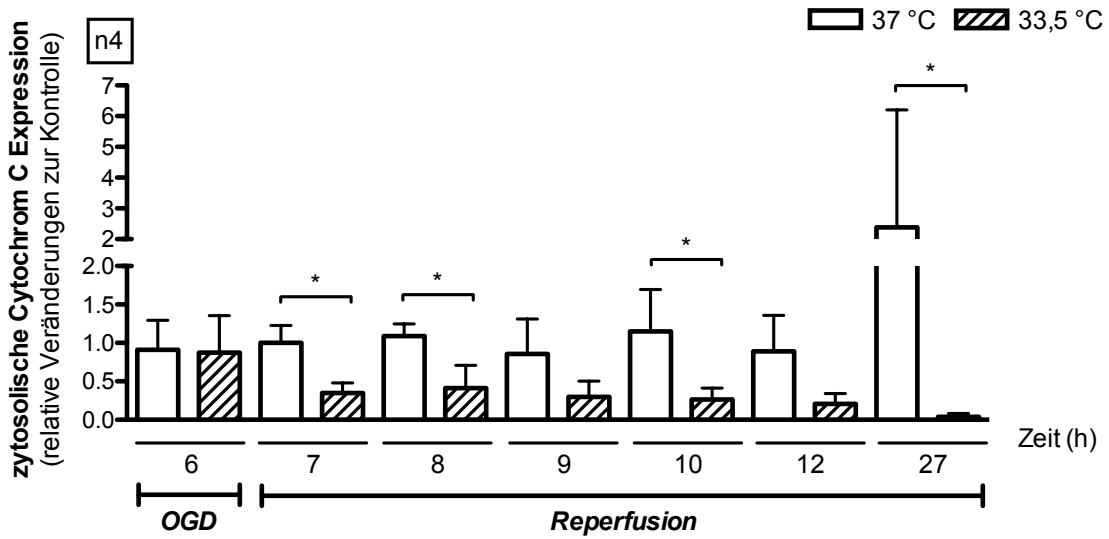
4.1.1.1 Cytochrom c Proteinexpression

Cyt c ist ein mitochondriales Protein, welches wie in Kapitel 1.3.3 beschrieben den Caspase-abhängigen intrinsischen Zelltod induziert. Die zytosolische Proteinexpression wurde densitometrisch ausgewertet und gegen β -Aktin normalisiert. Die Daten werden jeweils als relative Veränderung im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Normoxie 37 °C) zu dem jeweiligen Versuchszeitpunkt angegeben (Abbildung 5). In der hypothermen Versuchsgruppe liegt eine signifikant geringere Cyt c Freisetzung vor, die schon in der frühen Reperfusionphase (7, 8 und 10 Stunden), aber auch zu späten Reperfusionzeitpunkten (27 Stunden) auffällt (Abbildung 5A). Die zytosolische Expression von Cyt c liegt nach 7 Stunden in der normothermen Versuchsgruppe bei $1,00 \pm 0,48$, während die Proteinexpression der hypothermen Gruppe mit $0,35 \pm 0,13$ signifikant reduziert ist ($p=0,0286$). Diese signifikante Reduktion des zytosolischen Cyt c bleibt auch zu dem Versuchszeitpunkt 8 Stunden erhalten ($1,09 \pm 0,16$ vs. $0,41 \pm 0,3$, $p=0,029$). Zu den Zeitpunkten 9 und 12 Stunden zeichnet sich ein Trend einer geringeren Cyt c Freisetzung in der hypothermen Versuchsgruppe ab, der jedoch nicht statistisch signifikant ist. 10 Stunden nach Versuchsbeginn weist die hypotherme Versuchsgruppe einen signifikant geringeren zytosolischen Proteingehalt auf als die

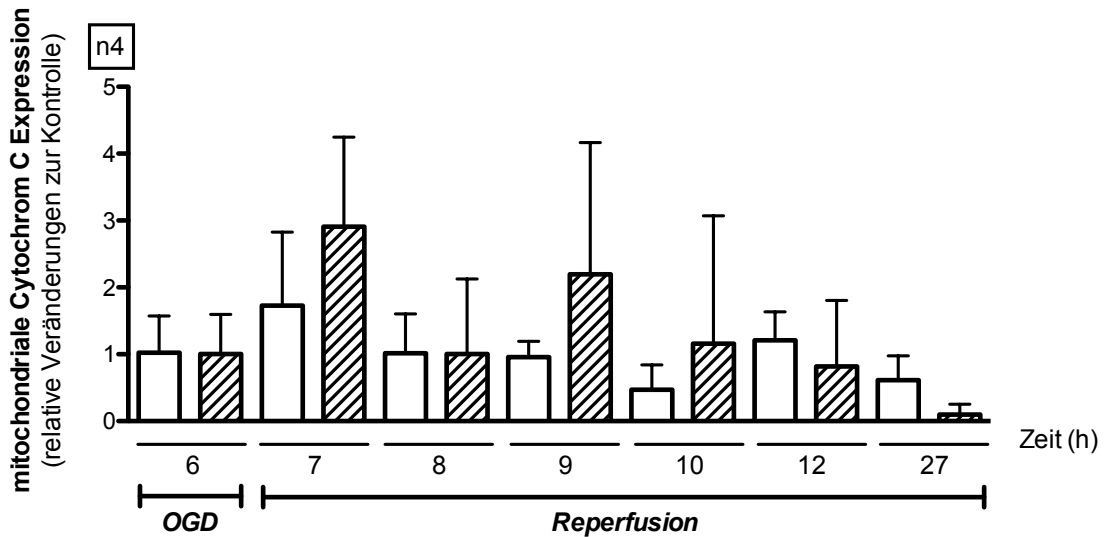
normotherme Gruppe ($1,15 \pm 0,55$ vs. $0,26 \pm 0,15$, $p=0,0286$). Auch nach insgesamt 21 Stunden Reperfusion (Versuchszeitpunkt 27 Stunden) ist die Freisetzung von Cyt c der hypothermen Gruppe signifikant verringert. In der normothermen Versuchsgruppe liegt die zytosolische Cyt c Proteinexpression bei $2,38 \pm 3,82$, während die gekühlten Zellen mit $0,04 \pm 0,04$ signifikant weniger Cyt c aufweisen ($p = 0,0286$).

Um die Dynamik der mitochondrialen Freisetzung zu analysieren, wurde die mitochondriale Expression von Cyt c ebenfalls ausgewertet und dabei gegen die mitochondriale Ladekontrolle COX IV normalisiert (Abbildung 5B). Die statistische Analyse der Daten lieferte keine signifikanten Ergebnisse. Allerdings ist erkennbar, dass im Mitochondrium der normothermen Versuchsgruppe 7, 9 und 10 Stunden nach Versuchsbeginn weniger Cyt c vorliegt als in der gekühlten Gruppe.

A



B



C

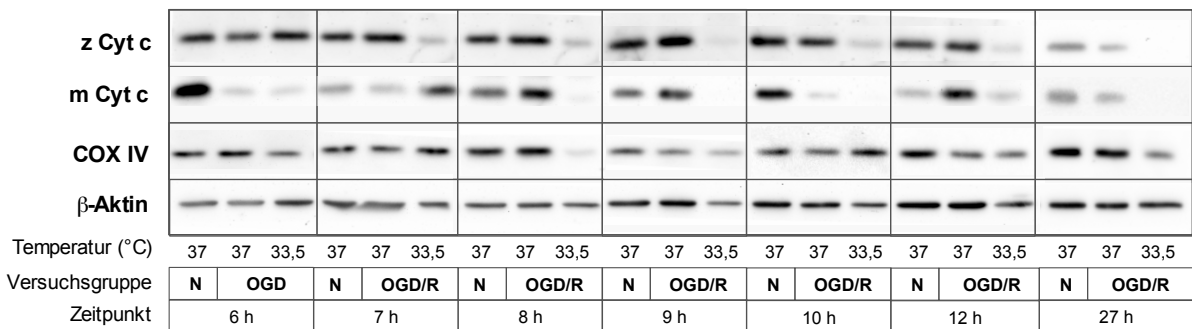


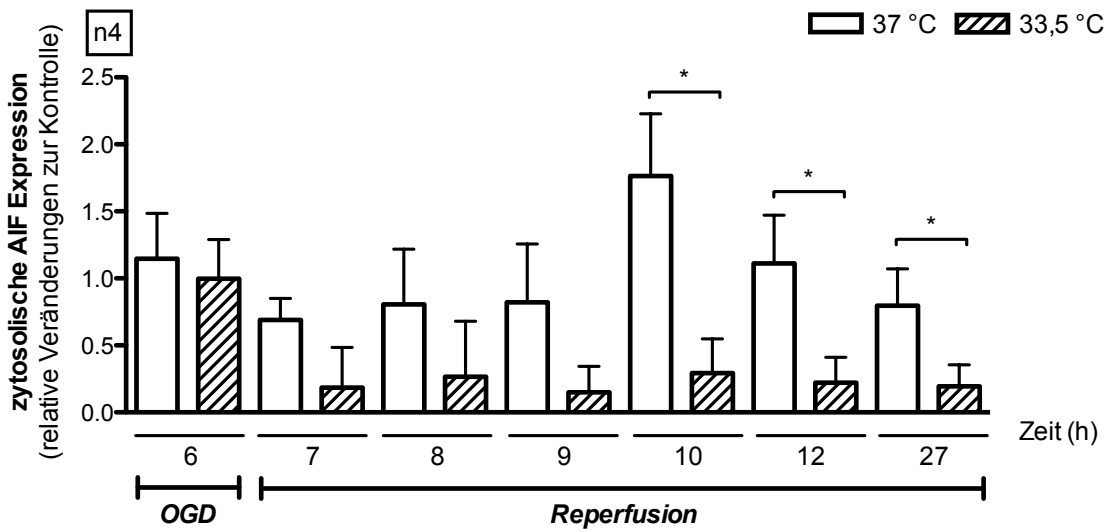
Abbildung 5. Effekte der IOTH auf die zytosolische und mitochondriale Cytochrom c Expression. Western Blot-Analyse der Cytochrom c Proteinexpression. **(A)** Zytosolische Proteinexpression, normalisiert gegen β -Aktin. **(B)** mitochondriale Proteinexpression, normalisiert gegen COX IV. **(C)** Zeigt repräsentative Banden (z=zytosolisch, m=mitochondrial, N=Normoxie, OGD=oxygen-glucose deprivation, R=Reperfusion). Die Daten werden als Mittelwert \pm SD aus n=4 dargestellt und zeigen die x-fache Veränderung im Vergleich zu der Kontrollgruppe Normoxie 37 °C=1 zum jeweiligen Versuchszeitpunkt. *P < 0,05.

4.1.1.2 AIF Proteinexpression

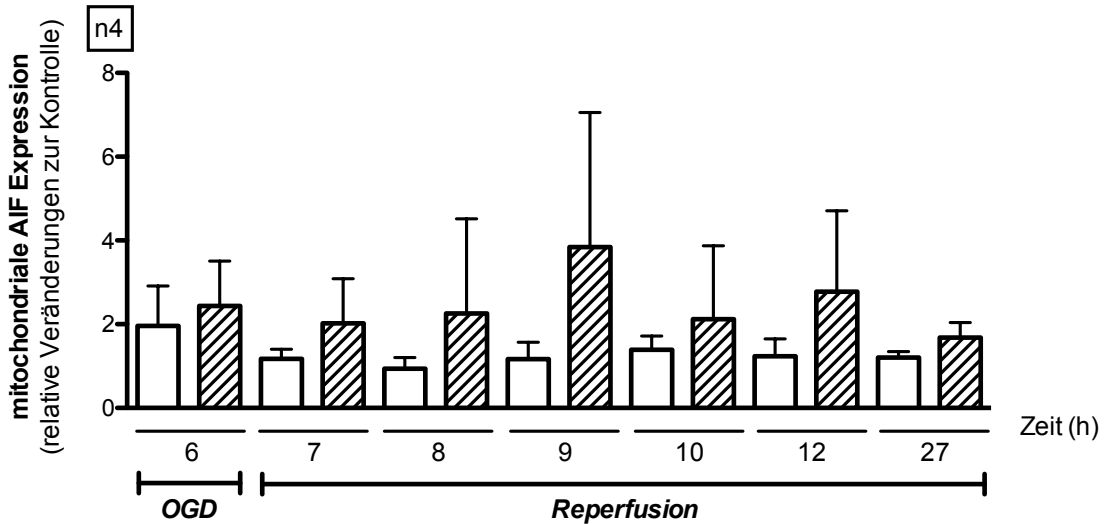
AIF ist ein mitochondriales Intermembranprotein, welches wie in Kapitel 1.3.3 beschrieben den Caspase-unabhängigen Zelltod induziert. Die zytosolische AIF Expression wurde gegen β -Aktin normalisiert. Die Proteinexpression wird als relative Veränderung im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Normoxie 37 °C) angegeben (Abbildung 6A). Zu den Versuchszeitpunkten 7, 8 und 9 Stunden ist ein nicht signifikanter Trend erkennbar, dass die zytosolische AIF Expression in der gekühlten Gruppe vermindert ist. 10 Stunden nach Versuchsbeginn ist die zytosolische Proteinexpression der gekühlten Zellen mit $0,29 \pm 0,25$ gegenüber $1,76 \pm 0,47$ der normothermen Versuchsgruppe signifikant vermindert ($p=0,0286$). Diese signifikante Reduktion der AIF-Freisetzung bleibt in der hypothermen Versuchsgruppe auch nach 12 und 27 Stunden erhalten ($1,11 \pm 0,36$ vs. $0,22 \pm 0,2$ und $0,8 \pm 0,28$ vs. $0,2 \pm 0,16$; $p = 0,0286$).

Die statistische Auswertung der mitochondrialen Proteinexpression ergab keine signifikanten Ergebnisse. Es liegt jedoch ein Trend vor, dass der mitochondriale Proteingehalt in der hypothermen Versuchsgruppe höher ist als in der normothermen Gruppe (Abbildung 6B).

A



B



C

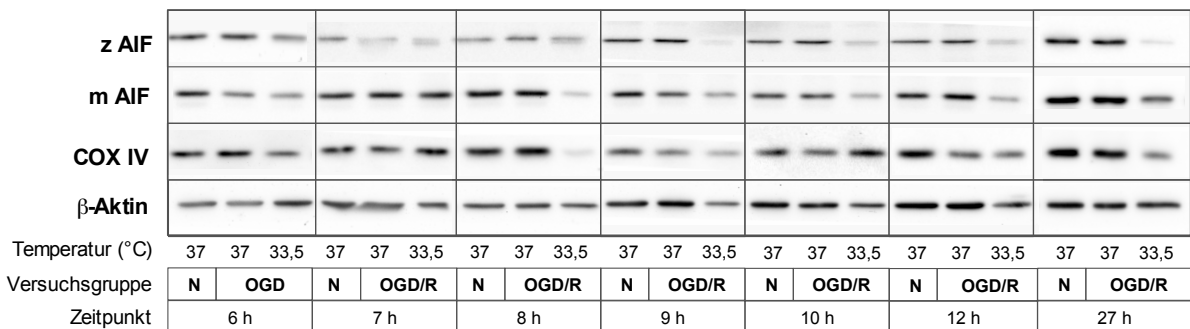


Abbildung 6. Effekte der IOTH auf die zytosolische und mitochondriale AIF Expression. Western Blot-Analyse der AIF Proteinexpression. **(A)** Zytosolische Proteinexpression, normalisiert gegen β -Aktin. **(B)** Mitochondriale Proteinexpression, normalisiert gegen COX IV. **(C)** Zeigt repräsentative Banden (z=zytosolisch, m=mitochondrial, N=Normoxie, OGD=oxygen-glucose deprivation, R=Reperfusion). Die Daten werden als Mittelwert \pm SD aus n=4 dargestellt und zeigen die x-fache Veränderung im Vergleich zu der Kontrollgruppe Normoxie 37 °C=1 zum jeweiligen Versuchszeitpunkt. *P < 0,05.

4.1.1.3 Cytochrom c und MitoTracker Red Fluoreszenz-Färbung

Zusätzlich zu den Western-Blot Analysen wurde die Cyt c Freisetzung mittels Immunofluoreszenz-Färbung visualisiert (Abbildung 7 und 8). In der Kontrollgruppe (Normoxie 37 °C) folgt die intrazelluläre Verteilung des Cyt c einem strukturierten Verteilungsmuster. Die Anordnung erscheint punktuell und entspricht der Anordnung der Mitochondrien in den Kardiomyozyten. Diese deckungsgleiche Verteilung von Cyt c und Mitochondrien wird durch die Markierung der Mitochondrien mittels MitoTracker Red sichtbar (Abbildung 7 und 8). Allerdings geht die strukturierte Verteilung des Cyt c zu den Versuchszeitpunkten 8 und 10 Stunden in der normothermen Versuchsgruppe verloren (Abbildung 8). Auch der Farbstoff MitoTracker Red ist im Vergleich zur Kontrollgruppe zu dem Versuchszeitpunkt 10 Stunden diffus verteilt und erscheint ausgelöscht. Die hypotherme Versuchsgruppe weist zu allen Versuchszeitpunkten eine sehr klar erkennbare Färbung der Mitochondrien mittels MitoTracker Red auf, die sich mit den Verteilungsmustern von Cyt c deckt.

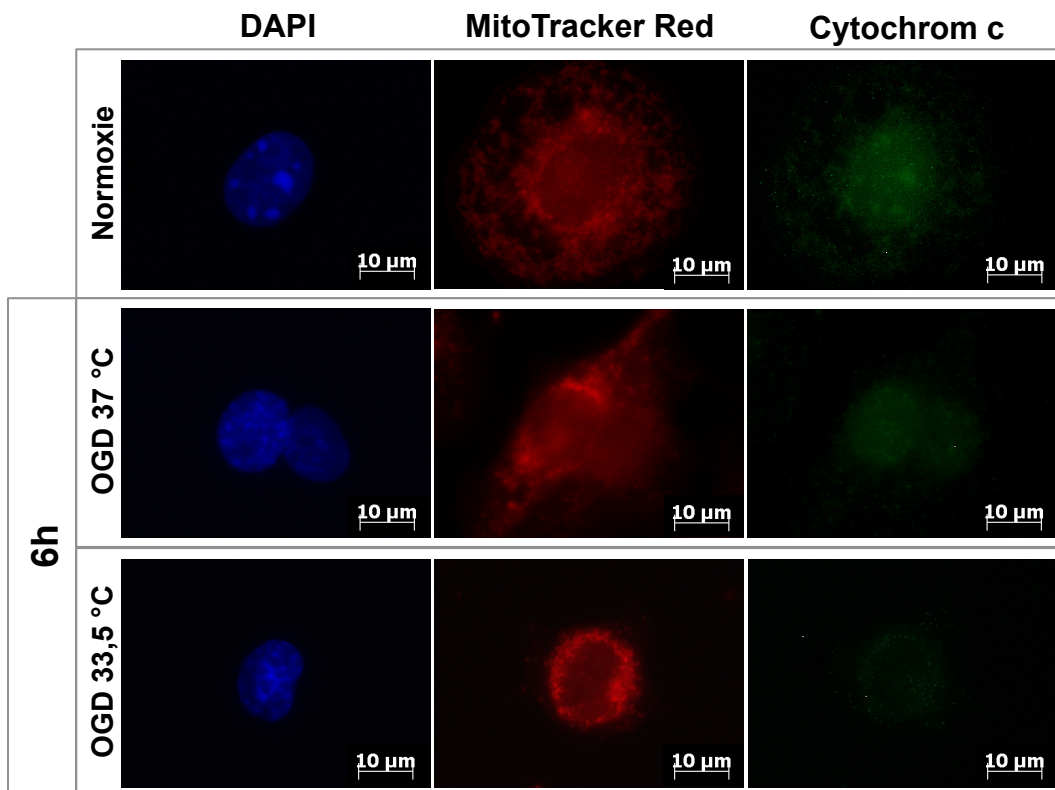


Abbildung 7. Effekte der IOTH auf die mitochondriale Membranintegrität 1. Fluoreszenz-Analysen mit DAPI, MitoTracker Red und Cyt c nach 6 Stunden OGD. Kontrollgruppe (Normoxie 37 °C) zum Vergleich.

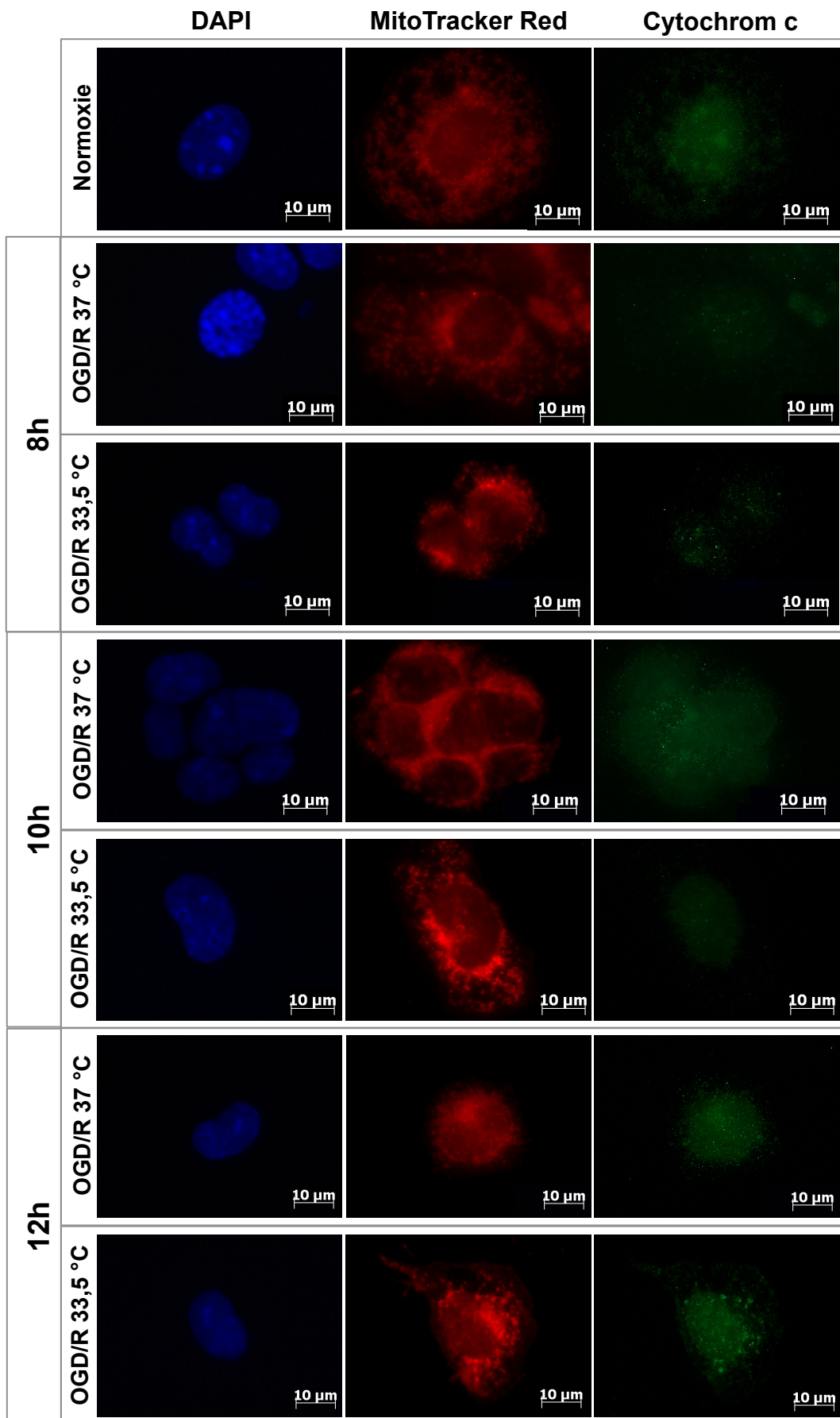


Abbildung 8. Effekte der IOTH auf die mitochondriale Membranintegrität 2. Fluoreszenz-Analysen mit DAPI, MitoTracker Red und Cyt c. Überblick über die Versuchszeitpunkte 8, 10 und 12 Stunden. Kontrollgruppe (Normoxie 37 °C) zum Vergleich.

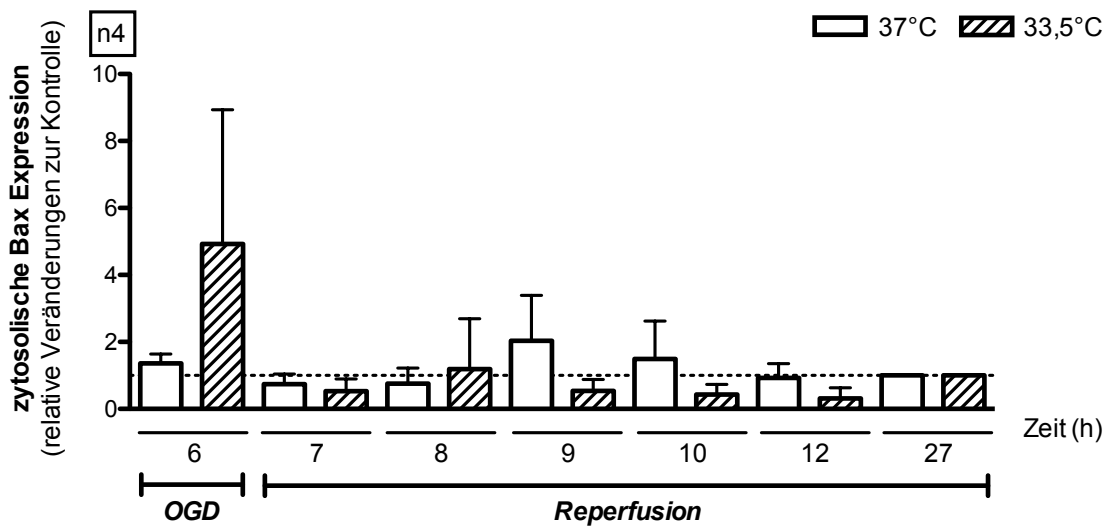
4.1.2 Einfluss auf die Bcl-2 und Bax Proteinexpression

4.1.2.1 Bax Proteinexpression

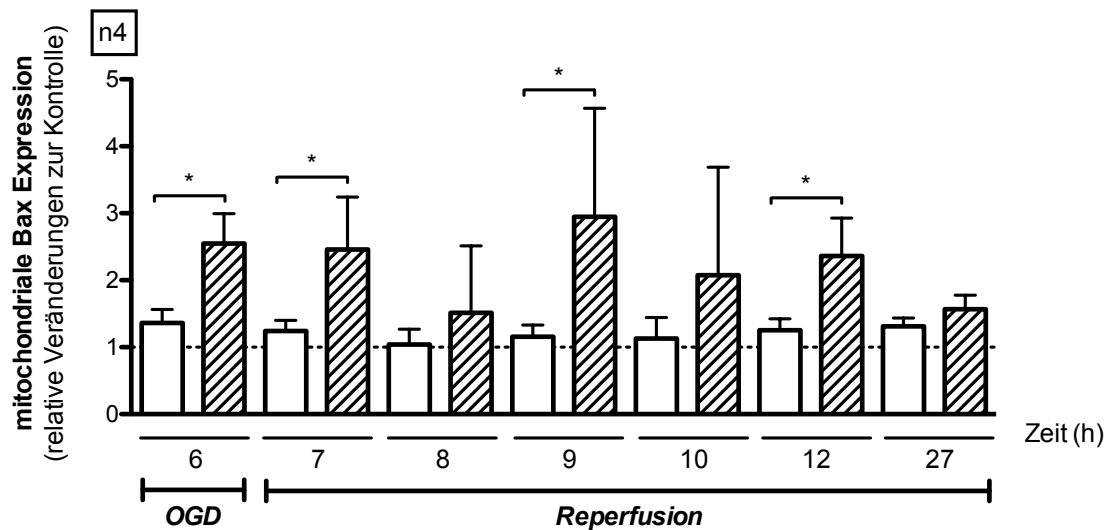
Das pro-apoptotische Bax liegt im Zytosol vor und trägt zu der Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran bei (siehe Kapitel 1.3.3). Es wurde sowohl die zytosolische als auch die mitochondriale Proteinexpression bestimmt und gegen die entsprechenden Ladekontrollen normalisiert (Abbildung 9A und B). Die Daten stellen die relative Veränderung im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Normoxie 37 °C) zu dem jeweiligen Versuchszeitpunkt dar. Die zytosolische Bax Expression lässt keine signifikanten Unterschiede zwischen der hypothermen und der normothermen Versuchsgruppe erkennen (Abbildung 9A). Es ist jedoch ein Trend erkennbar, dass Bax nach 6 Stunden OGD in der gekühlten Gruppe vermehrt vorliegt.

In der mitochondrialen Proteinfraction sind hingegen signifikante Regulationen von Bax durch TH erkennbar (Abbildung 9B). Nach 6 Stunden OGD liegt die Expression von Bax in der normotherme Gruppe bei $1,61 \pm 0,20$, während sie in der hypothermen Gruppe bei $2,55 \pm 0,45$ liegt ($p=0,0286$). Auch nach 7 Stunden bleibt diese signifikante Regulation in der hypothermen Versuchsgruppe erhalten ($1,24 \pm 0,16$ vs. $2,46 \pm 0,78$; $p=0,0286$). Zu den Versuchszeitpunkten 8, 10 und 27 Stunden liegen keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf den mitochondrialen Proteingehalt von Bax vor. Allerdings ist die Expression von Bax in der hypothermen Gruppe im Vergleich zu der normothermen Versuchsgruppe nach 9 und 12 Stunden signifikant erhöht ($1,16 \pm 0,17$ vs. $2,95 \pm 1,62$ und $1,25 \pm 0,17$ vs. $2,36 \pm 0,56$; $p=0,0286$).

A



B



C

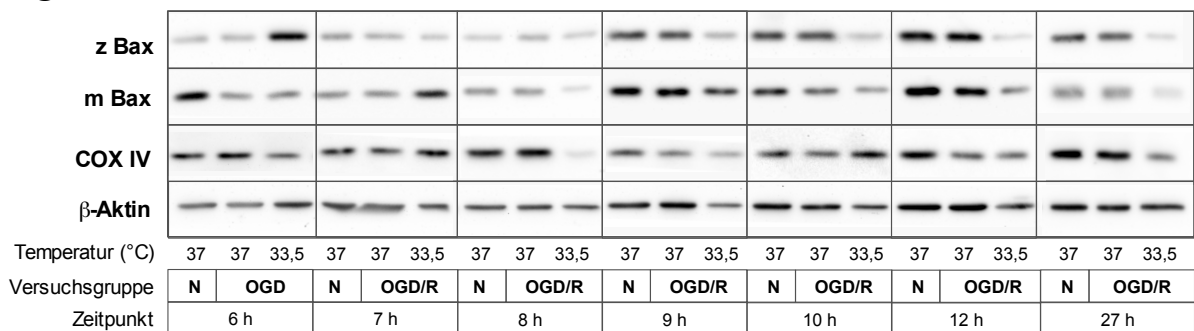


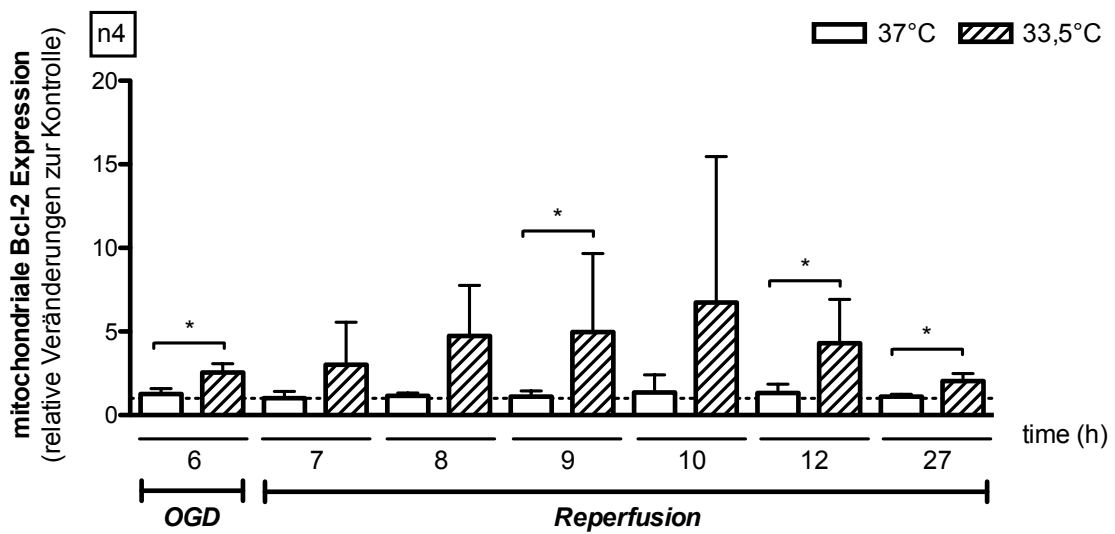
Abbildung 9. Effekte der IOTH auf die Expression des pro-apoptischen Bax. Western Blot-Analyse der (A) zytosolischen Bax Proteinexpression normalisiert gegen β -Aktin und (B) der mitochondrialen Bax Proteinexpression normalisiert gegen COX IV. (C) Zeigt repräsentative Banden (z=zytosolisch, m=mitochondrial, N=Normoxie, OGD=oxygen-glucose deprivation, R=Reperfusion). Die Daten werden als Mittelwert \pm SD aus n=4 dargestellt und zeigen die x-fache Veränderung im Vergleich zu der Kontrollgruppe Normoxie 37 °C=1 zum jeweiligen Versuchszeitpunkt. *P < 0,05.

4.1.2.2 Bcl-2 Proteinexpression

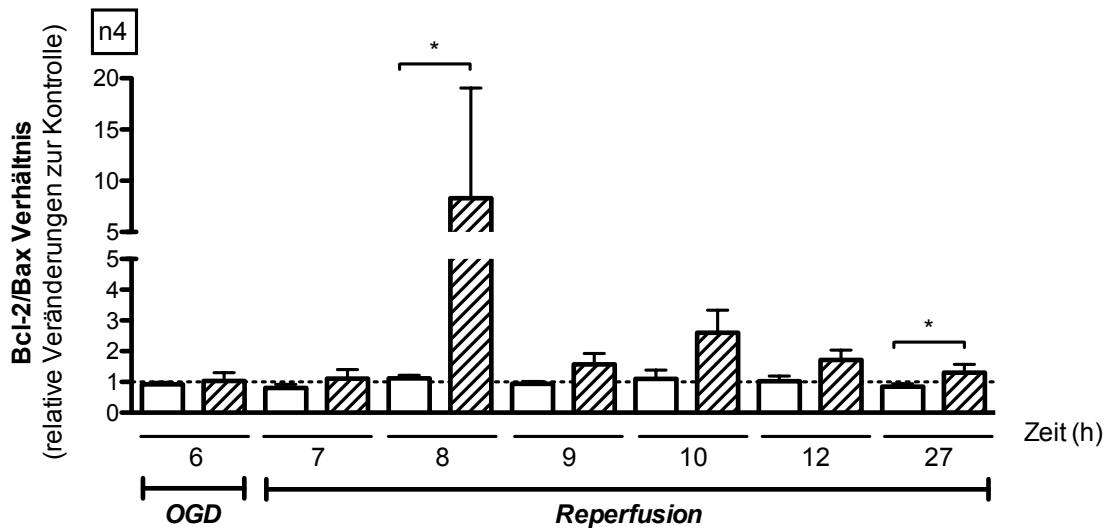
Bcl-2 ist im Mitochondrium an die äußere mitochondriale Membran gebunden und stabilisiert die Membranintegrität, indem Bcl-2 die pro-apoptotische Wirkung von Bax antagonisiert (siehe Kapitel 1.3.3). Die mitochondriale Proteinfraction wurde gegen COX IV normalisiert. Die Daten geben die relative Veränderung im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Normoxie 37 °C) zu dem jeweiligen Versuchszeitpunkt an. Die gekühlte Versuchsgruppe zeigt eine signifikant höhere Expression als die normotherme Versuchsgruppe (Abbildung 10A). Nach 6 Stunden OGD liegt der Proteingehalt von Bcl-2 in der normothermen Versuchsgruppe bei $1,26 \pm 0,32$, während er in der hypothermen Versuchsgruppe um das $2,56 \pm 0,51$ -fache erhöht ist ($p=0,0286$). Auch während der Reperfusion ist die Expression von Bcl-2 in gekühlten Zellen erhöht. So liegt sie zu dem Versuchszeitpunkt 9 Stunden in der normothermen Gruppe bei $1,11 \pm 0,35$ und in der hypothermen bei $4,975 \pm 4,688$ ($p=0,0286$). Auch 12 und 27 Stunden nach Versuchsbeginn ist die Bcl-2 Expression in der hypothermen Versuchsgruppe im Vergleich zu den ungekühlten Zellen signifikant reguliert ($1,33 \pm 0,53$ vs. $4,31 \pm 2,61$ und $1,11 \pm 0,14$ vs. $2,04 \pm 0,46$; $p=0,0286$).

Um die Inhibition der Apoptose durch Bcl-2 zu bestimmen, wurde das anti-apoptotische Verhältnis von Bcl-2 und Bax bestimmt (Abbildung 10B). Im Vergleich zu der nicht gekühlten Versuchsgruppe zeigt sich nach 8 Stunden ein signifikant höheres Bcl-2/Bax-Verhältnis in der hypothermen Gruppe ($1,12 \pm 0,21$ vs. $8,3 \pm 10,75$; $p=0,0286$). Auch nach insgesamt 21 Stunden Reperfusion (27 Stunden nach Versuchsbeginn) ist das Bcl-2/Bax-Verhältnis in der hypothermen Gruppe mit $1,31 \pm 0,27$ im Vergleich zu der normothermen Versuchsgruppe bei $0,85 \pm 0,1$ signifikant erhöht ($p=0,0286$).

A



B



C

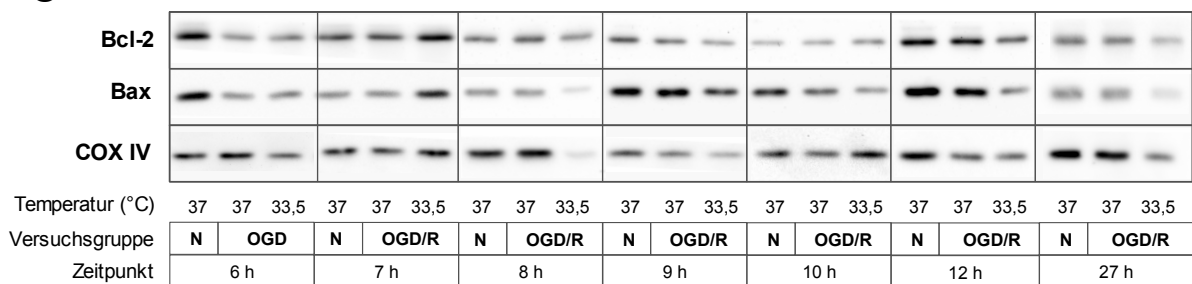


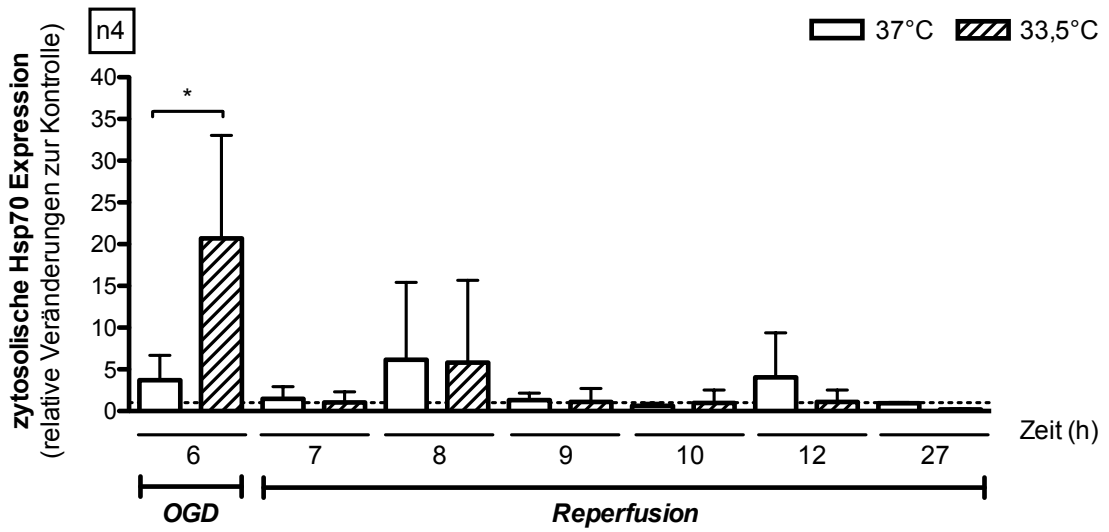
Abbildung 10. Effekte der IOTH auf die Expression des anti-apoptotischen Bcl-2. Western Blot-Analyse der (A) mitochondrialen Bcl-2 Expression, normalisiert gegen COX IV und (B) dem mitochondrialen Bcl-2/Bax-Verhältnis. (C) Zeigt repräsentative Banden (z=zytosolisch, m=mitochondrial, N=Normoxie, OGD=oxygen-glucose deprivation, R=Reperfusion). Die Daten werden als Mittelwert±SD aus n=4 dargestellt und zeigen die x-fache Veränderung im Vergleich zu der Kontrollgruppe Normoxie 37 °C=1 zum jeweiligen Versuchszeitpunkt. *P < 0,05.

4.1.3 Einfluss auf die Hsp70 Proteinexpression

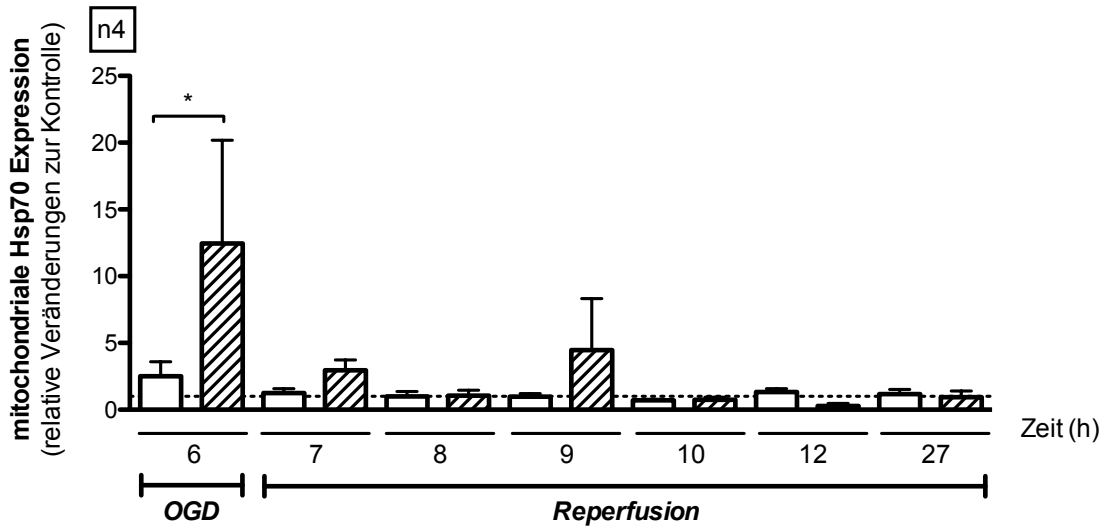
Hsp70 blockiert nicht nur den Caspase-abhängigen, sondern auch den Caspase-unabhängigen Zelltod und weist somit multimodale Eigenschaften auf, die das Zellüberleben regulieren (siehe Kapitel 1.3.3). Die zytosolische Proteinexpression wurde gegen β -Aktin normalisiert und ist als relative Veränderungen in Bezug auf die Kontrollgruppe (Normoxie 37 °C) angegeben. Die Expression des zytosolischen Hsp70 ist in der gekühlten Versuchsgruppe nach 6 Stunden OGD signifikant erhöht (Abbildung 11A). Dabei liegt die zytosolische Expression von Hsp70 in der normothermen Versuchsgruppe bei $3,72 \pm 2,97$, während gekühlte Zellen eine Proteinexpression von $20,69 \pm 12,35$ aufweisen ($p=0,0013$). Während der Reperfusion liegen keine signifikanten Regulationen des zytosolischen Hsp70 vor.

Des Weiteren zeigt die Analyse der mitochondrialen Proteinfraction, dass auch das mitochondriale Hsp70 in den gekühlten Zellen nach 6 Stunden OGD signifikant erhöht ist. Dabei weisen die normothermen Kardiomyozyten eine Expression von $2,52 \pm 2,17$ auf, während das mitochondriale Hsp70 in der hypothermen Versuchsgruppe auf das $12,46 \pm 7,73$ -fache erhöht ist ($p=0,0001$). Zu den anderen Versuchszeitpunkten liegen keine signifikanten Regulationen vor.

A



B



C

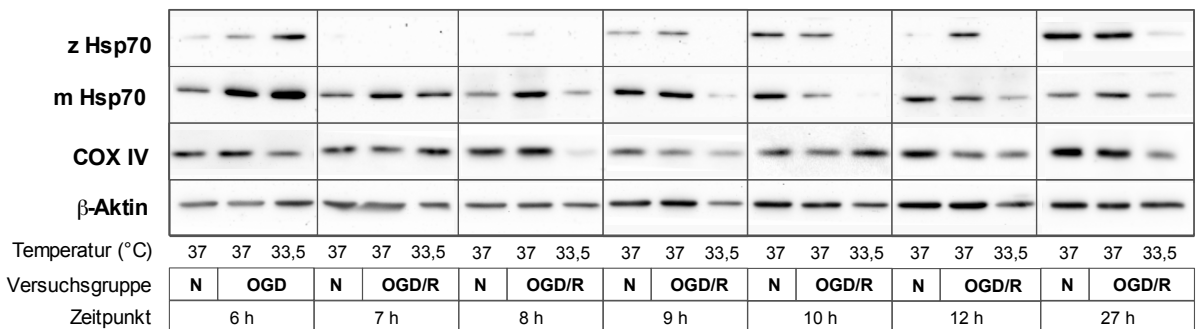


Abbildung 11. Effekte der IOTH auf die Expression von Hsp70. Western Blot-Analyse der (A) zytosolischen Hsp70 Expression, normalisiert gegen β -Aktin, und der (B) mitochondrialen Hsp70 Expression, normalisiert gegen COX IV. (C) Zeigt repräsentative Banden (z=zytosolisch, m=mitochondrial, N=Normoxie, OGD=oxygen-glucose deprivation, R=Reperfusion). Die Daten werden als Mittelwert \pm SD aus n=4 dargestellt und zeigen die x-fache Veränderung im Vergleich zu der Kontrollgruppe Normoxie 37 °C=1 zum jeweiligen Versuchszeitpunkt. *P < 0,05.

4.1.4 Einfluss auf Autophagie-Aktivität

LC3-II ist an der Formierung der Phagophore beteiligt, die den initialen Schritt in der Autophagie-Kaskade darstellt (siehe Abbildung 2). Daher ist die Bestimmung der LC3-II Expression ein etablierter Marker für die Autophagie-Aktivität einer Zelle [111]. Da die Autophagie dysfunktionaler Mitochondrien durch die Bindung von LC3-II an der mitochondrialen Membran initiiert wird, wurde die LC3-II Expression in der mitochondrialen Proteinfraction densitometrisch ausgewertet und gegen die mitochondriale Ladekontrolle COX IV normalisiert [112]. Die Daten geben die relative Veränderung in Bezug auf die Kontrollgruppe (Normoxie 37 °C) zum jeweiligen Versuchszeitpunkt an.

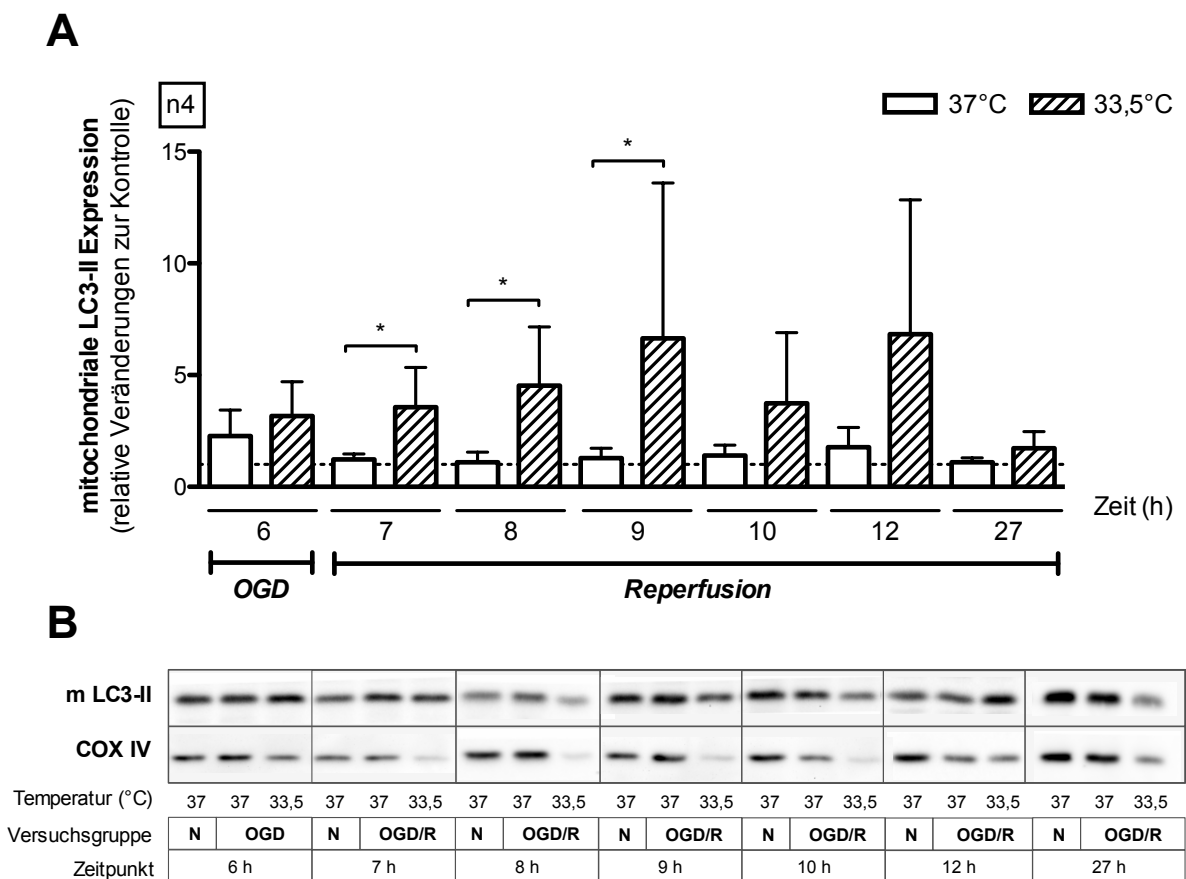


Abbildung 12. Effekte der IOTH auf die Expression von LC3-II. (A) Western Blot Analyse der mitochondrialen LC3-II Proteinexpression, normalisiert gegen COX IV. **(B)** Zeigt repräsentative Banden (N=Normoxie, OGD=oxygen-glucose deprivation, R=Reperfusion). Die Daten werden als Mittelwert±SD aus n=4 dargestellt und zeigen die x-fache Veränderung im Vergleich zu der Kontrollgruppe Normoxie 37 °C=1 zum jeweiligen Versuchszeitpunkt. *P < 0,05.

Die Hypothermie reguliert die mitochondriale LC3-II Expression in der frühen Reperfusionphase signifikant. Bereits eine Stunde nach Reperfusion (Versuchszeitpunkt 7 h) ist LC3-II in der hypothermen Gruppe mit $3,17 \pm 1,53$ gegenüber der normothermen Versuchsgruppe mit $1,22 \pm 0,25$ signifikant reguliert ($p=0,0286$). Diese signifikant erhöhte LC3-II Expression der gekühlten Zellen bleibt auch 8 Stunden nach Versuchsbeginn ($1,10 \pm 0,45$ vs. $4,53 \pm 2,63$) und 9 Stunden nach Versuchsbeginn ($1,29 \pm 0,44$ vs. $6,64 \pm 6,96$) erhalten ($p=0,0286$). Zu späteren Zeitpunkten liegt jedoch keine signifikante Regulation vor (Abbildung 12).

4.2 Teil 2: Hypothermie und primäre Kardiomyozyten

Die primären Kardiomyozyten wurden aus Mäuseherzen isoliert und sind nicht passagierbar. Der 7-tägige Kultivierungsprozess wurde zuvor in der Arbeitsgruppe etabliert. Nach Zugabe eines Kardiomyozyten spezifischen Wachstumszusatzes lag eine reine Kardiomyozyten-Kultur vor. Allerdings konnte ein Fibroblasten-Anteil von circa 10% durch den Isolationsprozess nicht ausgeschlossen werden (Daten werden nicht gezeigt). Da primäre Zellen ein physiologisches Modell für die Analyse Kardiomyozyten-spezifischer Signalkaskaden darstellen, wurde das an HL-1 Zellen etablierte Schädigungsmodell auf primäre Kardiomyozyten übertragen und der Einfluss der Hypothermie an primären Zellen untersucht.

4.2.1 Etablierung eines Zeit-Temperatur-Protokolls für primäre Kardiomyozyten

Die primären Kardiomyozyten wurden zunächst für 6 Stunden der durch OGD simulierten Ischämie ausgesetzt. Dabei wurde die hypotherme Versuchsgruppe 3 Stunden nach Beginn der OGD-Phase auf $33,5\text{ °C}$ gekühlt (Abbildung 13A). In diesen Vorversuchen konnte trotz adäquater Schädigung kein protektiver Effekt der Hypothermie gesehen werden (Daten werden nicht gezeigt). Die Etablierung des Kühlungsprotokolls an HL-1 Zellen zeigte, dass der Zeitpunkt der Kühlung entscheidend ist und eine frühe intra-ischämische Kühlung den Zelluntergang nach OGD/R vermindert. [77]. Aus diesem Grund wurde das Zeit-Temperatur-Protokoll geändert, indem die Kühlung der hypothermen Versuchsgruppe bereits nach einer Stunde OGD induziert wurde (Abbildung 13B).

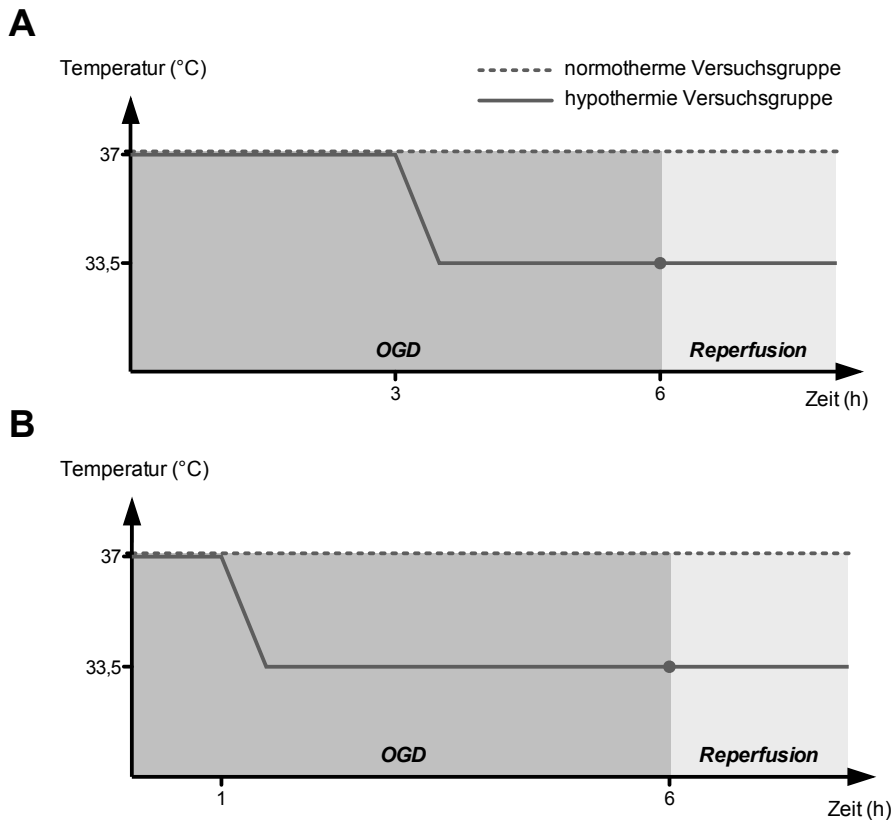


Abbildung 13. Etablierung eines Zeit-Temperatur-Protokolls für primäre Kardiomyozyten. In Vorversuchen **(A)** wurde nach 3 Stunden auf 33,5 °C gekühlt. **(B)** Zeigt das Zeit-Temperatur-Protokoll, das für die gezeigten Ergebnisse verwendet wurde. Die hypotherme Versuchsgruppe wurde bereits nach 1 Stunde OGD auf 33,5 °C gekühlt.

4.2.2 Einfluss der Hypothermie auf die Zellvitalität

4.2.2.1 Einfluss auf die Zytotoxizität

Zur Bestimmung des Zelluntergangs durch OGD/Reperfusion wurde die LDH-Freisetzung im Zellüberstand ausgewertet. Im nächsten Schritt wurden mit Hilfe der Maximalschädigung die Zytotoxizitäten berechnet (siehe Kapitel 3.2.3). In der normothermen Versuchsgruppe weisen die Zellen nach der sechsstündigen OGD-Phase eine Zytotoxizität von $57,38 \pm 14,63\%$ auf (Abbildung 14A). Die Zytotoxizität in der gekühlten Versuchsgruppe ist jedoch signifikant auf $35,26 \pm 10,71\%$ reduziert ($p=0,0286$).

4.2.2.2 Einfluss auf die Troponin T-Freisetzung

Zusätzlich wurde der Kardiomyozyten-spezifische Schädigungsmarker Troponin T in den Zellüberständen bestimmt. Dabei zeigen die Daten die relative Veränderung im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Normoxie 31 °C). Die cTnT-Freisetzung der normothermen Versuchsgruppe liegt nach 6 Stunden OGD bei $0,773 \pm 0,893$ ng/l (Abbildung 14B). Die hypotherme Gruppe weist jedoch eine signifikant verminderte cTnT-Freisetzung mit $0,26 \pm 0,47$ ng/l auf ($p=0,0001$).

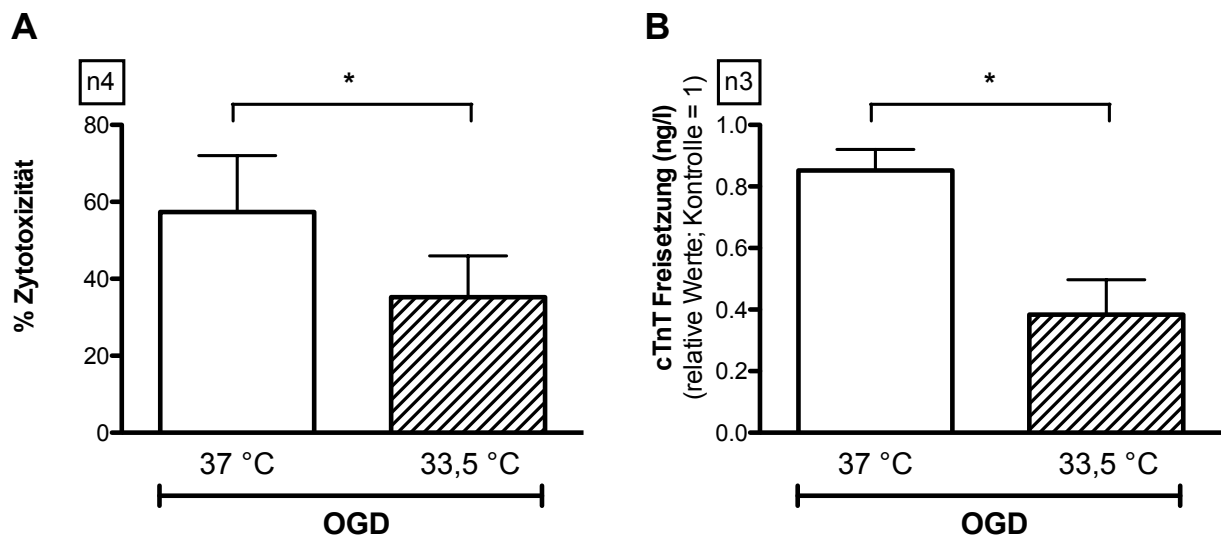


Abbildung 14. Effekte der IOTH auf die Zellviabilität primärer Kardiomyozyten. (A) Zytotoxizität; n=4 und (B) cTnT-Freisetzung; n=3. Die Daten werden als Mittelwert \pm SD dargestellt und zeigen die x-fache Veränderung im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Normoxie 37 °C) zum jeweiligen Versuchszeitpunkt. *P < 0,05.

5 Diskussion

Tierstudien konnten zeigen, dass intra-ischämische therapeutische Hypothermie (TH) die kardiale Leistung verbessert und das Infarktareal reduziert. Aufgrund der kontroversen klinischen Studienlage ist die TH jedoch keine etablierte kardioprotektive Therapie bei myokardialer Ischämie/Reperfusion (siehe Kapitel 1.2.2). In dem Bereich der Neuroprotektion hingegen ist die TH eine anerkannte und bei Erwachsenen nach Herzkreislaufstillstand und Kindern mit perinataler Asphyxie sogar eine leitliniengerechte Therapie [43, 44]. Um eine effektive Translation der TH als kardioprotektive Therapie zu ermöglichen, müssen die Effekte der Hypothermie auf zellulärer Ebene untersucht und verstanden werden. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der Hypothermie auf die mitochondriale Integrität und die intrinsische Apoptose an einer Kardiomyozyten Zelllinie untersucht. Hierfür wurden HL-1 Zellen verwendet, die morphologisch, biochemisch und elektrophysiologisch differenzierten Kardiomyozyten gleichen und sich als Untersuchungsmodell für I/R und Apoptose bewährt haben [104, 110, 113-115]. Die Ischämie wurde mittels Sauerstoff- und Glukoseentzug (oxygen-glucose deprivation, OGD) simuliert. Dabei wurden die Kardiomyozyten bereits während dieser Phase gekühlt (intra-OGD therapeutische Hypothermie, IOTH). In dem zweiten Teil der Arbeit wurde das etablierte Versuchsprotokoll auf primären Kardiomyozyten übertragen, um den Einfluss der IOTH auf primäre Zellen zu untersuchen und mit den Ergebnissen der Zelllinie zu vergleichen.

5.1 Teil 1: Hypothermie und HL-1 Kardiomyozyten

5.1.1 Hypothermie und intrinsische Apoptose

Bei myokardialer I/R spielt der apoptotische Zelluntergang eine große Rolle [116-119]. In dem hier beschriebenen OGD/R-Schädigungsmodell konnte eine Aktivierung der Caspase 3 in der Reperfusionsphase beobachtet werden [77]. Die Induktion der Apoptose in der Reperfusion wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bestätigt [120-122]. Obwohl bei HL-1 Zellen [77, 78] und primären Zellen [70] beobachtet wurde, dass Kühlung während simulierter I/R den Zelluntergang der Kardiomyozyten signifikant verringert, ist der Einfluss der TH auf die Einleitung der intrinsischen Apoptose nicht geklärt. Bei HL-1 Kardiomyozyten führte die IOTH zu einer signifikanten Reduktion der Caspase 3 Aktivierung [77]. Diese Beobachtung ist eine mögliche Erklärung für den verminderten

Zelluntergang der Kardiomyozyten durch IOTH. Da die Aktivierung der Caspase 3 als Effektor-Caspase einen Endpunkt verschiedener pro-apoptotischer Wege darstellt, können die protektiven Mechanismen der TH nur verstanden werden, indem die vorangegangenen Signalkaskaden untersucht werden. Da die Freisetzung mitochondrialer Proteine unter anderem zu der Aktivierung der Caspase 3 führt (siehe Abbildung 1), wurde in der vorliegenden Arbeit die Aktivität der intrinsischen Apoptose in OGD/R-geschädigten HL-1 Kardiomyozyten untersucht.

5.1.1.1 Mitochondriale Membranintegrität und Induktion intrinsischer Apoptose

In den Western Blot- und Immunfluoreszenz-Analysen konnte gezeigt werden, dass OGD/R zu einer Permeabilisierung der mitochondrialen Membran und damit zu einer Freisetzung von Cyt c und AIF in das Zytosol führt (Abbildung 5 bis 8). Die Aktivierung der intrinsischen Apoptose scheint eine wichtige Rolle im Zelluntergang von I/R-geschädigten Kardiomyozyten zu spielen. Vanden Hoek et al. konnten in Versuchen mit primären Kardiomyozyten zeigen, dass eine simulierte I/R bereits 5 Minuten nach Reperfusionbeginn zu einer Cyt c Freisetzung führte, während es durch simulierte Ischämie allein nicht zu einer Caspase-Aktivierung kam [120]. Kang et al. berichteten ebenfalls von einer Reperfusions-induzierten Cyt c Freisetzung. Während der simulierten Ischämie hingegen wurde ausschließlich nicht-apoptotischer Zelluntergang beobachtet [123]. Das Schädigungsmodell OGD/R führte auch in primären neonatalen Kardiomyozyten zu mitochondrialer Cyt c Freisetzung [124]. Neben der Caspase-Aktivierung durch Cyt c trägt die durch AIF induzierte Apoptose ebenfalls zu dem Zelluntergang im I/R-geschädigten Myokard bei. Eine *in vivo* Studie von Kim et al. beobachtete beispielsweise, dass es in Abhängigkeit von der Dauer der Reperfusion zur mitochondrialen AIF-Freisetzung kam während die Freisetzung von Cyt c nicht beeinflusst wurde [125]. Die Einleitung der Caspase-unabhängigen Apoptose durch I/R wurde auch von Zhang et al. beschrieben [126].

Zuständig für die Permeabilisierung der mitochondrialen Membran ist wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben die Öffnung der mitochondrialen Pore (mPTP). IOTH führte in den HL-1 Zellen zu einer Stabilisierung der mitochondrialen Membranintegrität (Abbildung 7 und 8). Eine *in vitro* Studie von Huang et al. konnte an H9c2 Kardiomyozyten zeigen, dass TH (31°C) während simulierter Ischämie die Permeabilisierung der Mitochondrien signifikant

reduzierte [78]. Tissier et al. untersuchten hingegen die Öffnung der mPTP *in vivo* und beobachteten, dass die Öffnung der mPTP nach myokardialer Ischämie durch Kühlung (32 °C) inhibiert wurde [52].

In der vorliegenden Arbeit führte IOTH sowohl während der frühen als auch während der späten Reperfusionsphase zu einer signifikanten Reduktion der Cyt c Freisetzung in das Zytosol (Abbildung 5A). Zytosolisches Cyt c bildet zusammen mit Apaf-1 den Apoptosom-Komplex und aktiviert Caspase 9, die wiederum die Effektor-Caspase 3 aktiviert (siehe Kapitel 1.3.3 und Abbildung 1). Der Erhalt der mitochondrialen Membranintegrität und die damit einhergehende verminderte mitochondriale Cyt c Freisetzung erklärt somit die bereits beobachtete Reduktion der Caspase 3 Aktivität in HL-1 Zellen [77]. Huang et al. berichten ebenfalls von einer Reduktion der Caspase 9 Aktivierung, die ebenfalls durch eine reduzierte Cyt c Freisetzung zu erklären ist [78].

Des Weiteren wurde die Freisetzung von AIF durch IOTH signifikant reduziert (Abbildung 6A). Zytosolisches AIF transloziert zum Zellkern und führt wie in Kapitel 1.3.3 beschrieben Caspase-unabhängig zu der Kondensation von Chromatin und Fragmentierung der DNA. Zusätzlich verstärkt zytosolisches AIF die Freisetzung von Cyt c und somit indirekt die Einleitung der Caspase-abhängigen Apoptose [85]. Choudhury et al. zeigten, dass der Zelltod im murinen I/R-geschädigten Herzen signifikant verringert werden kann, indem die Translokation von AIF inhibiert wird [98]. Insgesamt führte IOTH zu dem Erhalt der mitochondrialen Membranintegrität und reduzierte somit die Freisetzung mitochondrialer Apoptose-Effektoren. Somit verhindert die Hypothermie bereits auf mitochondrialer Ebene die Einleitung der Caspase-abhängigen und -unabhängigen Apoptose und reguliert dadurch den Zelluntergang während der Reperfusionsphase.

5.1.1.2 Regulation der anti-apoptotischen Bcl-2 Expression

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in der hypothermen Versuchsgruppe sowohl nach 6 Stunden OGD als auch während der Reperfusion signifikant mehr mitochondriales Bax vorlag (Abbildung 9B). Bax ist ein zytosolisches Protein, das zu der Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran (MOMP) führt (siehe Kapitel 1.3.3). Schellenberg et al. beobachtete, dass Bax kontinuierlich zwischen Zytosol und Mitochondrium transloziert. Während Bax in gesunden Zellen immer wieder zurück in das Zytosol transportiert wird, kommt es in apoptotischen Zellen zur

Adhärenz an die mitochondriale Membran. Diese kontinuierliche Dissoziation von der mitochondrialen Membran in nicht-apoptotischen Zellen scheint unabhängig von Bcl-2 zu sein [127]. Somit muss die erhöhte Bax Expression der hypothermen Versuchsgruppe keinen Einfluss auf das Zellüberleben nehmen. Außerdem ermöglicht die Methode der Western Blot-Analyse keine Aussage über Protein-Protein Interaktionen. Aus diesem Grund konnten nur Bax Monomere (20 kDa) analysiert werden und nicht die Poren formierenden Bax-Oligomere. Daher kann auf Grundlage der hier vorgestellten Ergebnisse keine endgültige Aussage über die Bedeutung des erhöhten mitochondrialen Bax Proteinexpression in der gekühlten Versuchsgruppe getroffen werden.

IOTH erhöhte signifikant die Bcl-2 Expression während der OGD-Phase und während der Reperfusionsphase (Abbildung 10A). Bcl-2 ist als membrangebundenes Protein Bestandteil der äußeren mitochondrialen Membran und stabilisiert wie in Kapitel 1.3.3 beschrieben die mitochondriale Membranintegrität. Kang et al. zeigten an primären Kardiomyozyten, dass eine erhöhte Bcl-2-Expression während der Reperfusion die Zellviabilität erhöhte und die Freisetzung von Cyt c sowie die Aktivierung von Caspase 9 und 3 signifikant reduzierte [123].

Trotz der gleichfalls erhöhten Bax-Expression, erhöhte IOTH das anti-apoptotische Verhältnis Bcl-2/Bax während der Reperfusion signifikant (Abbildung 10B). Insgesamt ist die Datenlage zum Einfluss der Hypothermie auf die Bcl-2 Expression gering. In I/R-Experimenten an perfundierten Kaninchen-Herzen konnte gezeigt werden, dass Kühlung (30 °C) vor der Ischämie die Bcl-2 Expression erhöhte [75]. Yang et al. zeigten an humanen Endothelzellen (HUVECs), dass TH (33 °C) nach der OGD-Phase die Bcl-2 Expression signifikant steigerte, während die Expression von Bax reduziert wurde. Allerdings wurden die Bax- und Bcl-2 Proteinexpressionen in der gesamten Zelle bestimmt und nicht zwischen mitochondrialer und zytosolischer Expression unterschieden [128]. Die Regulation des anti-apoptotischen Bcl-2/Bax Verhältnisses als protektiver Mechanismus der Hypothermie konnte auch von Diestel et al. an H₂O₂-geschädigten H9c2 Kardiomyozyten beobachtet werden [129].

Insgesamt wurde gezeigt, dass IOTH das anti-apoptotisch wirkende Bcl-2 induziert. Diese Beobachtung bietet eine mögliche Erklärung, wie IOTH die mitochondriale

Membranintegrität stabilisiert und den zuvor beschriebenen Ausstrom mitochondrialer Apoptose-Effektoren vermindert.

5.1.1.3 Regulation der anti-apoptotischen Hsp70 Expression

Es konnte gezeigt werden, dass die zytosolische Hsp70 Expression in der hypothermen Versuchsgruppe während der OGD-Phase signifikant erhöht war (Abbildung 11A). Wie in Kapitel 1.3.3 beschrieben, inhibiert Hsp70 sowohl die Caspase-abhängige als auch die Caspase-unabhängige Apoptose. Mehrere *in vivo Studien* beobachteten, dass eine Induktion der Hsp70 Expression den Zelluntergang der I/R-geschädigten Kardiomyozyten verringert [130-133]. Choudhury et al. bewiesen *in vivo*, dass Hsp70 den apoptotischen Zelluntergang und die Größe des Infarktareals entscheidend beeinflusst [98]. Die vermehrte Hsp70 Expression liefert somit eine weitere Erklärung für die erhöhte Zellviabilität der gekühlten Versuchsgruppe. Da Hsp70 die Caspase-Kaskade auf zytosolischer Ebene inhibiert (siehe Kapitel 1.3.3 und Abbildung 1), bietet die erhöhte zytosolische Hsp70 Expression eine weitere Erklärung für die verminderte Caspase 3 Aktivierung in der gekühlten Versuchsgruppe. Während Bcl-2 auf mitochondrialer Ebene anti-apoptotisch wirkt und die Freisetzung der mitochondrialen Apoptose-Effektoren Cyt c und AIF verhindert, kann Hsp70 auf zytosolischer Ebene beide Wege der intrinsischen Apoptose direkt inhibieren.

Darüber hinaus wurde der mitochondriale Hsp70 (mHSP70) Proteingehalt in der OGD-Phase durch IOTH signifikant erhöht (Abbildung 11B). Williamson et al. zeigte an I/R-geschädigten primären Kardiomyozyten, dass eine induzierte Überexpression des mHsp70 die Zellviabilität erhöht und einer mitochondrialen Dysfunktion entgegenwirkt [134]. Das mHsp70 ist an der Aufnahme antioxidativer Proteine in das Mitochondrium beteiligt. Somit reguliert mHsp70 beispielsweise die Mitochondrien spezifische Mangan Superoxiddismutase (MnSOD), die für die Eliminierung von Superoxid Radikalen zuständig ist [134]. Da die Überproduktion von ROS eine zentrale Rolle in der Entstehung des Reperfusionsschadens spielt (siehe Kapitel 1.1.2), hat der antioxidative Schutz während der Reperfusion einen protektiven Einfluss.

Insgesamt stellt die Regulation des zytosolischen und mitochondrialen Hsp70 einen wichtigen protektiven Mechanismus der IOTH dar, der die Zellviabilität multimodal beeinflusst. Einerseits inhibiert das durch Hypothermie regulierte Hsp70 sowohl die

Caspase-abhängige als auch die Caspase-unabhängige Apoptose auf zytosolischer Ebene (siehe Abbildung 1). Andererseits erklärt eine durch IOTH erhöhte Expression des mHsp70 den Schutz des Mitochondriums vor oxidativem Stress, der letztendlich zu dem Erhalt der mitochondrialen Membranintegrität während der Reperfusion beiträgt.

5.1.2 Hypothermie und Autophagie

IOTH erhöhte die mitochondriale LC3-II Expression in den ersten 3 Stunden der Reperfusion signifikant (Abbildung 12). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass der Prozess der Autophagie dysfunktionaler Mitochondrien, auch Mitophagie genannt, in gekühlten Zellen erhöht war. Die Studienlage zu dem Einfluss der TH auf die Aktivität der Autophagie ist umstritten. Cheng et. al untersuchten moderate Hypothermie (32 °C) vor und nach simulierter Ischämie an H9c2 Kardiomyozyten und zeigten, dass TH sowohl den Zelltod als auch die Induktion von Autophagie vermindert. Dabei reduzierte sowohl die prä-ischämisch als auch die post-ischämisch induzierte Hypothermie die LC3-II Expression während der Reperusionsphase signifikant [135]. Jin et al. hingegen zeigten, dass moderate Hypothermie nach Schädel-Hirn-Trauma *in vivo* zu einer erhöhten Aktivität der Autophagie führt, die mit einer gesteigerten Viabilität der Neuronen einhergeht [136].

Autophagie als zelleigenes Recycling-System stellt einen wichtigen Prozess für die Regulation des Zellüberlebens dar. Vor allem während Phasen der Nährstoffunterversorgung und Hypoxie gewährleistet die Autophagie eine kontinuierliche ATP-Produktion und reguliert gleichzeitig die Einleitung der Apoptose [137-139]. Mehrere *in vitro* und *in vivo* Studien berichteten von dem kardioprotektiven Potential der Autophagie bei myokardialer I/R [102, 104, 105]. Hamacher-Brady et al. untersuchten die Aktivität der Autophagie an HL-1 Zellen und zeigten, dass die lysosomale Aktivität und die Formierung der Autophagosomen während simulierter I/R vermindert ist. Die Induktion der Autophagie allerdings reduzierte die Expression des pro-apoptotischen Bax und den Zelltod durch Apoptose signifikant [104]. Eine weitere *in vitro* Studie von Matsui et al. beobachtete, dass der Zelltod primärer Kardiomyozyten durch Inhibition der Autophagie verstärkt wurde [102]. Obwohl diese Ergebnisse dafür sprechen, dass die Autophagie einen protektiven Mechanismus während myokardialer I/R darstellt, zeigten andere Studien eine erhöhte Zellviabilität durch Inhibition der Autophagie [106, 107].

Die Autophagie in I/R-geschädigten Kardiomyozyten ist unter anderem von dem Protein Beclin-1 abhängig [102]. Dabei interagiert Beclin-1 mit Bcl-2 und leitet die Bildung des Autophagosoms ein, sobald es von dieser Protein-Protein Bindung dissoziiert [140, 141]. Somit inhibiert Bcl-2 über die Bindung von Beclin-1 die Autophagie [138]. Mit Hilfe der Western Blot-Analyse können keine Protein-Protein Interaktionen untersucht werden, aus diesem Grund kann keine Aussage über den Einfluss der Bcl-2 Expression auf die Autophagie-Aktivität getroffen werden. Da die Bcl-2/Beclin-1 Interaktion jedoch am Endoplasmatischen Retikulum stattfindet, widersprechen sich die in der vorliegenden Arbeit beobachtete erhöhte Autophagie-Aktivität und die vermehrte mitochondriale Expression von Bcl-2 durch IOTH nicht [141].

Die Bedeutung der Autophagie nach myokardialer I/R ist umstritten und auch die Studienlage zu der Wirkung der Hypothermie auf Autophagie ist kontrovers. Allerdings weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf eine kardioprotektive Rolle der Autophagie hin. Es wurden mehrere Wege dargestellt, wie IOTH die Viabilität der HL-1 Zellen erhöht. Ein wichtiger Mechanismus des Reperfusionsschadens ist die mitochondriale Dysfunktion, die zu der Einleitung der intrinsischen Apoptose führt (siehe Kapitel 1.3.3). Die Mitophagie ermöglicht die durch I/R geschädigten Mitochondrien zu degradieren und bietet dadurch eine Möglichkeit die intrinsische Apoptose zu verhindern [142]. Die erhöhte Mitophagie Aktivität stellt daher möglicherweise einen frühen und zentralen kardioprotektiven Mechanismus der IOTH dar. Um die kardioprotektive Rolle der Autophagie abschließend zu beurteilen, reichen die hier vorgestellten Ergebnisse allerdings nicht aus. Da Beclin-1 die Interaktion zwischen Autophagie und Apoptose reguliert, sollte die Beclin-1 Expression in zukünftigen Studien ebenfalls analysiert werden.

5.2 Teil 2: Hypothermie und primäre Kardiomyozyten

5.2.1 Limitationen der OGD/R-Versuche an HL-1 Zellen

Obwohl HL-1 Zellen morphologische, biochemische und elektrophysiologische Charakteristiken differenzierter Kardiomyozyten aufweisen, gibt es dennoch entscheidende Unterschiede gegenüber primären Kardiomyozyten [143-145]. HL-1 Zellen sind immortalisierte Kardiomyozyten, die neben ihrer unbegrenzten Teilungsfähigkeit weitere Tumorzell-spezifische Charakteristiken aufweisen. Primäre Kardiomyozyten gewinnen einen Großteil des ATPs aus dem Abbau freier Fettsäuren und sind auf eine aerobe Stoffwechsellage angewiesen. Für die oxidative Phosphorylierung der primären Zellen spielt die Kreatinkinase eine entscheidende Rolle. HL-1 Zellen decken hingegen den Hauptteil ihrer ATP-Produktion durch Glykolyse ab, dabei vermittelt die vermehrt exprimierte Hexokinase die oxidative Phosphorylierung [144, 145]. Im Vergleich zu primären Kardiomyozyten besitzen HL-1 Zellen ein dysfunktionales Kreatinkinase-System [144]. Die Atmungskette ist in den HL-1 Zellen durch eine unstrukturierte Anordnung der Mitochondrien, fehlende regulierende Proteine wie Beta-Tubulin II und einen Mangel an Atmungsketten-Komplexen beeinträchtigt [143-146]. Dadurch weisen HL-1 Zellen eine geringe Aktivität der oxidativen Phosphorylierung auf, die jedoch durch eine vermehrte Aktivität der Hexokinase ersetzt wird. Die Hexokinase ist an die mitochondriale Membran gebunden und nutzt das produzierte ATP direkt für die Phosphorylierung von Glukose. Dieser Effekt wird auch „Warburg-Effekt“ genannt und beschreibt die aerobe Glykolyse von Tumorzellen, die auch unter niedrigen Sauerstoffbedingungen Glykolyse für die ATP-Produktion betreiben und dabei Laktat produzieren [146]. Die Hexokinase ist an ein Protein (VDAC) der mPTP gebunden, stabilisiert die mPTP während der Reperfusionphase und kann so die Induktion intrinsischer Apoptose inhibieren [147].

Zusammengefasst unterscheiden sich HL-1 Zellen vor allem in Bezug auf ihren Energiestoffwechsel von primären Kardiomyozyten. Da die HL-1 Kardiomyozyten einen niedrigen Sauerstoffbedarf aufweisen und die Induktion intrinsischer Apoptose durch die Hexokinase inhibiert werden kann, können die Ergebnisse von I/R-Versuchen nur begrenzt einen Einblick auf die Vorgänge eines physiologischen Kardiomyozyten geben. Aus diesem Grund wurde das Schädigungsmodell der OGD/R auf primäre Kardiomyozyten übertragen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Zeit-Temperatur-Protokoll für die primären Kardiomyozyten etabliert. Dabei wurde der Einfluss von

Normothermie und Hypothermie auf die Viabilität der primären Kardiomyozyten mittels LDH- und cTnT-Freisetzung analysiert.

5.2.2 Hypothermie und primäre Kardiomyozyten

Das Schädigungsmodell der OGD/R war gut auf primäre Kardiomyozyten übertragbar und resultierte in einem erhöhten Zelluntergang, der mittels LDH- und cTnT-Freisetzungen quantifiziert wurde (Abbildung 13). Zunächst wurde ein Protokoll für die Anwendung der IOTH bei primären Kardiomyozyten etabliert (Abbildung 13A). Es konnte gezeigt werden, dass IOTH sowohl die Zytotoxizität als auch die cTnT-Freisetzung signifikant reduziert (Abbildung 13B). Es wurde bereits in dem HL-1 Zellkultur-Modell festgestellt, dass der Zeitpunkt der Kühlung entscheidend für die kardioprotektive Wirkung der TH ist [77]. Bei den OGD/R-Versuchen mit primären Kardiomyozyten stellte sich heraus, dass eine sehr frühe Induktion der IOTH nötig war, um den Zelluntergang signifikant zu reduzieren. Neonatale Kardiomyozyten haben sich aufgrund ihres Kardiomyozyten-spezifischen Energiestoffwechsels als Untersuchungsmodell etabliert [70]. Die Beobachtung, dass die normotherme Ischämie-Zeit einen entscheidenden Einfluss auf den Zelluntergang nimmt, konnte auch in Tierexperimenten von Tissier et al. bestätigt werden. Während die schnelle Induktion der Kühlung auf 32 – 34 °C kurz vor der Reperfusion keinen Einfluss auf die Infarktgröße hatte, reduzierte Hypothermie innerhalb der ersten 5 bis 15 Minuten nach Ischämie-Beginn die Infarktgröße signifikant [52, 148].

5.3 Schlussfolgerungen und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen früh induzierter Kühlung auf Ischämie/Reperfusions-geschädigte Kardiomyozyten untersucht. In dem ersten Teil wurde an HL-1 Zellen gezeigt, dass Hypothermie die intrinsische Apoptose auf mitochondrialer sowie zytosolischer Ebene inhibiert. Außerdem aktivierte Kühlung den Prozess der Autophagie, der die Degradierung geschädigter Mitochondrien ermöglicht und dadurch die Einleitung der intrinsischen Apoptose effektiv reduziert. Somit regulierte die therapeutische Hypothermie verschiedene Signaltransduktionswege, die zu dem Schutz des Mitochondriums während der Reperfusion führen (siehe Abbildung 15).

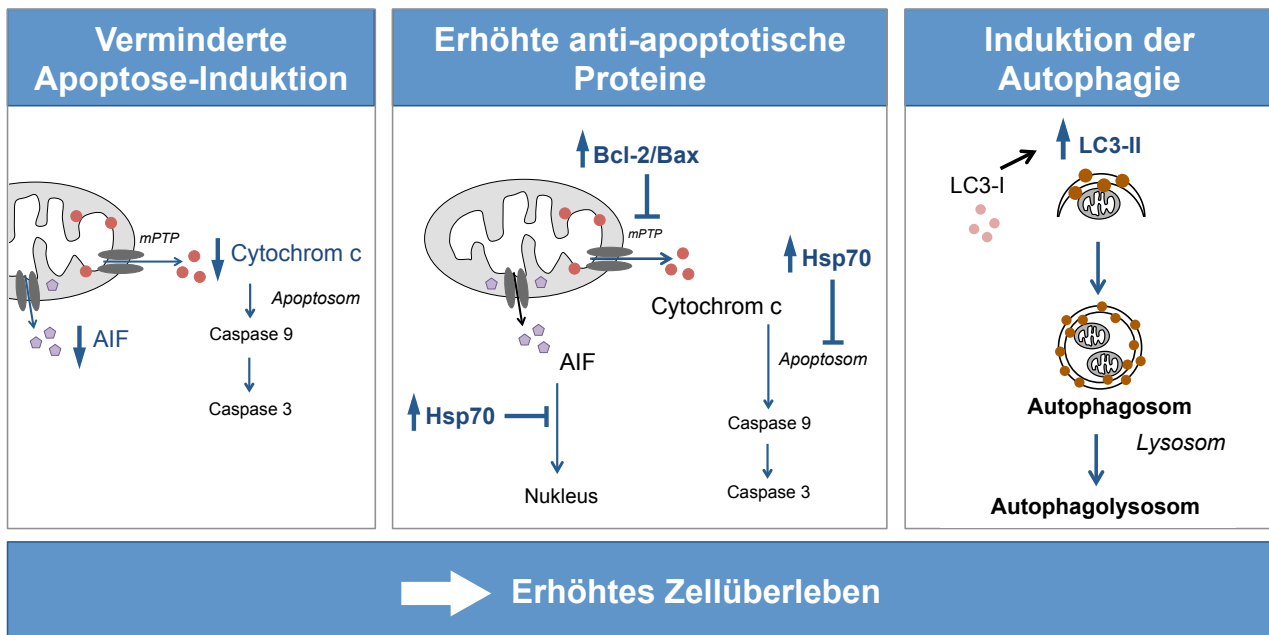


Abbildung 15. Zusammenfassung der Wirkungsmechanismen der therapeutischen Hypothermie auf das Zellüberleben der HL-1 Kardiomyozyten. mPTP = mitochondriale Pore

Im zweiten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die direkte Übertragung des an HL-1 Zellen etablierten Kühlungsprotokolls auf primäre Zellen nicht möglich war. Der Untergang der primären Kardiomyozyten konnte nur durch eine sehr früh induzierte intra-ischämische TH erreicht werden. Vergleicht man diese Beobachtung mit den Ergebnissen experimenteller und klinischer Studien, wird die Bedeutung des Zeitmanagements bei der Anwendung der Hypothermie deutlich. Die hier vorgestellten Ergebnisse legen nahe, dass ein *Targeted-Temperature Management* des Patienten bereits bei dem Verdacht auf myokardiale Ischämie kardioprotektiv sein kann. Da die Ergebnisse an einem artifiziellen Zellkulturmodell gewonnen wurden, ist die Translation in die Klinik jedoch schwierig. Die myokardiale Ischämie/Reperfusion hat nicht nur einen Einfluss auf die Viabilität der Kardiomyozyten sondern auch auf die Aktivierung inflammatorischer Signalkaskaden [149]. Mögliche komplexe systemische Reaktionen wurden absichtlich nicht berücksichtigt, da die Vorgänge in den Herzmuskelzellen betrachtet werden sollten. Die Analyse der zellulären Mechanismen der Hypothermie ist dabei von großer Bedeutung, denn die Kühlung des Herzens im klinischen Alltag ist deutlich komplexer als die Kühlung des Gehirns. Aus diesem Grund ist die Forschung an der pharmakologischen Induktion der protektiven Transduktionswege der Hypothermie möglicherweise ein myokard- und lebensrettender Ansatz. Ein großer Vorteil hierbei wäre, dass die Verzögerung des

Kühlungsbeginns sowie mögliche Nebenwirkungen der systemischen Kühlung verhindert werden könnten. Außerdem könnte so die kritische Phase der Wiedererwärmung umgangen werden. Der Einfluss der Wiedererwärmung nach Hypothermie ist bisher noch unklar, deshalb werden die zellulären Mechanismen während dieser Phase bereits in einer Folgestudie an HL-1 Zellen untersucht. Dabei soll analysiert werden, welchen Einfluss die Geschwindigkeit und die Zieltemperatur der Wiedererwärmung auf die Viabilität Kardiomyozyten hat. Hierbei wird unter anderem folgende Fragestellung bearbeitet: Werden die protektiven Mechanismen der Hypothermie möglicherweise durch einen Wiedererwärmungsschaden antagonisiert? Einen wichtigen Beitrag könnte dabei die Etablierung eines Wiedererwärmungsprotokolls an Kardiomyozyten darstellen, welches einen maximalen kardioprotektiven Effekt aufweist.

6 Bibliographie

1. McAloon CJ, Boylan LM, Hamborg T, Stallard N, Osman F, Lim PB, Hayat SA. The changing face of cardiovascular disease 2000-2012: An analysis of the world health organisation global health estimates data. *Int J Cardiol* 2016;224:256-64.
2. Steg PG, James SK, Atar D, Badano LP, Lundqvist CB, Borger MA, Di Mario C, Dickstein K, Ducrocq G, Fernandez-Aviles F, Gershlick AH, Giannuzzi P, Halvorsen S, Huber K, Juni P, Kastrati A, Knuuti J, Lenzen MJ, Mahaffey KW, Valgimigli M, van't Hof A, Widimsky P, Zahger D, Bax JJ, Baumgartner H, Ceconi C, Dean V, Deaton C, Fagard R, Funck-Brentano C, Hasdai D, Hoes A, Kirchhof P, Knuuti J, Kolh P, McDonagh T, Moulin C, Popescu BA, Reiner Ž, Sechtem U, Sirnes PA, Tendera M, Torbicki A, Vahanian A, Windecker S, Hasdai D, Astin F, Åström-Olsson K, Budaj A, Clemmensen P, Collet J-P, Fox KA, Fuat A, Gustiene O, Hamm CW, Kala P, Lancellotti P, Maggioni AP, Merkely B, Neumann F-J, Piepoli MF, Van de Werf F, Verheugt F, Wallentin L. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. The Task Force on the management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology (ESC) 2012;33:2569-619.
3. Reed GW, Rossi JE, Cannon CP. Acute myocardial infarction. *Lancet* 2016.
4. Nolan JP, Neumar RW, Adrie C, Aibiki M, Berg RA, Bottiger BW, Callaway C, Clark RS, Geocadin RG, Jauch EC, Kern KB, Laurent I, Longstreth WT, Merchant RM, Morley P, Morrison LJ, Nadkarni V, Peberdy MA, Rivers EP, Rodriguez-Nunez A, Sellke FW, Spaulding C, Sunde K, Hoek TV. Post-cardiac arrest syndrome: epidemiology, pathophysiology, treatment, and prognostication. A Scientific Statement from the International Liaison Committee on Resuscitation; the American Heart Association Emergency Cardiovascular Care Committee; the Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; the Council on Cardiopulmonary, Perioperative, and Critical Care; the Council on Clinical Cardiology; the Council on Stroke. *Resuscitation* 2008;79:350-79.
5. Jhund PS, McMurray JJV. Heart Failure After Acute Myocardial Infarction. A Lost Battle in the War on Heart Failure? 2008;118:2019-21.
6. Krumholz HM, Wang Y, Chen J, Drye EE, Spertus JA, Ross JS, Curtis JP, Nallamothu BK, Lichtman JH, Havranek EP, Masoudi FA, Radford MJ, Han LF, Rapp MT, Straube BM, Normand SL. Reduction in acute myocardial infarction mortality in the United States: risk-standardized mortality rates from 1995-2006. *Jama* 2009;302:767-73.
7. Puymirat E, Simon T, Steg PG, Schiele F, Gueret P, Blanchard D, Khalife K, Goldstein P, Cattan S, Vaur L, Cambou JP, Ferrieres J, Danchin N. Association of changes in clinical characteristics and management with improvement in survival among patients with ST-elevation myocardial infarction. *Jama* 2012;308:998-1006.

8. Minicucci MF, Azevedo PS, Polegato BF, Paiva SA, Zornoff LA. Heart failure after myocardial infarction: clinical implications and treatment. *Clinical cardiology* 2011;34:410-4.
9. Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;301:H1723-41.
10. Ong SB, Samangouei P, Kalkhoran SB, Hausenloy DJ. The mitochondrial permeability transition pore and its role in myocardial ischemia reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 2015;78:23-34.
11. Sommer JR, Waugh RA. Ultrastructure of heart muscle. *Environmental health perspectives* 1978;26:159-67.
12. Murphy E, Steenbergen C. Ion transport and energetics during cell death and protection. *Physiology (Bethesda)* 2008;23:115-23.
13. Jafri MS, Dudycha SJ, O'Rourke B. Cardiac energy metabolism: models of cellular respiration. *Annual review of biomedical engineering* 2001;3:57-81.
14. Taha M, Lopaschuk GD. Alterations in energy metabolism in cardiomyopathies. *Annals of Medicine* 2007;39:594-607.
15. Murphy E, Perlman M, London RE, Steenbergen C. Amiloride delays the ischemia-induced rise in cytosolic free calcium. *Circ Res* 1991;68:1250-8.
16. Inserte J, Barba I, Poncelas-Nozal M, Hernando V, Agullo L, Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D. cGMP/PKG pathway mediates myocardial postconditioning protection in rat hearts by delaying normalization of intracellular acidosis during reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 2011;50:903-9.
17. Liou YM, Chang JC. Differential pH effect on calcium-induced conformational changes of cardiac troponin C complexed with cardiac and fast skeletal isoforms of troponin I and troponin T. *Journal of biochemistry* 2004;136:683-92.
18. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. *Circulation* 2001;104:2981-9.
19. Frohlich GM, Meier P, White SK, Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury: looking beyond primary PCI. *Eur Heart J* 2013;34:1714-22.
20. Zhou T, Chuang C-C, Zuo L. Molecular Characterization of Reactive Oxygen Species in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *BioMed Research International* 2015;2015:9.

21. Murphy E, Steenbergen C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev* 2008;88:581-609.
22. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *The New England journal of medicine* 2007;357:1121-35.
23. Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfield KY. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochimica et biophysica acta* 1998;1366:79-94.
24. Griffiths EJ, Halestrap AP. Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1993;25:1461-9.
25. Biasutto L, Azzolini M, Szabo I, Zoratti M. The mitochondrial permeability transition pore in AD 2016: An update. *Biochimica et biophysica acta* 2016.
26. Griffiths EJ, Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J* 1995;307 (Pt 1):93-8.
27. Haworth RA, Hunter DR. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site. *Arch Biochem Biophys* 1979;195:460-7.
28. Crompton M, Costi A, Hayat L. Evidence for the presence of a reversible Ca²⁺-dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. *Biochem J* 1987;245:915-8.
29. Crompton M, Costi A. Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca²⁺, inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca²⁺ overload. *European journal of biochemistry / FEBS* 1988;178:489-501.
30. Halestrap AP. What is the mitochondrial permeability transition pore? *J Mol Cell Cardiol* 2009;46:821-31.
31. Argaud L, Gateau-Roesch O, Raisky O, Loufouat J, Robert D, Ovize M. Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation* 2005;111:194-7.
32. Hausenloy DJ, Maddock HL, Baxter GF, Yellon DM. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovascular research* 2002;55:534-43.
33. Javadov SA, Clarke S, Das M, Griffiths EJ, Lim KH, Halestrap AP. Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart. *J Physiol* 2003;549:513-24.

34. Polderman KH, Herold I. Therapeutic hypothermia and controlled normothermia in the intensive care unit: practical considerations, side effects, and cooling methods. *Crit Care Med* 2009;37:1101-20.
35. Otto KA. Therapeutic hypothermia applicable to cardiac surgery. *Veterinary anaesthesia and analgesia* 2015;42:559-69.
36. Bachet J, Guilmet D. Brain protection during surgery of the aortic arch. *Journal of cardiac surgery* 2002;17:115-24.
37. Pacini D, Pantaleo A, Di Marco L, Leone A, Barberio G, Murana G, Castrovinci S, Sottili S, Di Bartolomeo R. Visceral organ protection in aortic arch surgery: safety of moderate hypothermia. *Eur J Cardiothorac Surg* 2014;46:438-43.
38. Bernard SA, Gray TW, Buist MD, Jones BM, Silvester W, Gutteridge G, Smith K. Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *The New England journal of medicine* 2002;346:557-63.
39. Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest. *The New England journal of medicine* 2002;346:549-56.
40. Moler FW, Silverstein FS, Holubkov R, Slomine BS, Christensen JR, Nadkarni VM, Meert KL, Clark AE, Browning B, Pemberton VL, Page K, Shankaran S, Hutchison JS, Newth CJ, Bennett KS, Berger JT, Topjian A, Pineda JA, Koch JD, Schleien CL, Dalton HJ, Ofori-Amanfo G, Goodman DM, Fink EL, McQuillen P, Zimmerman JJ, Thomas NJ, van der Jagt EW, Porter MB, Meyer MT, Harrison R, Pham N, Schwarz AJ, Nowak JE, Alten J, Wheeler DS, Bhalala US, Lidsky K, Lloyd E, Mathur M, Shah S, Wu T, Theodorou AA, Sanders RC, Jr., Dean JM. Therapeutic hypothermia after out-of-hospital cardiac arrest in children. *The New England journal of medicine* 2015;372:1898-908.
41. Moler FW, Silverstein FS, Holubkov R, Slomine BS, Christensen JR, Nadkarni VM, Meert KL, Browning B, Pemberton VL, Page K, Gildea MR, Scholefield BR, Shankaran S, Hutchison JS, Berger JT, Ofori-Amanfo G, Newth CJ, Topjian A, Bennett KS, Koch JD, Pham N, Chanani NK, Pineda JA, Harrison R, Dalton HJ, Alten J, Schleien CL, Goodman DM, Zimmerman JJ, Bhalala US, Schwarz AJ, Porter MB, Shah S, Fink EL, McQuillen P, Wu T, Skellett S, Thomas NJ, Nowak JE, Baines PB, Pappachan J, Mathur M, Lloyd E, van der Jagt EW, Dobyens EL, Meyer MT, Sanders RC, Jr., Clark AE, Dean JM. Therapeutic Hypothermia after In-Hospital Cardiac Arrest in Children. *The New England journal of medicine* 2017;376:318-29.
42. Nielsen N, Wetterslev J, Cronberg T, Erlinge D, Gasche Y, Hassager C, Horn J, Hovdenes J, Kjaergaard J, Kuiper M, Pellis T, Stammet P, Wanscher M, Wise MP, Aneman A, Al-Subaie N, Boesgaard S, Bro-Jeppesen J, Brunetti I, Bugge JF, Hingston CD, Juffermans NP, Koopmans M, Kober L, Langorgen J, Lilja G, Moller JE, Rundgren M, Rylander C, Smid O, Werer C, Winkel P, Friberg H. Targeted

temperature management at 33 degrees C versus 36 degrees C after cardiac arrest. *The New England journal of medicine* 2013;369:2197-206.

43. Nolan JP, Soar J, Cariou A, Cronberg T, Moolaert VR, Deakin CD, Bottiger BW, Friberg H, Sunde K, Sandroni C. European Resuscitation Council and European Society of Intensive Care Medicine Guidelines for Post-resuscitation Care 2015: Section 5 of the European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2015. *Resuscitation* 2015;95:202-22.
44. Shankaran S, Laptook AR, Ehrenkranz RA, Tyson JE, McDonald SA, Donovan EF, Fanaroff AA, Poole WK, Wright LL, Higgins RD, Finer NN, Carlo WA, Duara S, Oh W, Cotten CM, Stevenson DK, Stoll BJ, Lemons JA, Guillet R, Jobe AH. Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *The New England journal of medicine* 2005;353:1574-84.
45. Azzopardi D, Strohm B, Marlow N, Brocklehurst P, Deierl A, Eddama O, Goodwin J, Halliday HL, Juszczak E, Kapellou O, Levene M, Linsell L, Omar O, Thoresen M, Tusor N, Whitelaw A, Edwards AD. Effects of Hypothermia for Perinatal Asphyxia on Childhood Outcomes. *New England Journal of Medicine* 2014;371:140-9.
46. Azzopardi DV, Strohm B, Edwards AD, Dyet L, Halliday HL, Juszczak E, Kapellou O, Levene M, Marlow N, Porter E, Thoresen M, Whitelaw A, Brocklehurst P. Moderate Hypothermia to Treat Perinatal Asphyxial Encephalopathy. *New England Journal of Medicine* 2009;361:1349-58.
47. Andrews PJ, Sinclair HL, Rodriguez A, Harris BA, Battison CG, Rhodes JK, Murray GD. Hypothermia for Intracranial Hypertension after Traumatic Brain Injury. *The New England journal of medicine* 2015;373:2403-12.
48. Crossley S, Reid J, McLatchie R, Hayton J, Clark C, MacDougall M, Andrews PJ. A systematic review of therapeutic hypothermia for adult patients following traumatic brain injury. *Crit Care* 2014;18:R75.
49. Wu TC, Grotta JC. Hypothermia for acute ischaemic stroke. *The Lancet. Neurology* 2013;12:275-84.
50. Chien GL, Wolff RA, Davis RF, van Winkle DM. "Normothermic range" temperature affects myocardial infarct size. *Cardiovascular research* 1994;28:1014-7.
51. Duncker DJ, Klassen CL, Ishibashi Y, Herrlinger SH, Pavek TJ, Bache RJ. Effect of temperature on myocardial infarction in swine. *Am J Physiol* 1996;270:H1189-99.
52. Tissier R, Couvreur N, Ghaleh B, Bruneval P, Lidouren F, Morin D, Zini R, Bize A, Chenoune M, Belair MF, Mandet C, Douheret M, Dubois-Rande JL, Parker JC, Cohen MV, Downey JM, Berdeaux A. Rapid cooling preserves the ischaemic

myocardium against mitochondrial damage and left ventricular dysfunction. *Cardiovascular research* 2009;83:345-53.

53. Dixon SR, Whitbourn RJ, Dae MW, Grube E, Sherman W, Schaer GL, Jenkins JS, Baim DS, Gibbons RJ, Kuntz RE, Popma JJ, Nguyen TT, O'Neill WW. Induction of mild systemic hypothermia with endovascular cooling during primary percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:1928-34.
54. Polderman KH. Induced hypothermia and fever control for prevention and treatment of neurological injuries. *Lancet* 2008;371:1955-69.
55. Koreny M, Sterz F, Uray T, Schreiber W, Holzer M, Laggner A, Herkner H. Effect of cooling after human cardiac arrest on myocardial infarct size. *Resuscitation* 2009;80:56-60.
56. Gotberg M, Olivecrona GK, Koul S, Carlsson M, Engblom H, Ugander M, van der Pals J, Algotsson L, Arheden H, Erlinge D. A pilot study of rapid cooling by cold saline and endovascular cooling before reperfusion in patients with ST-elevation myocardial infarction. *Circulation. Cardiovascular interventions* 2010;3:400-7.
57. Erlinge D, Gotberg M, Lang I, Holzer M, Noc M, Clemmensen P, Jensen U, Metzler B, James S, Botker HE, Omerovic E, Engblom H, Carlsson M, Arheden H, Ostlund O, Wallentin L, Harnek J, Olivecrona GK. Rapid endovascular catheter core cooling combined with cold saline as an adjunct to percutaneous coronary intervention for the treatment of acute myocardial infarction. The CHILL-MI trial: a randomized controlled study of the use of central venous catheter core cooling combined with cold saline as an adjunct to percutaneous coronary intervention for the treatment of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2014;63:1857-65.
58. Nichol G, Strickland W, Shavelle D, Maehara A, Ben-Yehuda O, Genereux P, Dressler O, Parvataneni R, Nichols M, McPherson J, Barbeau G, Laddu A, Elrod JA, Tully GW, Ivanhoe R, Stone GW. Prospective, multicenter, randomized, controlled pilot trial of peritoneal hypothermia in patients with ST-segment-elevation myocardial infarction. *Circulation. Cardiovascular interventions* 2015;8:e001965.
59. Polderman KH, Noc M, Beishuizen A, Biermann H, Girbes AR, Tully GW, Seidman D, Albertsson PA, Holmberg M, Sterz F, Holzer M. Ultrarapid Induction of Hypothermia Using Continuous Automated Peritoneal Lavage With Ice-Cold Fluids: Final Results of the Cooling for Cardiac Arrest or Acute ST-Elevation Myocardial Infarction Trial. *Crit Care Med* 2015;43:2191-201.
60. Gotberg M, Olivecrona GK, Engblom H, Ugander M, van der Pals J, Heiberg E, Arheden H, Erlinge D. Rapid short-duration hypothermia with cold saline and endovascular cooling before reperfusion reduces microvascular obstruction and myocardial infarct size. *BMC cardiovascular disorders* 2008;8:7.

61. Dae MW, Gao DW, Sessler DI, Chair K, Stillson CA. Effect of endovascular cooling on myocardial temperature, infarct size, and cardiac output in human-sized pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282:H1584-91.
62. Hale SL, Dave RH, Kloner RA. Regional hypothermia reduces myocardial necrosis even when instituted after the onset of ischemia. *Basic Res Cardiol* 1997;92:351-7.
63. Maeng M, Mortensen UM, Kristensen J, Kristiansen SB, Andersen HR. Hypothermia during reperfusion does not reduce myocardial infarct size in pigs. *Basic Res Cardiol* 2006;101:61-8.
64. Polderman KH. Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia. *Crit Care Med* 2009;37:S186-202.
65. Ning X-H, Chi EY, Buroker NE, Chen S-H, Xu C-S, Tien Y-T, Hyyti OM, Ge M, Portman MA. Moderate hypothermia (30°C) maintains myocardial integrity and modifies response of cell survival proteins after reperfusion. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2007;293:H2119-H28.
66. Simkhovich BZ, Hale SL, Kloner RA. Metabolic mechanism by which mild regional hypothermia preserves ischemic tissue. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2004;9:83-90.
67. Lee JH, Suh GJ, Kwon WY, Kim KS, Rhee JE, Kim MA, Park MH. Protective effects of therapeutic hypothermia in post-resuscitation myocardium. *Resuscitation* 2012;83:633-9.
68. Kagan VE, Tyurin VA, Jiang J, Tyurina YY, Ritov VB, Amoscato AA, Osipov AN, Belikova NA, Kapralov AA, Kini V, Vlasova II, Zhao Q, Zou M, Di P, Svistunenko DA, Kurnikov IV, Borisenko GG. Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nat Chem Biol* 2005;1:223-32.
69. Tissier R, Couvreur N, Ghaleh B, Bruneval P, Lidouren F, Morin D, Zini R, Bize A, Chenoune M, Belair M-F, Mandet C, Douheret M, Dubois-Rande J-L, Parker JC, Cohen MV, Downey JM, Berdeaux A. Rapid cooling preserves the ischaemic myocardium against mitochondrial damage and left ventricular dysfunction. *Cardiovascular research* 2009.
70. Shao ZH, Sharp WW, Wojcik KR, Li CQ, Han M, Chang WT, Ramachandran S, Li J, Hamann KJ, Vanden Hoek TL. Therapeutic hypothermia cardioprotection via Akt- and nitric oxide-mediated attenuation of mitochondrial oxidants. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;298:H2164-73.
71. Tissier R, Chenoune M, Pons S, Zini R, Darbera L, Lidouren F, Ghaleh B, Berdeaux A, Morin D. Mild hypothermia reduces per-ischemic reactive oxygen species production and preserves mitochondrial respiratory complexes. *Resuscitation* 2013;84:249-55.

72. McCully JD, Wakiyama H, Hsieh YJ, Jones M, Levitsky S. Differential contribution of necrosis and apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:H1923-35.
73. Zhao ZQ, Vinten-Johansen J. Myocardial apoptosis and ischemic preconditioning. *Cardiovascular research* 2002;55:438-55.
74. Orogo AM, Gustafsson AB. Cell death in the myocardium: my heart won't go on. *IUBMB Life* 2013;65:651-6.
75. Ning XH, Chen SH, Xu CS, Li L, Yao LY, Qian K, Krueger JJ, Hyyti OM, Portman MA. Hypothermic protection of the ischemic heart via alterations in apoptotic pathways as assessed by gene array analysis. *J Appl Physiol (1985)* 2002;92:2200-7.
76. Meybohm P, Gruenewald M, Albrecht M, Zacharowski KD, Lucius R, Zitta K, Koch A, Tran N, Scholz J, Bein B. Hypothermia and postconditioning after cardiopulmonary resuscitation reduce cardiac dysfunction by modulating inflammation, apoptosis and remodeling. *PloS one* 2009;4:e7588.
77. Tong G, Walker C, Buhner C, Berger F, Miera O, Schmitt KR. Moderate hypothermia initiated during oxygen-glucose deprivation preserves HL-1 cardiomyocytes. *Cryobiology* 2015;70:101-8.
78. Huang CH, Chiang CY, Pen RH, Tsai MS, Chen HW, Hsu CY, Wang TD, Ma MH, Chen SC, Chen WJ. Hypothermia treatment preserves mitochondrial integrity and viability of cardiomyocytes after ischaemic reperfusion injury. *Injury* 2015;46:233-9.
79. Krech J, Tong G, Wowro S, Walker C, Rosenthal LM, Berger F, Schmitt KR. Moderate therapeutic hypothermia induces multimodal protective effects in oxygen-glucose deprivation/reperfusion injured cardiomyocytes. *Mitochondrion* 2017.
80. Ott M, Zhivotovsky B, Orrenius S. Role of cardiolipin in cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* 2007;14:1243-7.
81. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996;86:147-57.
82. Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Molecular cell* 2002;9:423-32.
83. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2008;9:231-41.

84. Norberg E, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochem Biophys Res Commun* 2010;396:95-100.
85. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999;397:441-6.
86. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2008;9:47-59.
87. Dewson G, Ma S, Frederick P, Hockings C, Tan I, Kratina T, Kluck RM. Bax dimerizes via a symmetric BH3:groove interface during apoptosis. *Cell Death Differ* 2012;19:661-70.
88. Kuwana T, Olson NH, Kiosses WB, Peters B, Newmeyer DD. Pro-apoptotic Bax molecules densely populate the edges of membrane pores. *Sci Rep* 2016;6:27299.
89. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science (New York, N.Y.)* 1997;275:1129-32.
90. Dlugosz PJ, Billen LP, Annis MG, Zhu W, Zhang Z, Lin J, Leber B, Andrews DW. Bcl-2 changes conformation to inhibit Bax oligomerization. *Embo j* 2006;25:2287-96.
91. Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, Daugas E, Geuskens M, Kroemer G. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med* 1996;184:1331-41.
92. Zhu L, Yu Y, Chua BH, Ho YS, Kuo TH. Regulation of sodium-calcium exchange and mitochondrial energetics by Bcl-2 in the heart of transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:2135-44.
93. Fuenzalida K, Quintanilla R, Ramos P, Piderit D, Fuentealba RA, Martinez G, Inestrosa NC, Bronfman M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma up-regulates the Bcl-2 anti-apoptotic protein in neurons and induces mitochondrial stabilization and protection against oxidative stress and apoptosis. *J Biol Chem* 2007;282:37006-15.
94. Daugaard M, Rohde M, Jaattela M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett* 2007;581:3702-10.
95. Voos W, Martin H, Krimmer T, Pfanner N. Mechanisms of protein translocation into mitochondria. *Biochimica et biophysica acta* 1999;1422:235-54.

96. Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:670-84.
97. Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Taylor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2000;2:469-75.
98. Choudhury S, Bae S, Ke Q, Lee JY, Kim J, Kang PM. Mitochondria to nucleus translocation of AIF in mice lacking Hsp70 during ischemia/reperfusion. *Basic Res Cardiol* 2011;106:397-407.
99. Gurbuxani S, Schmitt E, Cande C, Parcellier A, Hammann A, Daugas E, Kouranti I, Spahr C, Pance A, Kroemer G, Garrido C. Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor. *Oncogene* 2003;22:6669-78.
100. Cuervo AM. Autophagy: many paths to the same end. *Mol Cell Biochem* 2004;263:55-72.
101. Rowland TJ, Sweet ME, Mestroni L, Taylor MR. Danon disease - dysregulation of autophagy in a multisystem disorder with cardiomyopathy. *J Cell Sci* 2016;129:2135-43.
102. Matsui Y, Takagi H, Qu X, Abdellatif M, Sakoda H, Asano T, Levine B, Sadoshima J. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circ Res* 2007;100:914-22.
103. Kubli DA, Gustafsson AB. Mitochondria and mitophagy: the yin and yang of cell death control. *Circ Res* 2012;111:1208-21.
104. Hamacher-Brady A, Brady NR, Gottlieb RA. Enhancing macroautophagy protects against ischemia/reperfusion injury in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2006;281:29776-87.
105. Yan L, Vatner DE, Kim SJ, Ge H, Masurekar M, Masover WH, Yang G, Matsui Y, Sadoshima J, Vatner SF. Autophagy in chronically ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:13807-12.
106. Valentim L, Laurence KM, Townsend PA, Carroll CJ, Soond S, Scarabelli TM, Knight RA, Latchman DS, Stephanou A. Urocortin inhibits Beclin1-mediated autophagic cell death in cardiac myocytes exposed to ischaemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 2006;40:846-52.
107. Aki T, Yamaguchi K, Fujimiya T, Mizukami Y. Phosphoinositide 3-kinase accelerates autophagic cell death during glucose deprivation in the rat cardiomyocyte-derived cell line H9c2. *Oncogene* 2003;22:8529-35.

108. Tang D, Wang C, Gao Y, Pu J, Long J, Xu W. Deep hypothermia-enhanced autophagy protects PC12 cells against oxygen glucose deprivation via a mitochondrial pathway. *Neuroscience Letters* 2016;632:79-85.
109. Lu J, Qian H-Y, Liu L-J, Zhou B-C, Xiao Y, Mao J-N, An G-Y, Rui M-Z, Wang T, Zhu C-L. Mild hypothermia alleviates excessive autophagy and mitophagy in a rat model of asphyxial cardiac arrest. *Neurological Sciences* 2014;35:1691-9.
110. Claycomb WC, Lanson NA, Jr., Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, Izzo NJ, Jr. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:2979-84.
111. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *Embo j* 2000;19:5720-8.
112. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Overvatn A, Bjorkoy G, Johansen T. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 2007;282:24131-45.
113. Nguyen SV, Claycomb WC. Hypoxia regulates the expression of the adrenomedullin and HIF-1 genes in cultured HL-1 cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;265:382-6.
114. Kitta K, Day RM, Ikeda T, Suzuki YJ. Hepatocyte growth factor protects cardiac myocytes against oxidative stress-induced apoptosis. *Free Radic Biol Med* 2001;31:902-10.
115. Seymour EM, Wu SY, Kovach MA, Romano MA, Traynor JR, Claycomb WC, Bolling SF. HL-1 myocytes exhibit PKC and K(ATP) channel-dependent delta opioid preconditioning. *J Surg Res* 2003;114:187-94.
116. Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Henriksen K, Parvonen M, Voipio-Pulkki LM. Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation* 1997;95:320-3.
117. Toyoda Y, Shida T, Wakita N, Ozaki N, Takahashi R, Okada M. Evidence of apoptosis induced by myocardial ischemia: A case of ventricular septal rupture following acute myocardial infarction. *Cardiology* 1998;90:149-51.
118. Piro FR, di Gioia CR, Gallo P, Giordano C, d'Amati G. Is apoptosis a diagnostic marker of acute myocardial infarction? *Archives of pathology & laboratory medicine* 2000;124:827-31.

119. Abbate A, Melfi R, Patti G, Baldi F, D'Ambrosio A, Manzoli A, Baldi A, Di Sciascio G. Apoptosis in recent myocardial infarction. *La Clinica terapeutica* 2000;151:247-51.
120. Vanden Hoek TL, Qin Y, Wojcik K, Li CQ, Shao ZH, Anderson T, Becker LB, Hamann KJ. Reperfusion, not simulated ischemia, initiates intrinsic apoptosis injury in chick cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H141-50.
121. Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* 1994;94:1621-8.
122. Zhao ZQ, Nakamura M, Wang NP, Wilcox JN, Shearer S, Ronson RS, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death. *Cardiovascular research* 2000;45:651-60.
123. Kang PM, Haunstetter A, Aoki H, Usheva A, Izumo S. Morphological and molecular characterization of adult cardiomyocyte apoptosis during hypoxia and reoxygenation. *Circ Res* 2000;87:118-25.
124. Bialik S, Cryns VL, Drincic A, Miyata S, Wollowick AL, Srinivasan A, Kitsis RN. The Mitochondrial Apoptotic Pathway Is Activated by Serum and Glucose Deprivation in Cardiac Myocytes. *Circulation Research* 1999;85:403-14.
125. Kim GT, Chun YS, Park JW, Kim MS. Role of apoptosis-inducing factor in myocardial cell death by ischemia-reperfusion. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309:619-24.
126. Zhang J, Li XX, Bian HJ, Liu XB, Ji XP, Zhang Y. Inhibition of the activity of Rho-kinase reduces cardiomyocyte apoptosis in heart ischemia/reperfusion via suppressing JNK-mediated AIF translocation. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2009;401:76-80.
127. Schellenberg B, Wang P, Keeble JA, Rodriguez-Enriquez R, Walker S, Owens TW, Foster F, Talianis-Hughes J, Brennan K, Streuli CH, Gilmore AP. Bax exists in a dynamic equilibrium between the cytosol and mitochondria to control apoptotic priming. *Molecular cell* 2013;49:959-71.
128. Yang D, Guo S, Zhang T, Li H. Hypothermia attenuates ischemia/reperfusion-induced endothelial cell apoptosis via alterations in apoptotic pathways and JNK signaling. *FEBS Lett* 2009;583:2500-6.
129. Drescher C, Diestel A, Wollersheim S, Berger F, Schmitt KR. How does hypothermia protect cardiomyocytes during cardioplegic ischemia? *Eur J Cardiothorac Surg* 2011;40:352-9.

130. Suzuki K, Sawa Y, Kaneda Y, Ichikawa H, Shirakura R, Matsuda H. In vivo gene transfection with heat shock protein 70 enhances myocardial tolerance to ischemia-reperfusion injury in rat. *J Clin Invest* 1997;99:1645-50.
131. Marber MS, Mestral R, Chi SH, Sayen MR, Yellon DM, Dillmann WH. Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *J Clin Invest* 1995;95:1446-56.
132. Plumier JC, Ross BM, Currie RW, Angelidis CE, Kazlaris H, Kollias G, Pagoulatos GN. Transgenic mice expressing the human heat shock protein 70 have improved post-ischemic myocardial recovery. *J Clin Invest* 1995;95:1854-60.
133. Suzuki K, Sawa Y, Kagisaki K, Taketani S, Ichikawa H, Kaneda Y, Matsuda H. Reduction in myocardial apoptosis associated with overexpression of heat shock protein 70. *Basic Res Cardiol* 2000;95:397-403.
134. Williamson CL, Dabkowski ER, Dillmann WH, Hollander JM. Mitochondria protection from hypoxia/reoxygenation injury with mitochondria heat shock protein 70 overexpression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294:H249-56.
135. Cheng BC, Huang HS, Chao CM, Hsu CC, Chen CY, Chang CP. Hypothermia may attenuate ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte death by reducing autophagy. *Int J Cardiol* 2013;168:2064-9.
136. Jin Y, Lin Y, Feng JF, Jia F, Gao GY, Jiang JY. Moderate Hypothermia Significantly Decreases Hippocampal Cell Death Involving Autophagy Pathway after Moderate Traumatic Brain Injury. *Journal of neurotrauma* 2015;32:1090-100.
137. Lum JJ, DeBerardinis RJ, Thompson CB. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2005;6:439-48.
138. Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 2005;122:927-39.
139. Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, Roux D, Pouyssegur J, Mazure NM. Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol* 2009;29:2570-81.
140. Liang XH, Kleeman LK, Jiang HH, Gordon G, Goldman JE, Berry G, Herman B, Levine B. Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *Journal of virology* 1998;72:8586-96.
141. Levine B, Sinha S, Kroemer G. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy* 2008;4:600-6.

142. Hoshino A, Matoba S, Iwai-Kanai E, Nakamura H, Kimata M, Nakaoka M, Katamura M, Okawa Y, Ariyoshi M, Mita Y, Ikeda K, Ueyama T, Okigaki M, Matsubara H. p53-TIGAR axis attenuates mitophagy to exacerbate cardiac damage after ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 2012;52:175-84.
143. Anmann T, Guzun R, Beraud N, Pelloux S, Kuznetsov AV, Kogerman L, Kaambre T, Sikk P, Paju K, Peet N, Seppet E, Ojeda C, Tourneur Y, Saks V. Different kinetics of the regulation of respiration in permeabilized cardiomyocytes and in HL-1 cardiac cells. Importance of cell structure/organization for respiration regulation. *Biochimica et biophysica acta* 2006;1757:1597-606.
144. Monge C, Beraud N, Tepp K, Pelloux S, Chahboun S, Kaambre T, Kadaja L, Roosimaa M, Piirsoo A, Tourneur Y, Kuznetsov AV, Saks V, Seppet E. Comparative analysis of the bioenergetics of adult cardiomyocytes and nonbeating HL-1 cells: respiratory chain activities, glycolytic enzyme profiles, and metabolic fluxes. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 2009;87:318-26.
145. Eimre M, Paju K, Pelloux S, Beraud N, Roosimaa M, Kadaja L, Gruno M, Peet N, Orlova E, Remmelkoor R, Piirsoo A, Saks V, Seppet E. Distinct organization of energy metabolism in HL-1 cardiac cell line and cardiomyocytes. *Biochimica et biophysica acta* 2008;1777:514-24.
146. Kuznetsov AV, Javadov S, Sickinger S, Frotschnig S, Grimm M. H9c2 and HL-1 cells demonstrate distinct features of energy metabolism, mitochondrial function and sensitivity to hypoxia-reoxygenation. *Biochimica et biophysica acta* 2015;1853:276-84.
147. Azoulay-Zohar H, Israelson A, Abu-Hamad S, Shoshan-Barmatz V. In self-defence: hexokinase promotes voltage-dependent anion channel closure and prevents mitochondria-mediated apoptotic cell death. *Biochem J* 2004;377:347-55.
148. Tissier R, Hamanaka K, Kuno A, Parker JC, Cohen MV, Downey JM. Total liquid ventilation provides ultra-fast cardioprotective cooling. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:601-5.
149. Lee JH, Wei ZZ, Cao W, Won S, Gu X, Winter M, Dix TA, Wei L, Yu SP. Regulation of therapeutic hypothermia on inflammatory cytokines, microglia polarization, migration and functional recovery after ischemic stroke in mice. *Neurobiology of disease* 2016;96:248-60.

7 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jana Krech, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Hypothermie zur Kardioprotektion: Einfluss therapeutischer Hypothermie während simulierter Ischämie/Reperfusion auf HL-1 Zellen und primäre Kardiomyozyten“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Jana Krech hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Krech J, Tong G, Wowro S, Walker C, Rosenthal LM, Berger F, Schmitt KRL: Moderate therapeutic hypothermia induces multimodal protective effects in oxygen-glucose deprivation/reperfusion injured cardiomyocytes. Mitochondrion, 2017

Beitrag im Einzelnen: Geteilte Erst-Autorenschaft, Beteiligung an der Planung des Projektes und der Versuchsdurchführung und Datenerhebung sowie Analyse und graphische Darstellung der Daten mittels Prism. Des Weiteren war Frau Krech an der Literaturrecherche beteiligt und an der Niederschrift der Einführung, Methodik, Ergebnisse und der Diskussion.

Publikation 2: Rosenthal LM, Tong G, Walker C, Wowro SJ, Krech J, Pfitzer C, Justus G, Berger F, Schmitt KRL: Neuroprotection via RNA-binding protein RBM3 expression is regulated by hypothermia but not by hypoxia in human SK-N-SH neurons. Hypoxia, 2017

Ko-Autorenschaft, Korrektur und Revision des Manuskripts

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

8 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wurde mein Lebenslauf in der elektronischen Version meiner Dissertation nicht veröffentlicht.

9 Publikationsliste

Journalpublikationen als Erst- oder Koautorin

Krech J, Tong G, Wowro S, Walker C, Rosenthal LM, Berger F, Schmitt KRL: Moderate therapeutic hypothermia induces multimodal protective effects in oxygen-glucose deprivation/reperfusion injured cardiomyocytes. *Mitochondrion*, 2017

Rosenthal LM, Tong G, Walker C, Wowro SJ, **Krech J**, Pfitzer C, Justus G, Berger F, Schmitt KRL: Neuroprotection via RNA-binding protein RBM3 expression is regulated by hypothermia but not by hypoxia in human SK-N-SH neurons. *Hypoxia*, 2017

Posterpräsentationen mit Abstract-Veröffentlichungen

Krech J, Cormann SB, Walker C, Tong G, Berger F, Schmitt KRL: Cardioprotective effect of intra-ischemic therapeutic hypothermia in primary cardiomyocytes. 48. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie e.V. Leipzig, Februar 2016

Krech J, Tong G, Berger F, Schmitt KRL: Intra-ischemic therapeutic hypothermia protects cardiomyocytes from reperfusion induced mitochondrial dysfunction. European Resuscitation Council Reykjavik, September 2016

Krech J, Tong G, Berger F, Schmitt KRL: Multimodal protective effects induced by moderate therapeutic hypothermia in ischemia/reperfusion-damaged cardiomyocytes. 27. European Student's Conference Berlin, Oktober 2016

Vortragspräsentationen mit Abstract Veröffentlichungen

Krech J, Tong G, Walker C, Berger F, Schmitt KRL: Therapeutic hypothermia attenuates mitochondrial release of apoptosis effectors in OGD/R-injured cardiomyocytes. *Targeting Mitochondria*, Oktober 2016

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. med Katharina Schmitt für die Unterstützung und Betreuung der Doktorarbeit, die stets durch ihr außergewöhnlichen Engagement gekennzeichnet war.

Außerdem möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Schmitt bedanken, ohne deren Hilfsbereitschaft, Lösungsansätze und gute Laune dieses Projekt nicht umsetzbar gewesen wäre. Dabei möchte ich mich insbesondere bei Herrn Ph.D. Giang Tong für seine Unterstützung bei der Projektentwicklung und Diskussion der Daten bedanken. Weiterhin bedanke ich mich bei Sylvia Wowro, Nora Ebermann und Maria Walther für ihre Hilfe bei laborpraktischen Arbeiten. Ein besonderer Dank gilt zudem Christian Lücht für zahlreiche Denkanstöße, orthografische Korrekturen und seine emotionale Unterstützung.