

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

DISSERTATION

Welchen Einfluss hat moderate Hypothermie auf einen
Ischämie/Reperfusionsschaden in primären Kardiomyozyten?

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Phuong D. Lam

aus Berlin

Datum der Promotion: 05.03.2021

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis.....	4
II. Abbildungsverzeichnis	7
III. Tabellenverzeichnis.....	8
IV. Abstrakt.....	9
V. Abstract.....	11
1 Einleitung.....	13
1.1 Klinischer Hintergrund	13
1.2 Pathophysiologie des kardialen Ischämie- und Reperfusionsschadens	15
1.2.1 Ischämie.....	15
1.2.2 Reperfusion.....	16
1.3 Sterile Inflammationsreaktion und DAMPs.....	18
1.3.1 High Mobility Group Box-1 (HMGB-1).....	19
1.3.2 Hitzeschockprotein 70 (Hsp70).....	19
1.3.3 Cold-inducible RNA-binding Protein (CIRBP).....	20
1.4 Zelltodmechanismen.....	21
1.4.1 Apoptose.....	21
1.4.2 Nekrose.....	22
1.5 Therapeutische Hypothermie	23
1.5.1 Klinische Anwendungsbereiche der therapeutischen Hypothermie	23
1.5.2 Wirkungsmechanismen der therapeutischen Hypothermie.....	25
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit	30
1.7 Vorangegangene Arbeiten und die Etablierung eines Zeit-Temperatur-Protokolls	31
2 Materialien.....	32
2.1 Geräte.....	32
2.2 Zellkultur.....	33
2.3 Chemikalien.....	34
2.4 Kits.....	35

2.5 Antikörper	35
2.6 Primer.....	36
2.7 Software	37
2.8 Sonstige Materialien	37
3 Methoden	38
3.1 Teil A: Versuche mit primären Kardiomyozyten.....	38
3.1.1 Präparation und Kultivierung primärer Kardiomyozyten	38
3.1.2 Versuchsdurchführung	39
3.1.3 Quantifizierung des nekrotischen Zelltodes mittels LDH-Assay	41
3.1.4 Western-Blot-Analysen.....	42
3.1.5 Präzipitation und Analyse von Überstandsproteinen.....	48
3.1.6 RNA-Isolation mit einem Säulensystem.....	49
3.1.7 Analyse der Genexpression mittels quantitativer RT-PCR.....	49
3.2 Teil B: Versuche mit RAW 264.7-Makrophagen.....	53
3.2.1 RAW 264.7-Zellkultur	53
3.2.2 Versuchsdurchführung mit RAW 264.7-Makrophagen.....	53
3.2.3 RNA-Isolation mit Phenol-Chloroform-Extraktion.....	55
3.3 Statistische Analyse	56
4 Ergebnisse.....	57
4.1 Teil A: Primäre Kardiomyozyten	57
4.1.1 Einfluss moderater Hypothermie auf kardiale Zelltodmechanismen.....	57
4.1.2 Einfluss moderater Hypothermie auf oxidativen Stress.....	59
4.1.3 Einfluss moderater Hypothermie auf die Inflammationsreaktion.....	61
4.1.4 Einfluss moderater Hypothermie auf Kälteschockproteine.....	67
4.2 Teil B: RAW 264.7-Makrophagen	70
5 Diskussion	72
5.1 Therapeutische Hypothermie und kardiale Zelltodmechanismen	72
5.2 Ischämie/Reperfusionen-bedingter oxidativer Stress	73
5.3 Kälteschockproteine in primären Kardiomyozyten.....	75

5.4 Primäre Kardiomyozyten und die sterile Inflamationsreaktion	76
5.4.1 Zytokinproduktion in primären Kardiomyozyten.....	76
5.4.2 Freisetzung von DAMPs durch primäre Kardiomyozyten.....	79
5.5 Vorversuche mit RAW 264.7-Makrophagen	81
5.6 Limitationen	82
5.7 Schlussfolgerungen und Ausblick	84
6 Literaturverzeichnis	85
7 Eidesstattliche Versicherung.....	102
8 Lebenslauf.....	103
9 Publikationsliste.....	105
10 Danksagung	106

I. Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
ADP	Adenosindiphosphat
AHA	American Heart Association
AIF	Apoptose-induzierender Faktor
AIF-1	Allograft inflammatory factor-1
AMI	Akuter Myokardinfarkt
APAF-1	Apoptotischer Protease-aktivierender Faktor-1
APS	Ammoniumperoxidisulfat
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BAX	Bcl-2-assoziiertes X Protein
BCA	Bicinchoninsäure
BCL	B-Zell Lymphom
BSA	Bovines Serumalbumin
CDNA	Komplementäre DNA
CIRBP	Cold-inducible RNA-binding Protein
COX-2	Cyclooxygenase-2
CPB	Kardiopulmonaler Bypass
DAMP	Damage-associated Molecular Pattern
DEPC	Diethyldicarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNTP	Deoxynukleotide
DTT	Dithiothreitol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EKG	Elektrokardiogramm
FAM	6-Carboxyfluorescein
FBS	Fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HKS	HerzKreislaufstillstand

HMGB-1	High Mobility Group Box-1
HSP70	Hitzeschockprotein 70
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1
IHK	Ischämische Herzkrankheit
IL-1 α , -1 β , -6, -10	Interleukin-1 α , -1 β , -6, -10
I/R	Ischämie und anschließende Reperfusion
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
nNOS	Neuronale NO-Synthase
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LDL	Low Density Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharide
MCP-1	Monozyten-chemotaktisches Protein-1
mPTP	Mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore
mRNA	Messenger-RNA (Boten-RNA)
MYD88	Myeloid differentiation primary response 88
NAD(P)H	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid(-Phosphat)
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NO	Stickstoffmonoxid
(N)STEMI	(Nicht-)ST-Elevations-Myokardinfarkt
OGD	Oxygen-glucose-deprivation, simulierte Ischämie
OGD/R	OGD und anschließende Reperfusion
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCI	perkutane Koronarintervention
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PRR	Pattern Recognition Rezeptor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RBM3	RNA-binding motif Protein 3
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
(RT-)PCR	(Real-Time) Polymerase-Ketten-Reaktion

SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SOCS-3	Suppressor of cytokine signaling-3
SPECT	Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie
TAMRA	5-Carboxytetramethylrhodamin
TBE	TRIS-Borsäure-EDTA
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TH	Therapeutische Hypothermie
TLR	Toll-Like-Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TTM	Targeted Temperature Management

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zeit-Temperatur-Protokoll zur Untersuchung der Zelltodmechanismen in primären Kardiomyozyten.....	40
Abbildung 2: Zeit-Temperatur-Protokoll der Versuche mit primären Kardiomyozyten	41
Abbildung 3: Zeit-Temperatur-Protokoll der Versuche mit RAW 264.7-Makrophagen.....	54
Abbildung 4: Nekrotischer und apoptotischer Zelltod in primären Kardiomyozyten.....	58
Abbildung 5: Oxidativer Stress in primären Kardiomyozyten.	60
Abbildung 6: Genexpression pro-inflammatorischer Zytokine in primären Kardiomyozyten während der simulierten Ischämie.....	62
Abbildung 7: Genexpression pro-inflammatorischer Zytokine in primären Kardiomyozyten während der Reperfusionsphase.....	64
Abbildung 8: Freisetzung der DAMPs durch primäre Kardiomyozyten während der simulierten Ischämie.	66
Abbildung 9: Genexpression von Kälteschockproteinen in primären Kardiomyozyten während der simulierten Ischämie.....	68
Abbildung 10: Genexpression von Kälteschockproteinen in primären Kardiomyozyten während der Reperfusionsphase.....	69
Abbildung 11: Genexpression in RAW 264.7-Makrophagen nach Inkubation mit einem CIRBP-neutralisierenden Antikörper.	71

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der therapeutischen Hypothermie	23
Tabelle 2: Zusammensetzung der Versuchsmedien für primäre Kardiomyozyten.....	39
Tabelle 3: Zusammensetzung des Zelllyse-Puffers.....	43
Tabelle 4: Zusammensetzung der 15% SDS-Polyacrylamid-Gele	45
Tabelle 5: Zusammensetzungen des Elektrophorese- und des Blotting-Puffers	45
Tabelle 6: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper	47
Tabelle 7: Zusammensetzung des Waschpuffers und des Stripping-Puffers.....	47
Tabelle 8: Zusammensetzung des Agarose-Gelelektrophorese-Puffers und des Gels.....	50
Tabelle 9: Reagenzien für die quantitative RT-PCR pro well	52
Tabelle 10: Zusammensetzung des Vollmediums der RAW 264.7-Makrophagen.....	54
Tabelle 11: Via quantitativer RT-PCR untersuchte Marker der RAW 264.7-Makrophagen	70

IV. Abstrakt

Einleitung: Der akute Myokardinfarkt gehört zu den weltweit führenden Todesursachen. Die Ischämie und therapeutische Reperfusion des Myokards kann durch Induktion einer Zytokinproduktion und Freisetzung Schädigungs-assoziiierter Moleküle (DAMPs) zu einer sterilen Inflammationsreaktion führen. Therapeutische Hypothermie (TH) hat sich bereits zur Neuroprotektion etabliert und stellt, wie *in vitro*- und *in vivo*-Studien belegen, auch eine vielversprechende kardioprotektive Interventionsmöglichkeit dar. Die zellulären Mechanismen der TH sind jedoch noch unzureichend erforscht. In der vorliegenden Arbeit wurden daher sowohl der Effekt intranschämisch applizierter moderater TH (33,5 °C) auf die Zellviabilität primärer Kardiomyozyten während einer simulierten Ischämie (Oxygen-glucose-deprivation, OGD) und anschließenden Reperfusion (OGD/R), als auch die Initiierung der sterilen Inflammationsreaktion untersucht.

Methoden: Primäre murine Kardiomyozyten wurden einer 2-, 4- oder 6-stündigen OGD (0,2% O₂, Mangelmedium ohne Glucose und Serum) ausgesetzt, gefolgt von einer 6-stündigen Reperfusion (21% O₂, Vollmedium). Moderate TH (33,5 °C) wurde intranschämisch 1 Stunde nach Versuchsbeginn induziert und für den gesamten Versuch aufrechterhalten, während eine normotherme Versuchsgruppe bei 37 °C inkubiert wurde. Eine normoxische, normotherme Gruppe diente als Kontrolle. Der nekrotische Zelltod wurde anhand der LDH-Freisetzung in den Zellkulturüberstand quantifiziert, der apoptotische via Caspase-3-Aktivierung in Western-Blot-Analysen. Ebenso wurde die Genexpression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α , der iNOS als Mediator für oxidativen Stress, der anti-apoptotischen Kälteschockproteine RBM3 und CIRBP via quantitativer RT-PCR nach 6-stündiger OGD und 12 bzw. 24 Stunden Reperfusion untersucht. Die Freisetzung der DAMPs HMGB-1, CIRBP und Hsp70 in den Zellkulturüberstand wurde via Western-Blot bestimmt. In Vorversuchen wurden murine RAW 264.7-Makrophagen mit dem Zellkulturüberstand OGD/R-geschädigter Kardiomyozyten inkubiert und inflammatorische Marker via quantitativer RT-PCR analysiert.

Ergebnisse: Mit zunehmender OGD-Dauer ist ein Übergang von Apoptose zu Nekrose nachweisbar. TH reduziert beide Zelltodmechanismen signifikant. Die iNOS-Genexpression und die Freisetzung der untersuchten DAMPs nehmen korrelierend mit der Nekrose während der OGD-Phase zu und können durch TH verringert werden. Während der OGD/R ist die

Genexpression weder von IL-1 β , IL-6 noch von TNF- α signifikant reguliert. In der Reperfusion steigt die Genexpression von RBM3 und CIRBP signifikant. Die Inkubation von RAW 264.7-Makrophagen mit dem Zellkulturüberstand OGD/R-geschädigter Kardiomyozyten zeigt in Vorversuchen keine Regulation inflammatorischer Marker.

Schlussfolgerungen: OGD/R-geschädigte primäre Kardiomyozyten können durch Freisetzung von DAMPs zur Initiierung einer sterilen Inflammationsreaktion beitragen. Moderate TH erhöht die Zellviabilität im Vergleich zur normothermen Versuchsgruppe, induziert anti-apoptotische Kälteschockproteine, verringert die DAMP-Freisetzung und ist somit ein vielversprechender Ansatz zur Kardioprotektion.

V. Abstract

Objective: Acute myocardial infarction is one of the leading causes of death worldwide. Myocardial ischemia followed by therapeutic reperfusion can induce a sterile inflammatory response by enhancing cytokines production and the release of damage-associated molecular patterns (DAMPs). Therapeutic hypothermia (TH) has been established for neuroprotection and is, as suggested by *in vitro* and *in vivo* studies, a promising cardioprotective approach. However, the cellular mechanisms of TH remain to be elucidated. In this thesis, we investigated the effect of intra-ischemic moderate TH (33.5 °C) on primary cardiomyocytes viability during oxygen-glucose-deprivation (OGD) followed by simulated reperfusion (OGD/R) and the initiation of a sterile inflammatory response.

Methods: Primary murine cardiomyocytes were exposed to 2, 4, or 6 hours OGD (0.2% O₂, medium without glucose and serum), followed by 6 hours reperfusion (21% O₂, complete medium). Moderate TH (33.5 °C) was induced intra-OGD 1 hour after experimental start and maintained for the remaining duration of the experiment, while the normothermic group was incubated at 37 °C. A control group was maintained at normothermic and normoxic condition. Cell necrosis was assessed by LDH release and apoptosis by Western Blot for Caspase-3 activation. Gene expression of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, and TNF- α , mediator of oxidative stress iNOS, and anti-apoptotic cold shock proteins RBM3 and CIRBP were analyzed via quantitative RT-PCR after 6 hours OGD, 12 and 24 hours reperfusion. DAMP release of HMGB-1, CIRBP, and Hsp70 into the cultured supernatant was determined via Western Blot. Moreover, murine RAW 264.7 macrophages were incubated with the supernatant from OGD/R-damaged primary cardiomyocytes and inflammatory markers were analyzed by quantitative RT-PCR.

Results: Increasing durations of OGD lead to a switch in cell death mechanisms from apoptosis to necrosis, which are significantly attenuated by moderate TH. Correlating with necrosis, iNOS gene expression and the release of DAMPs increase during OGD and are reduced by TH. No significant differences in the regulation of IL-1 β , IL-6, or TNF- α during OGD/R were observed. However, RBM3 and CIRBP gene expressions are significantly increased by TH during reperfusion. Incubation of RAW 264.7 macrophages with supernatants from OGD/R-damaged

primary cardiomyocytes does not result in any observable regulation of inflammatory markers in preliminary experiments.

Conclusion: OGD/R damaged primary cardiomyocytes can contribute to the sterile inflammatory response by releasing DAMPs. Moderate TH increases cell viability compared to normothermia, induces anti-apoptotic cold shock proteins expression, potentially attenuates the release of DAMPs, and is therefore a promising approach for cardioprotection.

1 Einleitung

1.1 Klinischer Hintergrund

Kardiovaskuläre Erkrankungen gehören zu den führenden Todesursachen weltweit. Eine von der „Global Burden of Disease“ durchgeführte Studie konnte darlegen, dass die geschätzte globale Prävalenz von Herzkreislauferkrankungen im Jahr 2015 bei etwa 422 Millionen lag. Im selben Jahr wurden weltweit etwa 17,9 Millionen kardiovaskulär bedingte Todesfälle verzeichnet, was einem Drittel aller Todesfälle entsprach. Darunter war die ischämische Herzkrankheit (IHK) die vorherrschende Todesursache (8,9 Millionen Todesfälle), gefolgt vom apoplektischen Insult (2,9 Millionen Todesfälle) [1].

Obwohl in Ländern mit einem hohen sozioökonomischen Index in den letzten Jahrzehnten ein stetiger Abfall dieser Erkrankungen beobachtet werden konnte, zeigten Analysen anderer Regionen einen deutlich geringeren oder keinen Abfall. Diese Beobachtung korreliert damit, dass die IHK zwischen 1990 und 2010 weltweit vom vierten Rang der Ursachen für durch Krankheit beeinträchtigte und verlorene Lebensjahre (Disability-Adjusted Life Years) auf den ersten Rang stieg und die Prävalenz von Nikotinabusus, Diabetes mellitus und arteriellem Hypertonus, den Hauptrisikofaktoren kardiovaskulärer Erkrankungen, steigend ist [1-3].

Die IHK beruht auf einer für das Myokard ungenügenden Sauerstoffzufuhr, die sich bereits in Ruhe (NYHA IV), erst bei körperlicher Belastung mit erhöhtem Sauerstoffbedarf bemerkbar machen kann (NYHA II – III) oder gänzlich asymptomatisch verläuft (NYHA I). Ursächlich für das Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffbedarf und -angebot sind dabei meist koronare atherosklerotische Plaques. Diese entstehen bevorzugt an Gefäßbifurkationen, wo es zu turbulenten Gefäßströmungen kommt, die in Patienten mit arteriellem Hypertonus generalisiert vorliegen. Durch die chronische Endothelbelastung kommt es zu einer adaptiven Verdickung der Intima mit erhöhter endothelialer Permeabilität. Dies begünstigt subendotheliale Lipidablagerungen, sogenannte Plaques, die zum einen eine stetige Inflammationsreaktion und zum anderen eine Stenosierung und Kalzifikation des betroffenen Gefäßes verursachen. Klinisch kommt es zum Bild der Angina Pectoris, einem meist retrosternalen Schmerz, der je nach Reproduzierbarkeit, Progredienz, Dauer und Ansprechen auf Nitrate in eine stabile oder instabile Form unterteilt wird. Seltener können pektanginöse Beschwerden auch durch Vasospasmen

verursacht werden, denen nicht immer eine atherosklerotische Gefäßveränderung zugrunde liegen muss [4-7].

Kommt es durch eine Plaqueruptur zu einem thrombotischen Gefäßverschluss, der zu einer länger anhaltenden Ischämie und konsekutiv zu einem Untergang von Kardiomyozyten führt, so spricht man von einem akuten Myokardinfarkt (AMI). Dieser wird anhand von laborchemischen Markern wie unter anderem Troponin T zum einen von einer Angina Pectoris abgegrenzt, zum anderen kann durch das EKG ein ST-Elevations-Myokardinfarkt (STEMI) von einem Myokardinfarkt ohne Hebung der ST-Strecke (NSTEMI, Non-STEMI) differenziert werden.

Therapeutisch wird eine möglichst schnelle Reperfusion des Infarktareals je nach Verfügbarkeit durch eine primäre perkutane Koronarintervention (PCI), eine medikamentöse Fibrinolyse oder eine aortokoronare Bypass-Operation bei für eine PCI anatomisch ungünstigen Koronarverhältnissen angestrebt. Für bestimmte Pharmaka konnte während des akuten Ereignisses und in der Nachsorge bei kurz- bzw. langfristiger Applikation eine Verbesserung der Mortalität und Morbidität nachgewiesen werden. Hierzu zählen die antithrombotische Therapie durch duale Thrombozytenaggregationshemmung, die Applikation von β -Blockern, ACE-Hemmern bzw. Angiotensin-II-Rezeptor-Inhibitoren, Nitraten, Mineralokortikoid-Rezeptor-Antagonisten und Statinen zur Plaquestabilisierung und Optimierung des Lipidprofils. Ebenfalls sollten eine Lebensstilanpassung und Risikofaktorkontrolle durch Raucherentwöhnung, diätetische Maßnahmen zur Ernährungsumstellung und Gewichtsreduktion, körperliche Aktivität zur kardialen Rehabilitation und eine Blutdruckkontrolle erfolgen [8].

Zu den Frühkomplikationen nach einem AMI zählen neben einer Herzinsuffizienz, Perikarditis oder einer myokardialen Dysfunktion des betroffenen Ventrikels vor allem Herzrhythmusstörungen. Eine weitere Folge eines AMI können lebensbedrohliche Rupturen aufgrund von Myokardnekrosen im Bereich der Herzwand, des Ventrikelseptums oder des Papillarmuskels sein. Durch den Fortschritt der PCI ist ihre Inzidenz jedoch fallend [8].

Trotz der fortgeschrittenen therapeutischen Interventionsmöglichkeiten beim AMI liegt die Überlebensrate von Patienten nach einem Herzkreislaufstillstand (HKS) mit Rückkehr des Spontankreislaufs bis zur Krankenhausaufnahme nur bei 23,8% und sinkt bis zur Krankenhausesentlassung sogar auf 7,6% [9]. Eine Ursache dieser hohen Mortalitätsrate stellt das sogenannte „Post-Cardiac Arrest“-Syndrom dar, dessen Ätiopathogenese durch ein komplexes

Zusammenspiel aus HKS-bedingten Myokard- und Hirnschäden, systemischer Ischämie- und Reperfusionsschädigung und begünstigenden Pathologien, die initial zum HKS führten, erklärt wird [10]. Die klinische Manifestation dieses Syndroms ist sehr heterogen und stark abhängig vom Schweregrad des resultierenden ischämischen Insults der betroffenen Organe, der Ursache des HKS und Komorbiditäten des betroffenen Patienten. Sie reicht von Fieber, komatösen Zuständen, Krampfanfällen, Arrhythmien und Kreislaufdysregulationen bis hin zum Multiorganversagen und Tod [10].

1.2 Pathophysiologie des kardialen Ischämie- und Reperfusionsschadens

Aufgrund des hohen kontinuierlichen Bedarfs an Adenosintri-phosphat (ATP) weisen Kardiomyozyten eine hohe Mitochondriendichte auf. Da über 95% des benötigten ATPs durch die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien bereitgestellt wird, ist das Myokard auf eine aerobe Stoffwechsellage angewiesen und somit besonders anfällig für Ischämien und Hypoxien [11, 12]. Während es kurze ischämische Perioden unter 15 Minuten ohne irreversible Schäden tolerieren kann [13], kommt es bei längeren Ischämien zum Untergang von Kardiomyozyten. Die schnellstmögliche Reperfusion des ischämischen Myokards ist daher von höchster Priorität, jedoch kommt es bei einer plötzlichen Reperfusion auch zu einem nicht unerheblichen Reperfusionsschaden, der das ursprüngliche Infarktgebiet zusätzlich vergrößern kann [14].

1.2.1 Ischämie

Dem hohen Energiebedarf entsprechen Kardiomyozyten mit ihrer hohen intrazellulären Mitochondriendichte, was sie zur Energiegewinnung an einen aeroben Metabolismus bindet. Obwohl hauptsächlich Fettsäuren als Substrate dienen, sind Kardiomyozyten sehr anpassungsfähig und können ATP ebenso aus Kohlenhydraten, Aminosäuren und Ketonkörpern generieren [12]. Ein kurzfristig erhöhter Energiebedarf des Myokards kann durch Kreatinphosphat gepuffert werden, welches seine Phosphatgruppe in einer durch das Enzym Kreatinkinase katalysierten Reaktion auf Adenosindiphosphat (ADP) übertragen kann [15].

Kommt es im Rahmen einer Ischämie im betroffenen Gebiet zu einer anaeroben Stoffwechsellage, kann diese nicht langfristig kompensiert werden, was zu einer raschen Depletion von ATP und hochenergetischen organischen Phosphaten führt [11]. Durch das Energiedefizit werden ATPasen deaktiviert, darunter auch die Ca^{2+} -ATPase, die Ca^{2+} nach einer Muskelkontraktion aus dem Zytosol transportiert. Durch ihre Inaktivierung akkumuliert Ca^{2+} intrazellulär und es entsteht ein sogenannter „Calcium-Overload“, der wiederum in einer Aktivierung intrazellulärer Proteasen wie Calpain resultiert, die Komponenten des Zytoskeletts degradieren und so zu einer Instabilität des Kardiomyozyten führen [11]. Durch die nun vorherrschende anaerobe Glykolyse fällt vermehrt Lactat an und der intrazelluläre pH-Wert sinkt. Innerhalb kurzer Zeit kommt es durch eine pH-abhängige verminderte Sensitivität des Troponin C gegenüber Ca^{2+} zu einer kontraktilen Dysfunktion. Um dieser entgegenzuwirken, wird die Aktivität des Na^+/H^+ -Antiporters erhöht, Protonen werden nach extrazellulär transportiert, während Na^+ intrazellulär ansteigt. Der intrazellulär erhöhte Na^+ -Gehalt kann aufgrund des ATP-Defizits durch die Na^+/K^+ -ATPase jedoch nicht ausgeglichen werden und bewirkt infolge des abnehmenden Na^+ -Konzentrationsgefälles von extra- nach intrazellulär zudem die Inaktivierung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers, was wiederum das „Calcium-Overload“ aggraviert. Diese Prozesse führen intranschämisch schnell zum Untergang von Kardiomyozyten, jedoch werden sie durch den zytosolischen pH-Abfall zunächst verlangsamt [11, 16].

1.2.2 Reperfusion

Der Reperfusionsschaden ist definiert als eine durch die Wiederherstellung des koronaren Blutflusses verursachte myokardiale Schädigung nach einer Ischämie und kann bis zu 50% der endgültigen Infarktgröße ausmachen [17]. Diese Schädigung des Myokards äußert sich durch unterschiedliche Phänomene.

Als „myokardiales Stunning“ bezeichnet man eine anhaltende kontraktile Dysfunktion der Kardiomyozyten trotz reversiblen intranschämischen Schaden und Wiederherstellung eines adäquaten Blutflusses. Es handelt sich hierbei um ein multifaktorielles Phänomen, das unter anderem durch die gestörte Calciumhomöostase und die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) erklärt wird und sich in der Regel innerhalb weniger Tage bis Wochen

normalisiert [13, 17, 18]. Ebenso kann es zu Reperfusion-induzierten Arrhythmien kommen, die wie das „myokardiale Stunning“ reversibel sind [14].

Zu den irreversiblen Reperfusionsschäden zählt das sogenannte „No Reflow“-Phänomen. Dies beschreibt eine mikrovaskuläre Dysfunktion, die durch eine Schädigung der Kapillaren mit beeinträchtigter Vasodilatation, externe Kapillarkompression durch Schwellung des Endothels und der Kardiomyozyten oder mikrovaskuläre Obstruktion durch Plaquematerial oder Mikrothromben hervorgerufen wird. Sie limitiert die Reperfusion des Infarktareals und ist mit einem schlechteren klinischen Outcome assoziiert [13, 14].

Der Reperfusion-assoziierte Untergang von Kardiomyozyten, die am Ende der Ischämiephase noch vital waren, wird als letaler myokardialer Reperfusionsschaden bezeichnet. Ursächlich für den letalen Reperfusionsschaden sind unterschiedliche Mediatoren. Bei der Wiederherstellung des Sauerstoff- und Substratangebots kommt es zu einer vermehrten Bildung von ROS, unter anderem durch die Reaktivierung des Elektronentransports in den Mitochondrien. Andere Quellen der ROS-Synthese stellen die endotheliale Xanthinoxidase und die Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH)-Oxidase neutrophiler Granulozyten dar. ROS schädigen das reperfundierte Myokard über die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP) und Störung des sarkoplasmatischen Retikulums, was den intrazellulären Ca^{2+} -Gehalt zusätzlich erhöht. Dies beschleunigt die in Kapitel 1.2.1 beschriebenen Folgen des „Calcium-Overloads“ [14] und begünstigt Ca^{2+} -induzierte Hyperkontraktionen. Diese innerhalb der ersten Minuten nach Reperfusion auftretenden Hyperkontraktionen führen zu kardiomyozytären Membranbrüchen mit Zerstörung der Myofibrillenstruktur und werden auch als Kontraktionsbandnekrosen bezeichnet [16]. Weitere Schädigungsmechanismen der ROS beinhalten die Lipidperoxidation der Zellmembran, Enzymdenaturierung und direkte Schädigung von Desoxyribonukleinsäuren (DNA) [14].

Zusätzlich kommt es durch die Aktivierung des Elektronentransports und des mitochondrialen Potentials zu einem Influx von Ca^{2+} -Ionen in die Mitochondrien über einen Uniporter, was ebenso wie die ROS zu einer Öffnung der mPTP führt [14]. Auch die schnelle Wiederherstellung des physiologischen pH-Wertes durch die Stimulation des Na^+/H^+ -Austauschers und des $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Symporters führt zur Öffnung der mPTP, einem nicht-selektiven Kanal der inneren Mitochondrienmembran, der in der Pathophysiologie des letalen Reperfusionsschadens eine zentrale Rolle einnimmt und dessen Öffnung zur Depolarisation der Mitochondrienmembran mit

Entkopplung der Atmungskette, ATP-Verlust, Zelluntergang und Freisetzung der pro-apoptischen Proteine Cytochrom C und Apoptose-induzierender Faktor (AIF) führt [14, 19, 20].

Die genannten Komplikationen treten typischerweise innerhalb der ersten Minuten nach Reperfusion auf, jedoch kann es auch zu einem späten myokardialen Reperfusionsschaden kommen, dessen Initiierung schon in der Ischämie- oder frühen Reperfusionsphase beginnt. Zu den begünstigenden Faktoren eines späten Reperfusionsschadens zählt unter anderem eine den AMI begleitende Inflammationsreaktion, die das therapeutische Zeitfenster zur Reduktion des Infarktareals potentiell erweitert [14].

1.3 Sterile Inflammationsreaktion und DAMPs

In der frühen Reperfusionsphase kommt es unter anderem zu einer erhöhten Produktion und Freisetzung von ROS, Zytokinen und Adhäsionsmolekülen. Neben der direkten Schädigung von Zellstrukturen und der DNA (siehe Kapitel 1.2.2) wirken ROS chemotaktisch, rekrutieren neutrophile Granulozyten sowie Monozyten und Makrophagen zum Infarktareal und initiieren somit eine Inflammationsreaktion [21]. Da diese Inflammation ohne die Anwesenheit pathogener Erreger ausgelöst wird, spricht man auch von einer sterilen Inflammationsreaktion. Typische Promotoren stellen die Zytokine Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-1 β (IL-1 β) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) dar, die einerseits von den geschädigten Zellen selbst, andererseits auch von den rekrutierten immunkompetenten Zellen sezerniert werden können.

Bei der Initiierung und Unterhaltung der Inflammation spielen auch sogenannte Schädigungs-assoziierte Moleküle (damage-associated molecular patterns, DAMPs) eine Rolle. Hierbei kann es sich neben den bereits beschriebenen Zytokinen auch um andere Moleküle wie beispielsweise ADP/ATP oder Proteine handeln. Diese Proteine gelangen im Rahmen des Ischämie- und Reperfusionsschadens über unterschiedliche Mechanismen nach extrazellulär, wo sie an Pattern Recognition-Rezeptoren (PRR), unter anderem den Toll-Like-Rezeptoren (TLR), benachbarter oder immunkompetenter Zellen binden und über den Transkriptionsfaktor „Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells“ (NF- κ B) die Synthese von Zytokinen stimulieren. Dies trägt zur Aufrechterhaltung der Inflammationsreaktion bei [22].

1.3.1 High Mobility Group Box-1 (HMGB-1)

Das High Mobility Group Box-1 (HMGB-1) Protein ist ein nukleäres, Chromatin-bindendes Protein. Es ist in der Lage mit bestimmten Transkriptionsfaktoren zu interagieren, deren Affinität zur DNA zu erhöhen und somit die Transkription von Genen zu erleichtern [23]. Es wird von aktivierten Monozyten und Makrophagen sezerniert, kann jedoch auch passiv von nekrotischen Zellen in den Extrazellularraum freigegeben werden [24, 25]. *In vitro* Experimente von El Mezayen et al. konnten nachweisen, dass die Stimulation humaner THP-1-Makrophagen bzw. -Monozyten mit Lipopolysacchariden (LPS), einem Oberflächenmolekül gramnegativer Bakterien, zu einer stärkeren Induktion der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-8 führte als die Stimulation mit einem nekrotischen Zelllysate allein. Die Applikation von Antikörpern zur Neutralisierung der Proteine HMGB-1 und Hitzeschockprotein 70 (Hsp70), die beide im Zelllysate nachgewiesen wurden, konnte den nach LPS-Stimulation beobachteten Anstieg an Zytokinen wieder aufheben und die Inflamationsreaktion somit reduzieren [25].

1.3.2 Hitzeschockprotein 70 (Hsp70)

Intrazelluläres Hsp70 inhibiert sowohl die Caspase- als auch die AIF-abhängige Apoptose und hat somit eine entscheidende zytoprotektive Funktion [26, 27]. In vorherigen Projekten der Forschungsgruppe konnten Krech et al. zeigen, dass die Proteinexpression von Hsp70 in atrialen HL-1-Kardiomyozyten nach 6-stündiger simulierter Ischämie durch moderate Hypothermie von 33,5 °C sowohl im Zytosol als auch in Mitochondrien signifikant gesteigert wird [28]. Seine Expression wird auch durch Stressoren wie Hitzestress, Inflammation oder Zellschädigung stimuliert, da Hsp70 neben seiner anti-apoptotischen Funktion auch als Chaperon für die korrekte Faltung von Proteinen und die Verhinderung von Proteinaggregation zuständig ist [29].

Im Rahmen zellulärer Schädigung kann es zu einer Freisetzung von Hsp70 nach extrazellulär kommen. Dies kann entweder passiv oder auch aktiv durch stimulierte Monozyten/Makrophagen erfolgen [25]. Dort bindet es an die TLR-2 und -4 und wirkt über die „Myeloid differentiation primary response 88“ (MyD88)-abhängige Signalkaskade mit konsekutiver Aktivierung von NF- κ B und Freisetzung von Zytokinen pro-inflammatorisch [29, 30]. Somit ist es, wie in Kapitel 1.3.1 beschrieben, wesentlich an der Entstehung einer Inflamationsreaktion beteiligt.

Zudem belegen *in vitro* durchgeführte Experimente von Mathur et al., dass extrazelluläres Hsp70 über den TLR-2 kontraktile Dysfunktionen in HL-1-Kardiomyozyten begünstigt [31].

1.3.3 Cold-inducible RNA-binding Protein (CIRBP)

Das Cold-inducible RNA-binding Protein (CIRBP) ist ein nukleäres Protein dessen Expression durch unterschiedliche Stimuli, unter anderem Hypoxie und Kälte [32, 33], hochreguliert wird. Intrazellulär supprimiert es Signalwege der mitochondrialen Apoptose [33, 34] und übernimmt Ribonukleinsäure (RNA)- bzw. DNA-konservierende Funktionen. Während einer Hypothermie unterstützt es die korrekte Translation bestimmter „messenger“ RNA (Boten-RNA, mRNA) und ist für die post-transkriptionelle Regulation unterschiedlicher Transkripte zuständig, indem es an sie bindet, was ihre Stabilität erhöht, und die Initiierung ihrer Translation beschleunigt [35]. Die anti-apoptotische Wirkung von CIRBP konnte bereits in Tiermodellen bestätigt werden. So zeigte eine im Jahr 2016 publizierte Studie von Wang et al. in einem Rattenmodell, dass eine Kühlung der Tiere auf eine Temperatur von $31 \pm 0,5$ °C nach einem Schädel-Hirn-Trauma die Apoptose in bestimmten Hirnregionen supprimiert, während in denselben Regionen die CIRBP-mRNA- und -Proteinexpression erhöht ist. Ferner wurde durch eine Inaktivierung des CIRBP-Gens dieser anti-apoptotische und vor allem neuroprotektive Effekt wieder aufgehoben [36].

Bei zellulärem Stress kommt es einerseits zu einer Methylierung und Translokation von CIRBP in das Zytosol, wo es an mRNAs bindet, die für Stress-induzierte Moleküle kodieren, aber auch in sogenannten Stressgranula konserviert wird [35]. Andererseits kann CIRBP im Rahmen zellulärer Schädigung auch nach extrazellulär freigesetzt werden, wo es als DAMP pro-inflammatorische Funktionen erfüllt, indem es die Sekretion von TNF- α und HMGB-1 stimuliert, die wiederum andere pro-inflammatorische Zytokine hochregulieren [35].

Auch in der Klinik spielt extrazelluläres CIRBP eine immer wichtiger werdende Rolle. So konnte eine klinische Studie von Zhou et. al zeigen, dass hohe Plasmalevel von CIRBP in septischen Patienten mit einem schlechteren Outcome im Sinne eines erhöhten APACHE II und SOFA-Scores und einer erhöhten Mortalität korrelierten [37].

1.4 Zelltodmechanismen

Die in Kapitel 1.2 beschriebene Pathophysiologie des Ischämie- und Reperfusionsschadens und auch die Inflammationsreaktion führen letztlich zum Untergang des Kardiomyozyten. Der Zelltod kann dabei in zwei wesentliche Mechanismen unterteilt werden, denen wiederum unterschiedliche Signalkaskaden zugrunde liegen.

1.4.1 Apoptose

Die Apoptose ist ein programmierter Zelltod, der durch interne und auch externe Stimuli initiiert werden kann. Zu den internen Auslösern zählen unter anderem hypoxischer oder oxidativer Stress und Nährstoffmangel, die zu einer Freisetzung von Cytochrom C, einem Bestandteil der mitochondrialen Atmungskette, und AIF aus dem Mitochondrium in das Zytosol führen. Diese mitochondrialen Proteine führen zu einer Aktivierung apoptotischer DNasen und Proteasen, unter anderem Caspasen, die die intrinsische apoptotische Signalkaskade einleiten [38]. Dies geschieht über die Formierung des sogenannten Apoptosoms, welches durch die Komplexbildung von Cytochrom C mit dem apoptotischen Protease-aktivierenden Faktor-1 (Apaf-1) und ATP entsteht und über die Aktivierung der Caspase-9 die intrinsische Apoptose initiiert [39, 40]. Die Freisetzung des Flavoproteins AIF aus dem Mitochondrium leitet dagegen eine Caspase-unabhängige intrinsische Apoptose über die Kondensation von Chromatin und DNA-Fragmentierung ein [41].

Auch Proteine der „B-Cell Lymphoma“ (Bcl)-Familie spielen in der Regulation der intrinsischen Apoptose eine entscheidende Rolle. Die Vertreter dieser Gruppe lassen sich in pro-apoptotische (Bax, Bak) und anti-apoptotische (Bcl-2, Bcl-xL) Proteine unterteilen. Während Bcl-2 und Bcl-xL als Bestandteile der äußeren Mitochondrienmembran das Membranpotential stabilisieren und die Membranintegrität aufrechterhalten, kommt es bei erhöhter Expression von Bax und Bak zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran mit konsekutiver Aktivierung von Caspasen. Das relative Verhältnis der pro- und anti-apoptotischen Vertreter der Bcl-Familie zueinander bestimmt daher über die Initiierung oder Inhibierung der Apoptose [42].

Die Bindung bestimmter extrazellulärer Moleküle an Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Familie, wie zum Beispiel den TNF-Rezeptor-1 oder den Fas-Rezeptor, führt dagegen zur Aktivierung der extrinsischen Apoptose. Einige Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Familie binden auf ihrer zytosolischen Seite sogenannte „Todesdomänen“, die nach Bindung eines extrazellulären Signalmoleküls an den Rezeptor über Adaptermoleküle „Todeseffektordomänen“ rekrutieren und mit Aktivierung der Caspase-8 die Apoptose einleiten [43].

Extrinsische und intrinsische Apoptose sind folglich wesentlich abhängig von Caspasen, einer Familie von Endoproteasen, die Peptidbindungen in einer Cystein-abhängigen Reaktion kaskadenartig spalten [44]. Diese können grob in zwei Wirkungsbereiche eingeteilt werden: Die Caspasen-1, -4, -5 und -12 erfüllen inflammatorische Funktionen, während -3, -6, -7, -8 und -9 an den zellulären Prozessen der Apoptose beteiligt sind. Die apoptotischen Caspasen können wiederum unterteilt werden. So induziert die Aktivierung der Caspase-9 den intrinsischen apoptotischen Zelltod, während die Aktivierung der Caspase-8 zu Beginn der extrinsischen Signalkaskade steht. Die gemeinsame Endstrecke beider Signalwege wird durch die Caspasen-3, -6, und -7 gebildet [44]. Die kaskadenartige Spaltung der Caspasen ist ein energieabhängiger Prozess, der somit ein kennzeichnendes Merkmal der Apoptose darstellt. Am Ende der Signalkaskade steht eine Zellschrumpfung, gefolgt von einem geordneten Abbau der Zellbestandteile und nukleärer DNA in einzelne, von Plasmamembran umhüllte Vesikel, die von Makrophagen abgebaut werden.

1.4.2 Nekrose

Der nekrotische Zelltod ist im Gegensatz zur Apoptose nicht primär ATP-abhängig und ist durch eine Schwellung der Zelle mit Diskontinuität der Plasmamembran, Verlust energiereicher Phosphate und mitochondriale Schwellung charakterisiert, die letztlich die Öffnung der mPTP mit Anstieg des zytosolischen Calciumgehaltes zur Folge hat [45, 46]. Da durch die Disruption der Plasmamembran intrazelluläre Proteine und Zellorganellen nach extrazellulär gelangen und so kein in Vesikel geordneter Abbau durch Makrophagen stattfinden kann, kommt es beim nekrotischen Zelltod zu einer inflammatorischen Umgebungsreaktion.

1.5 Therapeutische Hypothermie

Hypothermie bezeichnet den Zustand einer erniedrigten Körperkerntemperatur unter 36 °C bei Erwachsenen. Hierbei unterscheidet man die ungewollte, „akzidentelle Hypothermie“ von der gezielten Senkung der Körpertemperatur, die als „induzierte Hypothermie“ bezeichnet wird. Werden bei der induzierten Hypothermie potentiell schädliche Nebenwirkungen der Kühlung kontrolliert oder gar ausgeschaltet, spricht man auch von einer „therapeutischen Hypothermie“ (TH) [47]. Da jedoch nicht nur die Zieltemperatur selbst, sondern auch das Temperaturprofil von Bedeutung ist, hat sich im klinischen Sprachgebrauch der Begriff des „Targeted Temperature Managements“ (TTM) etabliert. Die Bezeichnung TTM umfasst die drei kontrollierten Phasen des Temperaturprofils: eine Phase der Induktion, der Aufrechterhaltung und der Wiedererwärmung [48]. Die Einteilung der Hypothermie richtet sich nach der gewünschten Zieltemperatur [47]:

Tabelle 1: Einteilung der therapeutischen Hypothermie

Therapeutische Hypothermie	Temperatur
mild	34 °C – 35,9 °C
moderat	32 °C – 33,9 °C
moderat-tief	30 °C – 31,9 °C
tief	< 30 °C

1.5.1 Klinische Anwendungsbereiche der therapeutischen Hypothermie

Die Hypothermie zählt zu den ältesten Verfahren der Organprotektion deren positiven Effekte bereits vor über 5000 Jahren und zu Zeiten von Hippokrates beschrieben wurden [49, 50]. In der Klinik hat sie sich bis heute vor allem in der Neuroprotektion etabliert und findet bei der Therapie der perinatalen Asphyxie, nach einem HKS bei Erwachsenen und bei operativen Eingriffen mit kardiopulmonalem Bypass (CPB) Verwendung [51-56].

Um eine Senkung der Körperkerntemperatur zu erreichen, kann entweder die sogenannte Oberflächenkühlung durch beispielsweise Wassermatten, Kühljacken, mit Luft gefüllten Decken oder Kühlpads angewandt werden. Mehr Erfahrung erfordert dagegen die invasive, endovaskuläre Kühlung via Katheter mit der die Zieltemperatur jedoch schneller erreicht werden kann [49].

1.5.1.1 Therapeutische Hypothermie und Kardioprotektion

Obwohl sich die TH vor allem zur Neuroprotektion etabliert hat, stellt sie auch einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz zur Kardioprotektion beim AMI dar. So wird TH in Form von kalten Kardioplegielösungen oder lokaler Kühlung bereits bei kardiochirurgischen Eingriffen verwendet und auch zu transplantierende Organe werden während des Transportes gekühlt, um die durch Ischämie verursachten Schäden zu minimieren [56, 57]. Tierstudien in sowohl Hunden, Kaninchen als auch in Schweinen zeigen, dass die Applikation von TH das Infarktareal in unterschiedlichen Myokardinfarktmodellen reduzieren kann [58-62]. Dabei führt die Senkung der Körpertemperatur in einem Bereich von 35-42 °C pro 1 °C zu einer Verkleinerung des Infarktareals um 10-20% [62, 63]. Während ältere Versuche noch Temperaturen im Bereich der tiefen Hypothermie verwendeten, zeigen vor allem Versuche im Bereich moderater Hypothermie keine Beeinträchtigung der Myokardfunktion [60, 61].

Auch der Zeitpunkt der Kühlung spielt bei der Kardioprotektion eine entscheidende Rolle. Ein starker protektiver Effekt konnte insbesondere in Tierstudien nachgewiesen werden, die eine Kühlung bereits vor Beginn des ischämischen Insults induzierten [57]. Dies mag bei geplanten kardiochirurgischen Eingriffen mit CPB zwar eine Rolle spielen, ist in der Praxis des AMIs jedoch kaum umzusetzen. Die intraschämische Applikation von TH zeigt zwar eine geringere, aber trotzdem relevante Kardioprotektion, die mit zunehmender Zeitspanne zwischen arterieller Okklusion und Initiierung der Kühlung immer weiter abnimmt und kurz vor der Reperfusion bzw. nach Einsetzen der Reperfusion inexistent ist [57, 61].

Zwei randomisierte klinische Studien konnten den in Tierstudien immer wieder bewiesenen kardioprotektiven Effekt therapeutischer moderater Hypothermie beim STEMI im Menschen bisher nicht belegen. Die Ergebnisse dieser Studien, COOL-MI (n = 392) und ICE-IT (n = 228), wurden bisher nicht im Detail veröffentlicht, jedoch in Reviews zusammengefasst. In beiden Studien wurde die moderate Hypothermie durch endovaskuläre Kühlung erreicht und die Infarktgröße mithilfe einer Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (SPECT) eruiert. In der COOL-MI-Studie wurden Patienten innerhalb von 6 Stunden nach Einsetzen der Symptomatik rekrutiert und entweder direkt einer PCI unterzogen oder vor der Intervention endovaskulär gekühlt. Die prä-interventionelle Kühlung konnte in dieser Studie keine signifikante Reduktion des Infarktareals bewirken. Die Ergebnisse könnten jedoch verzerrt sein, da die Zeit zwischen

Ankunft in der Klinik bis zur PCI in Patienten mit endovaskulärer Kühlung durchschnittlich 18 Minuten länger war als bei Patienten, die direkt mit einer PCI therapiert wurden (110 vs. 92 Minuten) [64]. Ähnliche Ergebnisse zeigte auch die ICE-IT-Studie. In einer Subanalyse beider Studien konnte jedoch ein protektiver Trend bei STEMI-Patienten mit einem anterioren Infarkt und einer Körpertemperatur $< 35\text{ °C}$ zum Zeitpunkt der Reperfusion beobachtet werden. Eine daraufhin initiierte Studie zur Untersuchung des kardioprotektiven Effekts von TH bei Patienten mit anteriorem Myokardinfarkt unter optimierten Bedingungen wurde aufgrund von Förderungsschwierigkeiten abgebrochen [64, 65].

Aufgrund der Ergebnisse der Tierstudien, der COOL-MI- und ICE-IT-Studien wurde deutlich, dass eine zeitliche Verzögerung der PCI durch Induktion der Hypothermie ihren kardioprotektiven Effekt mindert. Die randomisierten RAPID MI-ICE- (n = 20) und CHILL-MI-Studien (n = 120), die den Effekt moderater TH in STEMI-Patienten untersuchten, nutzten zur Kühlung ihrer Patienten neben einem endovaskulären Katheter ebenfalls die schnelle Infusion kalter Kochsalzlösung. Die Kühlung wurde jeweils vor Therapie via PCI induziert und für 1-3 Stunden nach Reperfusion aufrechterhalten. Im Gegensatz zur COOL-MI-Studie belief sich die durch die Kühlung bedingte Zeitverzögerung bis zur Reperfusion nur auf 8 Minuten im Vergleich zur ungekühlten Kontrollgruppe und 80% der gekühlten Patienten erreichten die Zieltemperatur von $\leq 35\text{ °C}$ [66]. Obwohl eine signifikante Reduktion der Infarktgröße in der CHILL-MI-Studie nicht erreicht werden konnte, zeigte die zusammengefasste Analyse beider Studien eine relative Reduktion von 15% des Infarktareals in Bezug zur Größe des gefährdeten Myokards, von der besonders Patienten mit einem großen gefährdeten Myokardareal ($> 30\%$ des linken Ventrikels) profitierten. Ebenso konnte TH die Inzidenz von Herzinsuffizienzen signifikant senken [66]. Dies zeigt, dass für den durch TH hervorgerufenen kardioprotektiven Effekt eine zügige Induktion der Kühlung entscheidend ist.

1.5.2 Wirkungsmechanismen der therapeutischen Hypothermie

Die Wirkungen der TH zur Zytprotektion sind vielfältig. Um den potentiellen Nutzen bei der Therapie des durch Ischämie und Reperfusion geschädigten Myokards gegen mögliche unerwünschte Wirkungen, insbesondere Blutungen und eine verzögerte Wundheilung [56, 67, 68], abwägen zu können, ist es wichtig, die Physiologie der protektiven Effekte zu kennen.

1.5.2.1 Zellulärer Stoffwechsel

Eine Senkung der Körperkerntemperatur führt pro 1 °C zu einer Reduktion der Stoffwechselrate um etwa 5-7%, wobei Sauerstoffverbrauch und CO₂-Produktion gleichermaßen abnehmen [40, 47]. Zu den zellulären Pathomechanismen während einer Ischämie zählt, wie in Kapitel 1.2.1 bereits erläutert wurde, die rasche ATP-Depletion innerhalb des minderversorgten Gewebes. Durch Herabregulation des Metabolismus kann TH die voranschreitende Energiedepletion unter Ischämie verzögern und somit ATP- und Glykogenspeicher aufrechterhalten [69-72]. Während man früher annahm, dass dies der Hauptmechanismus der protektiven Wirkung von Hypothermie sei, ist heute bekannt, dass die zellulären Mechanismen weitaus komplexer sind und die Effekte der Hypothermie auf einem Zusammenspiel von Induktion und Suppression unterschiedlicher Proteine und Signalwege beruhen.

1.5.2.2 Calciumhaushalt

Die aus Ischämie resultierenden intrazellulären Vorgänge wie der Calciumanstieg und die damit verbundene Degradation intrazellulärer Strukturen in Kardiomyozyten wurden bereits in Kapitel 1.2.1 beschrieben. In H9C2-Kardiomyozyten konnte eine moderat-tiefe TH (31 °C) nach simulierter Ischämie und Reperfusion sowohl den intrazellulären als auch den mitochondrialen Calciumeinstrom mindern und das mitochondriale Membranpotential durch Verhinderung der mPTP-Öffnung stabilisieren [72]. An einem Kaninchenmodell des AMI zeigten Tissier et al. vergleichbare Ergebnisse [73].

1.5.2.3 Oxidativer Stress

Die Entstehung von ROS durch die Wiederherstellung des Sauerstoffangebots während der Reperfusionsphase und die ROS-assoziierten zellulären Schädigungsmechanismen wurden bereits in Kapitel 1.2.2 thematisiert. Ein protektiver Mechanismus der TH beruht auf der verminderten Produktion von ROS. So konnten Maier et al. bei fokaler zerebraler Ischämie in Ratten belegen, dass milde Hypothermie die Entstehung von ROS im Bereich der ischämischen Penumbra signifikant reduziert [74]. Dies verhindert ebenso wie der verminderte intrazelluläre

Calciumstrom die Öffnung der mPTP, die damit verbundene Freisetzung der pro-apoptischen Proteine Cytochrom C und AIF und wirkt sich somit positiv auf das Überleben der Zelle aus [28].

1.5.2.4 Therapeutische Hypothermie und Apoptose

Neben der Stabilisierung des Calciumhaushalts und des mitochondrialen Membranpotentials konnten auch weitere anti-apoptische Effektormechanismen der Kühlung nachgewiesen werden. *In vivo* konnten Zhang et al. beobachten, dass bei zerebraler Ischämie in einem Rattenmodell das anti-apoptische Protein Bcl-2 bei intraischämisch applizierter Hypothermie im Vergleich zur normothermen (37 °C) Kontrollgruppe hochreguliert wird, was sich in einem signifikant verbesserten Überleben von hippocampalen CA1-Neuronen 72 Stunden nach Versuchsbeginn zeigte [75]. Ebenso ist bekannt, dass moderate TH auch über die Herabregulation von Caspase-3 anti-apoptisch wirkt [76-78]. Diese Reduktion der Caspase-3-Aktivierung konnte durch Zgavc et al. bei durch Endothelin-1 induzierter fokaler Ischämie in Ratten sogar eine Woche nach dem ursprünglichen Insult nachgewiesen werden [77] und betont die Nachhaltigkeit der durch TH hervorgerufenen positiven Effekte. In einem vorherigen Projekt der Arbeitsgruppe konnten Tong et al. auch in HL-1-Kardiomyozyten eine durch intraischämische Kühlung verminderte Aktivierung der Caspase-3 beobachten [79]. Weitere durch moderate TH hervorgerufene anti-apoptische Mechanismen beinhalten die Hochregulation der anti-apoptischen Proteine Hsp70 (Kapitel 1.3.2) [28, 80] und der Kälteschockproteine CIRBP und RNA-binding motif Protein 3 (RBM3).

1.5.2.5 CIRBP und RBM3

Während durch Hypothermie der zelluläre Metabolismus generell verlangsamt wird, wird die Expression von CIRBP und RBM3, sogenannten Kälteschockproteinen, die zuerst in überwinternden Säugetieren beschrieben wurden, hochreguliert [81, 82]. Die Expression dieser vor allem in neuronalen Zellen beschriebenen Kälteschockproteine gipfelt dabei jedoch nicht in Temperaturen der tiefen Hypothermie, obwohl die Expression bei tiefer Hypothermie im Vergleich zur Normothermie erhöht ist, sondern vor allem in Bereichen der moderaten Hypothermie [33]. Auf die anti-apoptische Funktion von CIRBP und seine Rolle als DAMP

nach Freisetzung in den Extrazellularraum wurde bereits in Kapitel 1.3.3 eingegangen. Anders als bei CIRBP wurde eine Freisetzung von RBM3 in den Extrazellularraum und eine damit einhergehende Induktion der sterilen Inflammationsreaktion noch nicht beschrieben [33]. Intrazellulär übernimmt es ähnlich wie CIRBP RNA-konservierende Funktionen als Chaperon und ist an der Regulation translationaler Prozesse beteiligt [83, 84]. *In vitro* konnten Ushio et al. beobachten, dass durch milde Hypothermie die Phosphorylierung von NF- κ B p65 induziert wird, was wiederum zu einer erhöhten Expression von RBM3 führt [83]. In neuronalen Modellen konnte gezeigt werden, dass RBM3 seine anti-apoptotische Funktion über die Suppression der Spaltung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) ausübt [85], die sonst einen entscheidenden Schritt der Caspase-abhängigen Apoptose darstellt. Die zellkonservierende Wirkung von CIRBP beruht dagegen auf der Inhibierung mitochondrialer Signalwege [33, 34].

Zudem konnten Peretti et al. in einem Mausmodell zeigen, dass eine defizitäre Expression von RBM3 zu einem vermehrten Verlust neuronaler Synapsen führt und die durch Hypothermie beobachteten neuroprotektiven Effekte unterbindet [86]. Die RBM3-Expression stellt somit einen Schlüsselmechanismus der Hypothermie und eine potentielle Therapiemöglichkeit neurodegenerativer Erkrankungen dar.

1.5.2.6 Therapeutische Hypothermie und Inflammation

Zu den vielfältigen protektiven Mechanismen der Hypothermie zählt ebenso die Reduktion pro-inflammatorischer Prozesse. Hierbei belegt eine von Zhang et al. publizierte Studie in einem *in vivo*-Modell der Ratte, dass moderate Hypothermie nach einem Schädel-Hirn-Trauma die Aktivierung von Mikroglia inhibiert und die Inflammationsreaktion durch Hemmung des TLR-4-Signalweges abschwächt [87]. Eine Aktivierung dieses Rezeptors und anderer PRR führt über die Aktivierung von NF- κ B zur Produktion von Zytokinen, die unter anderem chemotaktisch auf immunkompetente Zellen wirken und die Inflammation somit unterhalten. Doch auch in den nachfolgenden Schritten der pro-inflammatorischen Signalkaskade zeigt TH anti-inflammatorische Effekte. So reduziert TH die Expression pro-inflammatorischer Zytokine bei gleichzeitiger Stimulation anti-inflammatorischer Zytokine [88-90].

In einem *in vivo*-Rattenmodell konnten Shi et al. diesen anti-inflammatorischen Effekt der TH auch im Myokard belegen. Nach 1-stündiger koronararterieller Okklusion gefolgt von 48 Stunden

Reperfusion konnte moderate TH (32 °C), welche 2 Minuten nach Beginn der arteriellen Okklusion initiiert und nur bis zum Erreichen der Zieltemperatur aufrechterhalten wurde, eine signifikante Reduktion pro-inflammatorischer Zytokine, unter anderem IL-6 und TNF- α , bewirken [91].

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Die hohe Prävalenz der IHK und ihre führende Position in der Liste der weltweiten Todesursachen zeigen, dass die Therapie der IHK trotz weitem Fortschritt in den letzten Jahrzehnten immer noch Potential für Optimierungen bietet. Die TH stellt aufgrund der dargestellten protektiven Mechanismen einen potentiellen therapeutischen Ansatz für Patienten mit einem AMI dar. Zahlreiche Studien belegen ihren kardioprotektiven Effekt *in vitro* und in Tiermodellen. Klinische Studien, die auf Grundlage dieser vielversprechenden Daten durchgeführt wurden, konnten dies im Menschen bisher jedoch nicht eindeutig belegen, weshalb die Applikation der TH zur Kardioprotektion noch kontrovers diskutiert wird und einen Gegenstand der aktuellen Forschung darstellt. Als primär nicht immunkompetente Zellen sind Kardiomyozyten als Initiatoren der den AMI begleitenden Inflammationsreaktion bisher wenig untersucht. Da sie intrazellulär jedoch Proteine exprimieren, deren Funktion als DAMP bereits in der Literatur beschrieben wurde, stellt ihre Schädigung durch simulierte Ischämie (OGD, oxygen-glucose-deprivation) und anschließende Reperfusion (OGD/R) einen potentiellen Beitrag zur Initiierung und Aufrechterhaltung einer Inflammation dar.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden durch Experimente mit primären Kardiomyozyten folgende Fragestellungen untersucht:

1. Welchen Einfluss hat moderate TH auf die durch OGD/R induzierten Zelltodmechanismen in primären Kardiomyozyten?
2. Welche Rolle spielen OGD/R-geschädigte primäre Kardiomyozyten bei der Initiierung einer sterilen Inflammationsreaktion und wie wird diese durch moderate TH beeinflusst?
3. Kann moderate TH die Expression der anti-apoptotischen Proteine RBM3 und CIRBP in primären Kardiomyozyten induzieren?

Um die Vorgänge der sterilen Inflammationsreaktion und den Einfluss moderater TH nicht nur in einer Monokultur primärer Kardiomyozyten zu beurteilen, sollen im zweiten Teil der Arbeit die Effekte kardiomyozytärer DAMPs aus OGD/R-Schädigung auf immunkompetente Zellen analysiert und folgende Fragen beantwortet werden:

1. Kann die Inkubation mit dem Zellkulturüberstand OGD/R-geschädigter primärer Kardiomyozyten eine Inflammationsreaktion in RAW 264.7-Makrophagen stimulieren?
2. Wirkt sich die bei OGD/R-geschädigten primären Kardiomyozyten applizierte TH auch auf die Immunreaktion von RAW 264.7-Makrophagen im Sinne einer reduzierten Inflammation aus?

1.7 Vorangegangene Arbeiten und die Etablierung eines Zeit-Temperatur-Protokolls

In vorangegangenen Projekten der Arbeitsgruppe konnten Tong et al. zeigen, dass eine intraischämisch applizierte Kühlung 3 Stunden nach Beginn der Ischämie protektive Wirkungen in HL-1-Kardiomyozyten hervorruft. Dies war gekennzeichnet durch eine verminderte mitochondriale Dysfunktion, gemessen am intrazellulären ATP-Gehalt, im Vergleich zur normothermen ischämischen Versuchsgruppe und signifikant reduzierten apoptotischen Zelltod durch weniger aktivierte Caspase-3 [79]. Eine postischämisch induzierte Hypothermie zeigte hingegen keinen protektiven Effekt, was mit den Ergebnissen anderer publizierter Arbeiten einhergeht [57, 61]. Da es sich bei HL-1-Kardiomyozyten um eine von atrialen AT-1-Tumorzellen abgeleitete murine Tumorzelllinie handelt, ist das Zeit-Temperatur-Protokoll nicht direkt auf primäre Kardiomyozyten übertragbar. In der primären Kardiomyozyten-Kultur konnten Krech et al. zeigen, dass eine frühere, nach 1 Stunde applizierte Hypothermie die Zytotoxizität und Freisetzung des kardialen Schädigungsmarkers Troponin T signifikant reduziert [92]. Aufgrund dieser Ergebnisse etablierte unsere Arbeitsgruppe die intraischämisch induzierte Hypothermie auf 33,5 °C 1 Stunde nach Ischämiebeginn in das Zeit-Temperatur-Protokoll für primäre Kardiomyozyten.

2 Materialien

2.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller (Firma, Stadt, Land)
Bio-Fuge primo/fresco/pico (Zentrifugen)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Brutschrank CO ₂ -Inkubator, MCO-19AIC	Sanyo, USA
ChemiDoc XRSTM	Bio-Rad, München, Deutschland
CO ₂ -Inkubator mit O ₂ -Regelung CB60	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Durchlichtmikroskop	Motic, Wetzlar, Deutschland
Elektrophorese-/Blotting-Netzteil	Biometra, Göttingen, Deutschland
Elektrophorese-/Blotting-Netzteil	Bio-Rad, München, Deutschland
Magnetrührer	Roth, München, Deutschland
Mikrowelle	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland
Milli-Q® Direct Wasseraufbereitung	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Multiskan Reader Ascent	Thermo Fisher, Karlsruhe, Deutschland
NanoDrop 2000c Spektralphotometer	Thermo Fisher, Karlsruhe, Deutschland
Präzisionswaage BP4100S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
PTC-200 Peltier Thermal Cycler	Bio-Rad, München, Deutschland
Schüttler Promax	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Sicherheitswerkbank Lamin Air	Heraeus, Hanau, Deutschland
StepOne Plus Real-Time PCR-System	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
GeneFlash Gel Documentation Darkroom UV Transilluminator	Syngene Bio Imaging, Cambridge, UK
Thermoblock	Biometra, Göttingen, Deutschland
Tiefkühlschrank (-20 °C)	Liebherr, Biberach an der Riß, Deutschland
Tiefkühlschrank (-80 °C)	FRYKO, Esslingen, Deutschland
Vortex-2 Genie Wasserbad BD 10	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Wasserbad BD 10	Memmert, Schwabach, Deutschland

2.2 Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller (Firma, Stadt, Land)
96-well-Platten	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) w 3,7 g/L NaHCO ₃ w 4,5 g/L D-Glucose w stable Glutamine	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) w/o D-Glucose w/o Sodium Pyruvate w L-Glutamine	Thermo Fisher, Karlsruhe, Deutschland
Fetal Bovine Serum (FBS)	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Penicillin/Streptomycin (10 ⁴ U/ml P & 10 ⁴ µg/ml S)	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Primocin™ (50 mg/ml) Antibiotikum	Invivogen, San Diego, CA, USA
Serologische Pipetten (5-50 ml)	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Spritzen Injekt (5 ml)	Braun, Melsungen, Deutschland
Sterilfilter Filtropur S0.2	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Vakuumfilterflaschen (250 ml und 500 ml)	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Zellkulturflaschen (25 cm ² und 75 cm ²)	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Zellkulturröhrchen (15 ml und 50 ml)	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Zellkulturplatten (12-well)	Thermo Fisher, Karlsruhe, Deutschland
Zellkulturschalen (40 mm Ø)	TPP, Trasadingen, Schweiz

2.3 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller (Firma, Stadt, Land)
Acrylamid [30%]	Roth, München, Deutschland
Borsäure [$\geq 99,8\%$]	Roth, München, Deutschland
Bovine Serum Albumin Fraktion V (BSA)	Roth, München, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, München, Deutschland
β -Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Coomassie Färbelösung	BioRad, München, Deutschland
cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Mannheim, Deutschland
DNA Gel Loading Dye (6x)	Thermo Fisher, Karlsruhe, Deutschland
Dura Super Signal West	Thermo Fisher, Karlsruhe, Deutschland
DEPC-treated H ₂ O	Thermo Fisher, Karlsruhe, Deutschland
EDTA [99%]	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Glycin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Guanidin-Hydrochlorid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
HCL [5 M]	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Roth, München, Deutschland
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Methanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Midori Green Direct	Nippon Genetics Europe, Düren, Deutschland
Natriumchlorid für die Molekularbiologie	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher, Karlsruhe, Deutschland
peqGOLD RNApure	VWR, Radnor, USA
Phosphatase Inhibitor Cocktail 3	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Pierce BCA-Protein-Assay, Reagent A+B	Thermo Fisher, Karlsruhe, Deutschland
Pierce Lane Marker Reducing Sample Buffer (5x)	Thermo Fisher, Karlsruhe, Deutschland
Ponceau-Färbelösung	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
SeaKEM® LE Agarose	Lonza Group, Basel, Schweiz

Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Sodium Orthovanadath	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
TaqMan Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, München, Deutschland
Trichloressigsäure (TCA)	VWR, Radnor, USA
Tris-aminomethan (TRIS)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Roth, München, Deutschland
Trypanblau [0,5%]	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tween 20	Roth, München, Deutschland

2.4 Kits

Bezeichnung	Hersteller (Firma, Stadt, Land)
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche, Mannheim, Deutschland
Pierce Primary Cardiomyocyte Isolation Kit	Thermo Fisher, Karlsruhe, Deutschland
GenUp™ Total RNA Kit	Biotechrabbit, Hennigsdorf, Deutschland
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

2.5 Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Hersteller	Katalognr.
β-Actin	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling, Boston, MA, USA	4967
Caspase-3	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling, Boston, MA, USA	9662S
CIRBP	Kaninchen, polyklonal	Abxexa, Cambridge, UK	abx002739
CIRBP	Kaninchen, polyklonal	Proteintech Europe, Manchester, UK	10209-2-AP
HMGB-1	Kaninchen, polyklonal	Chondrex, Redmond, WA, USA	7028
Hsp70	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling, Boston, MA, USA	4872

RBM3	Kaninchen, polyklonal	Proteintech Europe, Manchester, UK	14363-1-AP
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

2.6 Primer

Bezeichnung	Hersteller	Assay-ID
AIF	Thermo Fisher, Karlsruhe, Deutschland	Mm00479862 g1
CIRBP	Thermo Fisher, Karlsruhe, Deutschland	Mm00483336 g1
COX-2	Thermo Fisher, Karlsruhe, Deutschland	Mm03294838 g1
GAPDH	Thermo Fisher, Karlsruhe, Deutschland	Mm99999915 g1
IL-1 α	Thermo Fisher, Karlsruhe, Deutschland	Mm00439620 m1
IL-1 β	Thermo Fisher, Karlsruhe, Deutschland	Mm00434228 m1
IL-6	Thermo Fisher, Karlsruhe, Deutschland	Mm00446190 m1
IL-10	Thermo Fisher, Karlsruhe, Deutschland	Mm00439614 m1
iNOS	Thermo Fisher, Karlsruhe, Deutschland	Mm00440502 m1
MCP-1	Thermo Fisher, Karlsruhe, Deutschland	Mm00441242 m1
RBM3	Thermo Fisher, Karlsruhe, Deutschland	Mm01609819 g1
TNF- α	Thermo Fisher, Karlsruhe, Deutschland	Mm00443260 g1

2.7 Software

Bezeichnung	Hersteller (Firma, Stadt, Land)
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA
ImageLab™-Software 5.2.1	Bio-Rad, München, Deutschland
Quantity One	Bio-Rad, München, Deutschland
NanoDrop 2000-Software	Thermo Fisher, Karlsruhe, Deutschland
StepOne Plus Real-Time PCR-System-Software	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

2.8 Sonstige Materialien

Bezeichnung	Hersteller (Firma, Stadt, Land)
96-well Fast qPCR-Platte Halbrand	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Adhäsive qPCR Folie	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Chromatography Paper, 3 mm	Whatman, Maidstone, UK
Eppendorf, Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Gelkämme	Bio-Rad, München, Deutschland
Glasplatte (10,1x7,3 cm) / mit 15 mm Spacer	biostep, Burkhardtsdorf, Deutschland
Hämazytometer (Neubauer-improved)	Roth, München, Deutschland
Hämozytometer Deckgläser (Ø 15 mm)	VWR, Radnor, USA
Low Binding Reaktionsgefäße (DNA, Protein)	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
PVDF Membranen Fluoro Trans	PALL Life Sciences, Port Washington, NY, USA
Zellschaber 25 cm	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland

3 Methoden

3.1 Teil A: Versuche mit primären Kardiomyozyten

3.1.1 Präparation und Kultivierung primärer Kardiomyozyten

Unter der Projektnummer T 0044/08 wurde vor Versuchsbeginn eine Anzeige für die Tötung von Tieren zur Entnahme von Organen und Geweben beim Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin beantragt. Diese wurde am 03.03.2008 genehmigt und wird seitdem jährlich erneuert. Die für die Versuche verwendeten primären Kardiomyozyten entstammten 1-3 Tage alten Mäusen des Stammes C57/BL6 N aus der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin der Charité – Universitätsmedizin Berlin und wurden nach ihrer Isolation mithilfe des Pierce Primary Cardiomyocyte Isolation Kits kultiviert. Die Isolation erfolgte gemäß der Anleitung des Kits.

Nach Entnahme der Herzen wurden diese in Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) zunächst in 1-3 mm² große Stücke geschnitten, gewaschen und anschließend für 30 Minuten bei 37 °C mit den Enzymen Papain und Thermolysin inkubiert, um die Kardiomyozyten aus ihrem Zellverbund zu lösen. In einem weiteren Schritt wurden die Kardiomyozyten in Kulturmedium resuspendiert. Die Zellzählung erfolgte mithilfe eines Hämazytometers und einer Trypanblau-Färbung, die dysfunktionale und abgestorbene Zellen dunkel färbt, sodass diese in der Zählung unberücksichtigt blieben. Es wurden jeweils 3×10^6 Zellen auf Petrischalen mit 9,2 cm² Wachstumsfläche (TPP, 40 mm Ø) ausplattiert und vor Versuchsbeginn für sieben Tage bei 21% O₂, 5% CO₂ und 37 °C kultiviert. Der erste Mediumwechsel erfolgte 24 Stunden nach Ausplattieren der Kardiomyozyten mit einem Wachstumszusatz im Verhältnis 1:1000 (Growth Supplement, Pierce Primary Cardiomyocyte Isolation Kit), welcher das Wachstum funktionaler primärer Kardiomyozyten unterstützt und das der Fibroblasten supprimiert, um eine reine Kultur der primären Kardiomyozyten zu erreichen. Das Medium wurde anschließend alle zwei Tage gewechselt.

3.1.2 Versuchsdurchführung

3.1.2.1 Simulierte Ischämie und Reperfusion

In den Versuchen wurden die primären Kardiomyozyten einer simulierten Ischämie und anschließenden Reperfusion ausgesetzt. Die Ischämie wurde durch Sauerstoff- und Glucoseentzug (OGD) ohne Zusatz von fetalem Kälberserum (FBS) im Mangelmedium simuliert (Tabelle 2). Das für die Ischämiephase verwendete Mangelmedium wurde für mindestens 24 Stunden vor Versuchsbeginn in einer Hypoxiekammer bei 0,2% O₂ und 5% CO₂ äquilibriert. Die Simulation einer anschließenden Reperfusionsphase erfolgte durch die Wiederherstellung des Sauerstoff- und Glucoseangebots in Vollmedium (Tabelle 2) und Kultivierung bei 21% O₂ auf der für die Versuchsgruppe entsprechenden Temperatur. Die Zellen wurden in den Versuchen mit jeweils 1 ml des entsprechenden Mediums behandelt.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Versuchsmedien für primäre Kardiomyozyten

Medium	Zusammensetzung
Vollmedium	<ul style="list-style-type: none">• DMEM mit Glucose (Pierce Primary Cardiomyocyte Isolation Kit)• 10% FBS• 0,2% Primocin
Mangelmedium (Äquilibrierung bei 0,2% O ₂)	<ul style="list-style-type: none">• DMEM ohne Glucose, ohne Natrium-Pyruvat, mit L-Glutamin• 1% Penicillin/Streptomycin

3.1.2.2 Zeit-Temperatur-Protokolle

In der ersten Phase des Projektes wurde ein Zeit-Temperatur-Protokoll angewandt, welches die durch OGD und Reperfusion induzierten Zelltodmechanismen untersuchen sollte. Die Ischämie wurde jeweils für 2, 4 oder 6 Stunden im Mangelmedium bei 0,2% O₂ simuliert. Darauf folgte stets eine 6-stündige Reperfusionsphase mit Vollmedium bei 21% O₂ und 5% CO₂. So ergaben sich drei unterschiedliche Experimentdauern von 8, 10 oder 12 Stunden. Die optimale

Reperfusionsdauer von 6 Stunden zur Untersuchung der nekrotischen und apoptotischen Zelltodmechanismen wurde hierbei in Vorexperimenten der Forschungsgruppe ermittelt und im Zeit-Temperatur-Protokoll etabliert.

Die Zellen wurden in zwei Versuchsgruppen unterteilt: eine normotherme Versuchsgruppe wurde für die gesamte Versuchsdauer bei 37 °C inkubiert, während eine hypotherme Versuchsgruppe 1 Stunde nach Versuchsbeginn intraischämisch auf 33,5 °C gekühlt wurde (Abbildung 1). Die für die moderate TH gewählte Temperatur orientiert sich hierbei an den derzeit empfohlenen Temperaturen zur Neuroprotektion bei der Therapie von Erwachsenen nach HKS (32-36 °C) [53]. Eine normotherme und normoxische (21% O₂) Gruppe diente als Kontrolle und wurde für die Dauer der Ischämie und Reperfusion mit Vollmedium behandelt, wobei parallel zu den Versuchsgruppen ein Mediumwechsel erfolgte. Vor Beginn des Experiments wurden die Versuchsgruppen in Mangelmedium gewaschen, um etwaige Glucose-Rückstände aus dem Wachstumsmedium zu entfernen. Proben wurden jeweils nach der Ischämie- und nach der Reperusionsphase entnommen.

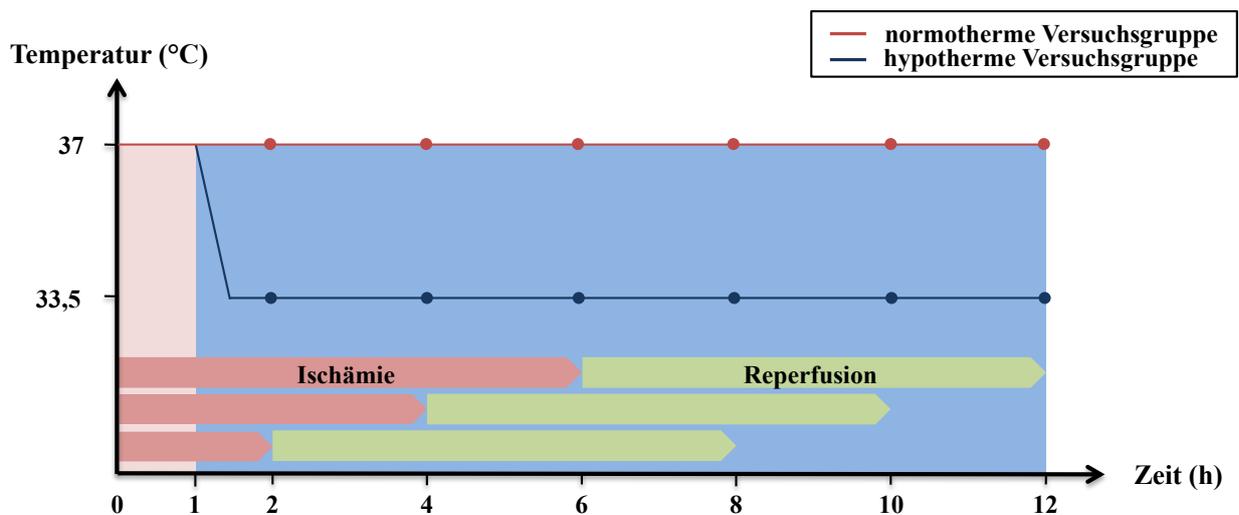


Abbildung 1: Zeit-Temperatur-Protokoll zur Untersuchung der Zelltodmechanismen in primären Kardiomyozyten

Um die Effekte moderater TH auch im weiteren Verlauf zu untersuchen, wurde das Zeit-Temperatur-Protokoll um eine längere Reperfusion von 12 und 24 Stunden nach 6-stündiger OGD erweitert (Abbildung 2). Die hier gewählte Dauer der Reperfusion orientiert sich ebenfalls an den Leitlinien der American Heart Association (AHA), die bei Erwachsenen nach HKS eine Kühlung von mindestens 24 Stunden empfiehlt [53].

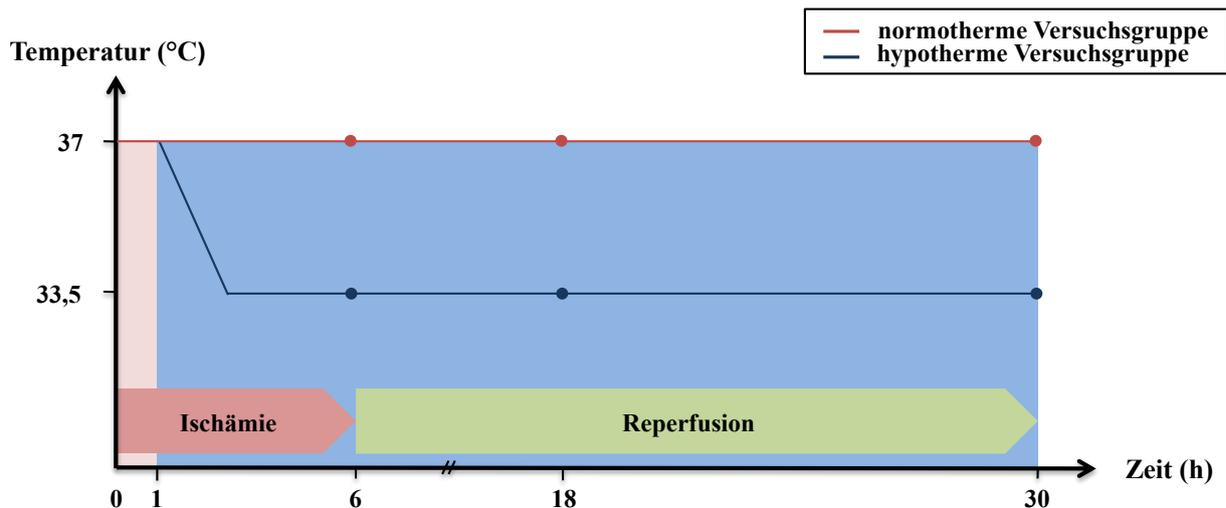


Abbildung 2: Zeit-Temperatur-Protokoll der Versuche mit primären Kardiomyozyten

3.1.3 Quantifizierung des nekrotischen Zelltodes mittels LDH-Assay

Zur Bestimmung des nekrotischen Zelltodes in den Versuchsgruppen wurde das Cytotoxicity Detection Kit der Firma Roche verwendet. Das Kit basiert auf einer kolorimetrischen Messung der Enzymaktivität der Lactat-Dehydrogenase (LDH) im Zellkulturüberstand der geschädigten primären Kardiomyozyten. Die LDH ist ein intrazelluläres Enzym, das die reversible Bildung von Pyruvat und NADH/H^+ aus Lactat und NAD^+ in beide Richtungen katalysiert. Durch eine gestörte Integrität der Zellmembran gelangt das Enzym in den Extrazellularraum, wo es im Rahmen der Pyruvatbildung NAD^+ zu NADH/H^+ reduziert. Die Protonen des so entstandenen NADH/H^+ werden durch den im Kit befindlichen Katalysator Diaphorase auf das gelbe Tetrazoliumsalz INT transferiert, welches dadurch zum roten Formazan reduziert wird und einen Farbumschlag hervorruft, der sich proportional zur LDH-Konzentration im Überstand verhält.

Für die Messung der LDH-Konzentration wurden die Zellkulturüberstände für 10 Minuten bei 12 000 xg zentrifugiert und ohne die zellulären Reste in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Je Probe wurden 100 μl in Doppelbestimmung in eine 96-well-Platte pipettiert. Die Reaktionslösung setzte sich aus dem Katalysator Diaphorase/ NAD^+ sowie dem Tetrazoliumsalz INT und Natrium-Lactat in einem Verhältnis von 1:46 zusammen. Nach Hinzugabe von jeweils 100 μl der Reaktionslösung wurden die Proben für 20 Minuten im Dunkeln inkubiert, wobei alle zwei Minuten eine photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 492 nm und 630 nm erfolgte. Die maximal mögliche LDH-Freisetzung wurde bestimmt, indem eine Petrischale mit zu Beginn

der Kultivierung zusätzlich ausplattierten Kardiomyozyten für 30 Minuten bei -80 °C weggefroren und anschließend wieder aufgetaut wurde, um so alle Zellmembranen aufzubrechen und einen maximalen LDH-Gehalt im Überstand zu erzeugen. Um die Rate an basaler, spontaner LDH-Freisetzung bei der Berechnung der Zytotoxizität auszuschließen, diente die ungeschädigte Gruppe als Nullkontrolle. Zusätzlich wurde die optische Dichte der Versuchsmedien gemessen, um Hintergrundsignale in den Medien von allen anderen Werten zu subtrahieren und damit ebenfalls auszuschließen. Die Berechnung der Zytotoxizität erfolgte nach einer vom Hersteller vorgegebenen Formel:

$$\text{Zytotoxizität [\%]} = \frac{\text{Messwert}_{\text{Zeitpunkt x}} - \text{Nullkontrolle}_{\text{Zeitpunkt x}}}{\text{Maximalkontrolle} - \text{Nullkontrolle}_{\text{Zeitpunkt x}}} \times 100$$

3.1.4 Western-Blot-Analysen

3.1.4.1 Gewinnung und Aufreinigung intrazellulärer Proteine

Die Proteinisolierung zu den jeweiligen Zeitpunkten erfolgte in allen Schritten auf Eis, um einer Proteindegradation durch Proteasen vorzubeugen. Die Zellen wurden zunächst mit eiskalter 1x Phosphat-gepufferter Salzlösung (Phosphat Buffered Saline, PBS) gewaschen, anschließend in 1 ml 1x PBS mithilfe eines Zellschabers von der Petrischale gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Petrischalen wurden dann mit 500 µl 1x PBS gespült, um etwaige Zellreste ebenfalls zu lösen. Die nun im PBS befindlichen Zellen wurden für 10 Minuten bei 6000 xg zentrifugiert, der Überstand vorsichtig verworfen und das Zellpellet in einem Zelllyse-Puffer (Radioimmunoprecipitation Assay Buffer, RIPA-Puffer) mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren resuspendiert (Tabelle 3). Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Zellyse-Puffers

RIPA-Puffer	
RIPA	<ul style="list-style-type: none">• 50 mM Tris-HCl• 150 mM NaCl• 1% Triton X 100• 0,1% SDS• 0,5% Natrium-Deoxycholat• 2 mM EDTA
Protease- und Phosphatase-Inhibitoren	Verhältnis zum RIPA-Puffer
<ul style="list-style-type: none">• cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor• Phosphatase Inhibitor Cocktail 3• Sodium Orthovanadath	1:100

3.1.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay

Um die Proteinkonzentration in den weggefrorenen lysierten Zellen zu bestimmen, wurden diese schonend auf Eis aufgetaut und anschließend für 10 Minuten bei 6000 xg zentrifugiert. Der Überstand mit den in ihm gelösten Proteinen wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Assay der Firma Thermo Fisher. Dieses beruht auf einer kolorimetrischen Messung von Cu^{1+} , welches bei der sogenannten Biuret-Reaktion, einer Reduktion von Cu^{2+} unter Anwesenheit von Proteinen in einem alkalischen Milieu, entsteht. Die Konzentration von Cu^{1+} -Ionen ist somit direkt abhängig von der Proteinkonzentration in den Proben. Der violette Farbumschlag resultiert aus der Chelation von je einem Cu^{1+} -Ion mit zwei BCA-Molekülen des Reagenzes und ist bei einem Absorptionsmaximum von 562 nm nahezu linear zur Proteinkonzentration in einem Bereich von 20-2000 $\mu\text{g/ml}$.

Für die Messung wurden die Proben 1:10 in Aqua bidest verdünnt und je 20 μl in Zweifachbestimmung zusammen mit einer Standardreihe bekannter Konzentrationen von bovinem Serumalbumin (BSA) auf eine 96-well-Platte pipettiert. Das Reagenz wurde in einem Verhältnis von 1:51 angesetzt und mit je 200 μl zu den Proben hinzugegeben. Nach einer

anschließenden 15-minütigen lichtgeschützten Inkubation bei 37 °C erfolgte die kolorimetrische Messung zur Quantifizierung des Farbumschlages bei einer Wellenlänge von 562 nm.

3.1.4.3 Proteinauftrennung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Analyse der Proteinregulation in den unterschiedlichen Versuchsgruppen erfordert eine Auftrennung der Proteine nach ihrer molekularen Masse. Dies wurde unter Anwendung einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Tabelle 4) erreicht. Dafür wurden die Proben auf eine Proteinmenge von 25-30 µg angepasst, mit Aqua bidest und 5x Probenpuffer auf gleiche Volumina ergänzt und für 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Durch die Hitze, das in dem 5x Probenpuffer enthaltene Dithiothreitol (DTT), was eine Spaltung von Disulfidbrücken bewirkt, und das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) des Elektrophoresegels wurde eine vollständige Denaturierung der Proteine und die Überführung in ihre lineare Form gewährleistet. Diese ist für die Auftrennung der Proteine nach ihrer molekularen Masse notwendig, um eine Akkumulation auf unterschiedlichen Höhen des Elektrophoresegels zu vermeiden. Für die Auftrennung der Proteine wurden 15% Polyacrylamid-Gele verwendet. Für die Polymerisation des Acrylamids wurden Tetramethylethyldiamin (TEMED) und 10% Ammoniumperoxidisulfat (APS) hinzugegeben. Jedes Gel wurde zusätzlich mit 3 µl der PageRuler Prestained Protein Ladder (ThermoFisher) als Marker für molekulare Massen beladen. Nach Auftragung der Proben erfolgte die Gelelektrophorese für insgesamt 2-3 Stunden bei zunächst 60 V, bis die Proteine das Sammelgel durchwandert und sich im Trenngel gesammelt hatten, und anschließend bei 100 V bis zur vollständigen Auftrennung der Proteinbanden. Die Zusammensetzung der Elektrophoresegele ist in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 4: Zusammensetzung der 15% SDS-Polyacrylamid-Gele

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

3.1.4.4 Proteintransfer

Für eine spätere Proteindetektion ist zunächst ein Transfer der im Polyacrylamid aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran notwendig. Die PVDF-Membranen wurden zunächst in Methanol aktiviert, um die Hydrophobie der Membranen zu verringern und somit einen Kontakt mit dem verwendeten Blotting-Puffer (Tabelle 5) zu ermöglichen. Die Membran und das Gel wurden luftdicht zwischen zwei Filterpapieren und zwei Schaumstoffschwämmen in einer Kunststoffkassette eingespannt und über Nacht bei 4 °C und 30 V geblottet. Zur Kontrolle des erfolgreichen Proteintransfers wurde die Membran am folgenden Tag mit einer Ponceau-Lösung für mindestens 15 Minuten reversibel angefärbt und anschließend eine Kopie angefertigt.

Tabelle 5: Zusammensetzungen des Elektrophorese- und des Blotting-Puffers

1x Elektrophorese-Puffer	1x Blotting-Puffer
25 mM Tris Base	25 mM Tris Base
192 mM Glycin	192 mM Glycin
3,47 mM SDS	200 ml Methanol
ad 1000 ml mit Aqua bidest	ad 1000 ml mit Aqua bidest

3.1.4.5 Immundetektion und densitometrische Analyse spezifischer Proteine

Nach dem erfolgreichen Proteintransfer auf die PVDF-Membran erfolgte zunächst eine einstündige Blockierung unspezifischer Bindungsstellen nach Herstellerangaben mit entweder 5% BSA oder 5% Magermilchpulver in 1x Tris-gepufferter Salzlösung mit Tween 20 (TBST). Anschließend wurde die Membran auf einem Schüttler über Nacht bei 4 °C mit einem spezifischen Primärantikörper (Tabelle 6), der in der jeweiligen Blockierungslösung verdünnt wurde, inkubiert. Um unspezifisch gebundene Primärantikörper zu lösen, folgten am nächsten Tag zuerst vier Waschschrte in 1x TBST für je 5 Minuten bevor die Membran für 1 Stunde mit dem jeweiligen Sekundärantikörper, nach Herstelleranleitung in 1x TBST verdünnt, inkubiert wurde. Darauf folgten wiederum vier Waschschrte mit 1x TBST für je 5 Minuten, um unspezifisch gebundene Sekundärantikörper zu lösen. Für die Detektion der Proteinbanden wurde die Membran mit Dura Super Signal West (Thermo Fisher) gleichmäßig benetzt und für 5 Minuten inkubiert. Die Reagenzien des Kits wurden 1:1 vermischt und enthalten sowohl Peroxid als auch Luminol. Das Peroxid dient der an dem Sekundärantikörper gebundenen Meerrettichperoxidase als Oxidationsmittel des Luminols. Diese Reaktion führt zur Emission eines Chemilumineszenzsignals, das mit der ChemiDoc (Bio-Rad) detektiert werden kann und sich proportional zur Proteinmenge in den Proben verhält. Für die Detektion der Proteinbanden wurden die Membranen jeweils für 30 Minuten belichtet. Ein Lichtbild der Membran diente hierbei als spätere Referenz für die Zuordnung der Banden zu ihrer molekularen Größe.

Die Proteinexpression wurde mithilfe des Programms Image Lab (Version 5.2.1) der Firma Bio-Rad quantifiziert. Dabei wurde die Intensität der Banden mithilfe des Programms densitometrisch ausgewertet und gegen die Ladekontrolle (Haushaltsprotein) β -Actin der jeweiligen Probe normalisiert, um vermeintlich unterschiedlich pipettierte Proteinmengen herauszurechnen. Diese Werte wurden wiederum gegen die Kontrollgruppe normalisiert und verglichen.

Tabelle 6: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper

Primärantikörper	Verdünnung	Blockierung	Sekundärantikörper 1:20 000
β-Actin	1:5000	5% BSA in TBST	Esel anti-Kaninchen
Caspase-3	1:500	5% Milch in TBST	Esel anti-Kaninchen
CIRBP	1:500	5% Milch in TBST	Esel anti-Kaninchen
HMGB-1	1:1000	5% BSA in TBST	Esel anti-Kaninchen
Hsp70	1:1000	5% BSA in TBST	Esel anti-Kaninchen
RBM3	1:1000	5% Milch in TBST	Esel anti-Kaninchen

Um eine Detektion unterschiedlicher Proteine mit gleicher molekularer Masse oder unterschiedlichen Blockierungslösungen der Primärantikörper auf derselben Membran zu ermöglichen, wurden die bereits gebundenen Primär- und Sekundärantikörper mithilfe eines Stripping-Puffers (Tabelle 7) von der Membran gelöst. Hierfür wurde diese dreimal für 10 Minuten mit je 3 ml Stripping-Puffer auf einem Schüttler inkubiert und viermal für je 3 Minuten in 1x TBST gewaschen. Daraufhin konnte die Membran erneut mit entweder 5% BSA oder 5% Milch in TBST geblockt, mit Primär- und Sekundärantikörper inkubiert und die Proteinexpression analysiert werden.

Tabelle 7: Zusammensetzung des Waschpuffers und des Stripping-Puffers

10x TBS	1x TBST	Stripping-Puffer
400 mM Tris Base	100 ml 10x TBS	6 M Guanidin Hydrochlorid
2,7 M NaCl	2 ml Tween 20 1:2 in	0,3% Triton X-100
pH 7,6 (eingestellt mit HCl)	Aqua bidest	20 mM Tris-HCl (pH 7,5)
	ad 1000 ml mit Aqua bidest	0,1 M β-Mercaptoethanol

3.1.5 Präzipitation und Analyse von Überstandsproteinen

Für die Analyse der im Zellkulturüberstand befindlichen Proteine wurden diese nach dem modifizierten Protokoll von Luis Sanchez präzipitiert [93]. Dazu wurden je 1 ml zellfreier Überstand der Versuchsgruppen für 30 Minuten mit 100% Trichloressigsäure (TCA) auf Eis inkubiert, für 20 Minuten bei 16 000 xg zentrifugiert und der Überstand danach dekantiert. Das nach der Zentrifugation auf dem Boden des Mikroreaktionsgefäßes befindliche Proteinpellet wurde in zwei Waschschrritten mit 250 µl eiskaltem Aceton gereinigt, für je 15 Minuten bei 16 000 xg zentrifugiert und das Aceton ebenfalls dekantiert. Die Proteine wurden in 20 µl RIPA-Puffer, mit in einem Verhältnis von 1:100 beigemischten Protease- und Phosphatase-Inhibitoren, und 4 µl 5x Probenpuffer resuspendiert. Um die präzipitierten Proteine in ihre lineare Primärstruktur zu überführen, wurden die Proben schließlich wie die intrazellulären Proteine ebenfalls bei 95 °C denaturiert und auf das Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

Die Gelelektrophorese, der Proteintransfer via Tank-Blotting-Methode und die Proteindetektion erfolgten gemäß der Beschreibung für die intrazellulären Proteine. Nach Blockierung unspezifischer Bindungsstellen und Inkubation der Membran mit den jeweiligen Primär- und Sekundärantikörpern erfolgte die Detektion der Proteinbanden mit der ChemiDoc nach einer stets gleichen Belichtungszeit von 30 Sekunden.

Die Isolation extrazellulärer Proteine war in den Medien der Kontrollgruppe und der reperfundierten Versuchsgruppen aufgrund des FBS und der somit hohen Albuminkonzentrationen nicht möglich. Ein einmaliger Versuch einer Proteinpräzipitation aus einem Überstand mit 10% FBS zeigte, dass für die Resuspension des Pellets zum einen deutlich höhere Mengen an RIPA-Puffer und 5x Probenpuffer verwendet werden mussten, wodurch die Vergleichbarkeit der extrazellulären Proteine nicht mehr gegeben war. Zum anderen maskiert das Albumin aufgrund seiner hohen Konzentration weitere Proteine, sodass eine Auswertung weiterer Proteine nicht möglich war. Die Analyse der Proteine im Überstand konnte daher nur für die Versuchsgruppen während der OGD-Phase erfolgen.

3.1.6 RNA-Isolation mit einem Säulensystem

Für die Isolation von mRNA aus den primären Kardiomyozyten kam das auf Nukleinsäure-Filtern basierende GenUp™ Total RNA Kit der Firma Biotechrabbit zur Anwendung. Die Extraktion der RNA aus den Proben erfolgte nach dem vom Hersteller mitgelieferten Protokoll. Zunächst wurden die Proben für 2 Minuten mit 400 µl Lysepuffer benetzt, anschließend resuspendiert und auf einen DNA-Filter pipettiert. Dieser bindet DNA, sodass sich die RNA nach 2-minütiger Zentrifugation der Proben bei 10 000 xg im Filtrat befand. Das Filtrat wurde mit 400 µl 70% Ethanol vermischt und zusammen auf einen zweiten Filter, den RNA-Filter, gegeben. Die Proben wurden erneut für 2 Minuten bei 10 000 xg zentrifugiert und die RNA in diesem Schritt an den Filter in den Säulen gebunden. Es folgten zwei Waschschritte, nach denen die Proben jeweils für 1 Minute bei 10 000 xg zentrifugiert wurden. Das Filtrat wurde stets dekantiert. Nach einer weiteren Zentrifugation zum Trocknen des Filters wurde die gebundene RNA mit 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C weggefroren.

3.1.7 Analyse der Genexpression mittels quantitativer RT-PCR

3.1.7.1 Bestimmung der RNA-Konzentration und Reinheit der Proben

Eine Analyse der relativen Genexpression der Proben erfordert zunächst die Bestimmung ihrer RNA-Konzentration. Dazu wurden je 2 µl einer Probe mit dem NanoDrop 2000c der Firma Thermo Fisher spektralphotometrisch bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm gemessen und so die RNA-Konzentration in ng/µl quantifiziert. Der Quotient der Messwerte dieser beiden Wellenlängen diente hierbei zur groben Überprüfung der Reinheit der Proben, wobei bei einem Quotienten von ~ 2 allgemein von einer reinen RNA-Probe auszugehen ist.

Die Reinheit und Integrität wurden anschließend mit einer Agarose-Gelelektrophorese (Tabelle 8) visuell überprüft. Hierfür wurden stets 1% Agarosegele verwendet. Die RNA (400 ng) wurde mit 1 µl Midori Green und 2 µl 6x Ladepuffer zusammen pipettiert und mit Diethyldicarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser auf gleiche Volumina ergänzt. Das Midori Green diente hierbei zur Färbung von Nukleinsäuren, die bei Exposition mit UV-Licht sichtbar wird. Die Proben wurden auf das Gel aufgetragen, für 25 Minuten bei 70 V elektrophoretisch aufgetrennt und mittels

UV-Licht visualisiert. Optimalerweise sind drei RNA-Banden auf Höhe der 28S-rRNA, 18S-rRNA und 5S-rRNA zu erkennen, wobei letztere jedoch nur selten zu detektieren ist. Eine etwaige Probenkontamination mit DNA wäre in der Aufnahme durch ihre Färbung mit Midori Green auf Höhe der Geltaschen zu erkennen, während eine sich durch das Gel ziehende Schlierenbildung mit unklar abgrenzbaren RNA-Banden Hinweise für eine RNA-Degradation liefern würde.

Tabelle 8: Zusammensetzung des Agarose-Gelelektrophorese-Puffers und des Gels

1x TBE	Agarosegel
44,5 mM Tris Base	0,5 g Agarose gelöst in
44,5 mM Borsäure	49,5 ml 1x TBE
2 mM EDTA pH 8,0	

3.1.7.2 Reverse Transkription

Nachdem die Reinheit der RNA-Proben mittels Agarose-Gelelektrophorese sichergestellt wurde, wurde die RNA in komplementäre DNA (cDNA) transkribiert. Hierfür wurden stets 1000 ng RNA der Proben entnommen und mit DEPC-behandeltem Wasser auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt. Die Transkription erfolgte mithilfe des High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits der Firma Applied Biosystems. Dafür wurde ein Mastermix aus einzelsträngigen Hexanukleotiden zufälliger Sequenz (Random Primers), Deoxynukleotiden (dNTP), reverser Transkriptase und RNase Inhibitor zusammen pipettiert und 1:1 mit den RNA-Proben versetzt. Die Umschreibung erfolgte am Thermocycler PTC-200 Peltier Thermal Cycler der Firma Bio-Rad. Die Proben wurden zunächst für 10 Minuten bei 25 °C, anschließend für 120 Minuten bei 37 °C und für 5 Minuten bei 85 °C inkubiert. Nach der Transkription wurden sie bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

3.1.7.3 Quantitative RT-PCR

Um die relative Expression bestimmter Gene der Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe darzustellen, wurde das Verfahren der quantitativen Real-time Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) genutzt, durch deren sich wiederholende Zyklen eine nahezu exponentielle Amplifikation der zu betrachtenden Gentranskripte ermöglicht wird. Dafür wurden von jeder Probe in Doppelbestimmung jeweils 2,5 µl von mit DEPC-behandeltem Wasser verdünnter cDNA (25 ng) in eine 96-well-Platte pipettiert und pro Probe insgesamt 7,5 µl Mastermix bestehend aus dem TaqMan-Primer, TaqMan Master Mix und DEPC-behandeltem Wasser hinzugefügt (Tabelle 9). Bei den TaqMan-Sonden der Primer handelt es sich um sogenannte Hydrolyse-Sonden, nämlich kurze Sequenzen von komplementären Basenpaaren, die wie die Primer genspezifisch an der cDNA binden.

Die Sonden sind an ihrem 5'-Ende mit dem fluoreszierenden Farbstoff 6-Carboxyfluorescein (FAM) und an ihrem 3'-Ende mit dem Quencher 5-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) markiert, der das Fluoreszenzsignal des FAM im Rahmen des Förster-Resonanzenergietransfers strahlungsfrei aufnimmt und somit unterdrückt. Kommt es während dem sogenannten Annealing der PCR zum Binden der Primer und der Hydrolyse-Sonden an ihren Zielabschnitt, so werden diese während der Amplifikationsphase von der DNA-Polymerase abgebaut und durch dNTPs ersetzt. Beim Abbau der Hydrolyse-Sonden in ihre einzelnen Basen entfernen sich FAM und TAMRA voneinander, der Förster-Resonanzenergietransfer wird aufgehoben und es kommt zur Emission des Fluoreszenzsignals, was wiederum durch das Programm detektiert werden kann [94, 95]. Die Proben durchliefen pro RT-PCR insgesamt 40 Zyklen à 15 Sekunden bei 95 °C und 1 Minute bei 60 °C. Als Haushaltsgen diente für alle Proben die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Zur Berechnung der relativen Änderung der Genexpression wurde die delta-delta CT Methode angewandt [96].

Tabelle 9: Reagenzien für die quantitative RT-PCR pro well

Proben	µl pro well
cDNA	0,5
DEPC H ₂ O	2
MasterMix	
Primer/Sonde	0,5
TaqMan Master Mix	5
DEPC H ₂ O	2

3.2 Teil B: Versuche mit RAW 264.7-Makrophagen

3.2.1 RAW 264.7-Zellkultur

Die letzte Phase des Projektes diente der Untersuchung der aus der Freisetzung von DAMPs und pro-inflammatorischen Zytokinen resultierenden Immunantwort. Die hierfür verwendeten RAW 264.7-Zellen wurden von der Firma ATCC (Manassas, USA) bezogen. Hierbei handelt es sich um adhärenz Makrophagen aus einem durch das murine Abelson-Leukämievirus transformierten Tumor einer adulten, männlichen BALB/c-Maus. Die Kryokultur wurde in ihrer 5. Zellpassage zügig bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und mit Kulturmedium gewaschen, um das im Gefriermedium enthaltene Dimethylsulfoxid (DMSO) zu entfernen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte zunächst in einer 75 cm²-Kulturflasche bei 37 °C und 5% CO₂. Ein Mediumwechsel fand alle zwei Tage statt. Nach Erreichen einer Konfluenz von 90-95% wurden die Zellen für die Versuche ausplattiert. Es wurden Zellen zwischen der 5. und 23. Zellpassage aus insgesamt zwei unterschiedlichen Kryokulturen verwendet.

3.2.2 Versuchsdurchführung mit RAW 264.7-Makrophagen

Vor Versuchsbeginn wurden 300 000 Makrophagen pro well in eine 12-well-Zellkulturplatte (Thermo Fisher) ausplattiert und für 24 Stunden mit Vollmedium (Tabelle 10) bei 37 °C, 21% O₂ und 5% CO₂ kultiviert. Zur Simulation einer sterilen Inflammationsantwort wurden die Makrophagen zu Versuchsbeginn mit Vollmedium gewaschen und anschließend für 24 Stunden mit dem Zellkulturüberstand der geschädigten primären Kardiomyozyten inkubiert. Hierfür wurden die Überstände der Versuchsgruppen (6 Stunden OGD 37 °C bzw. TH 33,5 °C, sowie nach 12 und 24 Stunden Reperfusion) und der Kontrollgruppe (37 °C Normoxie und Normothermie) der primären Kardiomyozyten verwendet. Als Positivkontrolle mit theoretisch maximaler Schädigung und folglich maximaler Ausschüttung von DAMPs diente der Überstand der primären Kardiomyozyten, die zum Verlust ihrer Membranintegrität bei -80 °C gefroren und wieder aufgetaut wurden. Um eine etwaige Schädigung der RAW 264.7-Makrophagen allein durch die Medien der primären Kardiomyozyten zu detektieren, wurde als Kontrolle jeweils eine Gruppe der Makrophagen mit Vollmedium und Mangelmedium der primären Kardiomyozyten inkubiert.

Um einem Zelluntergang der Makrophagen durch die Inkubation mit dem Medium einer anderen Zelllinie vorzubeugen, wurden die Medien der primären Kardiomyozyten und auch die verwendeten Überstände aus den Versuchen der Kardiomyozyten bei einem Gesamtvolumen von 500 µl pro well in einem Verhältnis von 1:2 mit dem Vollmedium der RAW 264.7-Makrophagen angesetzt. Als weitere, unbehandelte Kontrollgruppe wurde eine Gruppe für den gesamten Versuch mit 500 µl des für die Makrophagen entsprechenden Vollmediums behandelt.

Für die Versuche wurden die RAW 264.7-Makrophagen für 24 Stunden bei 21% O₂, 5% CO₂ und 37 °C mit dem Überstand der geschädigten primären Kardiomyozyten bzw. ihrer Mediumkontrollen inkubiert. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel und eine 6-stündige Inkubation mit 500 µl des Vollmediums der Makrophagen bei ebenfalls 37 °C, 21% O₂ und 5% CO₂ (Abbildung 3), um den Makrophagen genügend Nährstoffe für die Initiierung einer Inflammationsreaktion bereitzustellen.

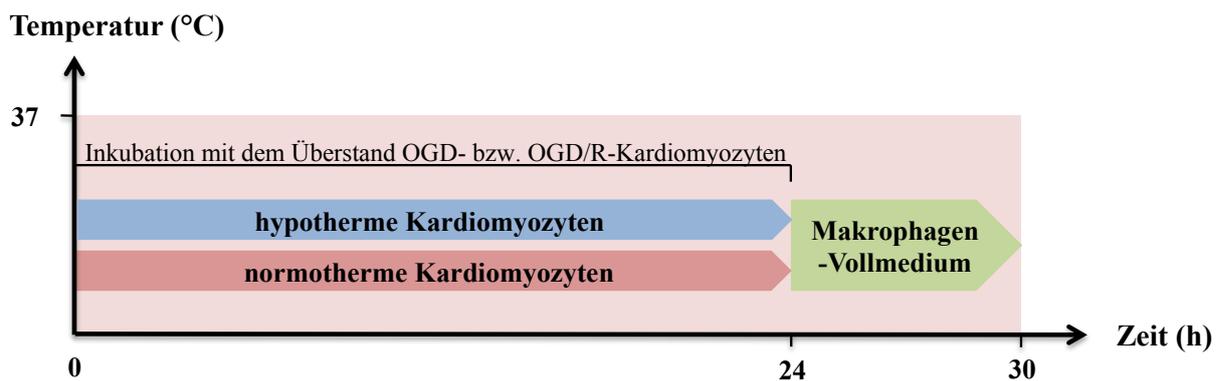


Abbildung 3: Zeit-Temperatur-Protokoll der Versuche mit RAW 264.7-Makrophagen
 OGD/R = simulierte Ischämie (Oxygen-glucose-deprivation, OGD) und anschließende Reperfusion

Tabelle 10: Zusammensetzung des Vollmediums der RAW 264.7-Makrophagen

Vollmedium der RAW 264.7-Makrophagen
DMEM (Merck Millipore)
10% FBS
1% L-Glutamin
1% Penicillin/Streptomycin
1% Natrium-Pyruvat

3.2.2.1 Inkubation mit einem CIRBP-neutralisierenden Antikörper

Als mögliche Intervention wurden die RAW 264.7-Makrophagen zusätzlich zu dem Überstand OGD- bzw. OGD/R-geschädigter Kardiomyozyten mit einem CIRBP-bindenden Antikörper (8 µg/ml) inkubiert, um zu untersuchen, ob eine durch die DAMPs der Kardiomyozyten initiierte Inflammation durch einen Antikörper gegen einzelne DAMPs abgeschwächt werden kann. Bei den verwendeten CIRBP-bindenden Antikörpern handelte es sich um einen Antikörper der Firma Proteintech, deren Antikörper auch für die Western-Blot-Analysen genutzt wurden.

3.2.3 RNA-Isolation mit Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Isolation der RNA erfolgte gemäß dem Protokoll des peqGOLD RNAPure-Kits der Firma VWR nach dem Prinzip der Phenol-Chloroform-Extraktion. Zur Lyse der Zellen wurden pro well zunächst 500 µl peqGOLD RNAPure auf die Zellen gegeben, diese durch mehrmaliges Pipettieren in der Lösung resuspendiert und schließlich in ein RNase-freies Reaktionsgefäß überführt. Durch eine 5-minütige Inkubation der Proben bei Raumtemperatur wurde die Dissoziation der Nukleotidkomplexe gewährleistet, anschließend wurden 100 µl Chloroform in die Reaktionsgefäße pipettiert und die Proben für 15 Sekunden geschüttelt. Es folgten jeweils eine 10-minütige Inkubation der Proben auf Eis und eine 15-minütige Zentrifugation bei 12 000 xg und 4 °C. Dabei bildeten sich drei sichtbare Phasen: eine schlierige, gelbliche Phenol-Chloroform-Phase im unteren Teil des Reaktionsgefäßes, eine obere wässrige, farblose Phase und eine weißliche, dazwischenliegende Interphase.

Die wässrige Phase, in der sich die RNA anreichert, wurde von jeder Probe vorsichtig abpipettiert, in ein frisches RNase-freies Reaktionsgefäß überführt, für die RNA-Präzipitation mit der gleichen Menge Isopropanol für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert und schließlich erneut für 5 Minuten bei 12 000 xg und 4 °C zentrifugiert. Das dabei entstandene Präzipitat wurde nach vorsichtiger Abnahme des Überstands zweimal mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen, zentrifugiert und getrocknet. Das Lösen des RNA-Präzipitates erfolgte durch vorsichtige Resuspension in 20 µl DEPC-behandeltem Wasser. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

Die Quantifizierung der gewonnenen RNA-Menge, die Überprüfung auf ihre Reinheit, die anschließende reverse Transkription in cDNA und die Analyse der Genexpression via quantitativer RT-PCR erfolgten gemäß den beschriebenen Verfahren des Kapitels 3.1.7.

3.3 Statistische Analyse

Alle Versuche wurden unabhängig voneinander durchgeführt. Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der gewonnenen Ergebnisse erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 5. Hierbei wurde der One-way ANOVA-Test zur einfachen Varianzanalyse multipler Gruppen mit Tukey Post-Test angewandt. P-Werte $< 0,05$ galten als signifikant und wurden dementsprechend mit * bzw. bei signifikantem Unterschied zur Normoxiekontrolle mit # gekennzeichnet (**,##p $< 0,01$ bzw. ***,###p $< 0,001$). Alle Daten wurden mit \pm Standardabweichung (SD) dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Teil A: Primäre Kardiomyozyten

4.1.1 Einfluss moderater Hypothermie auf kardiale Zelltodmechanismen

Die in den folgenden Kapiteln zum nekrotischen (Kapitel 4.1.1.1) und apoptotischen Zelltod (Kapitel 4.1.1.2) dargestellten Daten sind im Rahmen dieses Forschungsprojektes und Vorversuchen entstanden, die in einer Masterarbeit von Franka Brey veröffentlicht werden. Bei den durch Frau Brey gewonnenen Daten handelt es sich im Kapitel 4.1.1.1 um jeweils $n = 1$ für 2 h OGD und 4 h OGD und $n = 6$ für 6 h OGD. Im Kapitel 4.1.1.2 wurden jeweils $n = 1$ für die Versuchszeitpunkte 2 h OGD + 6 h Reperfusion und 4 h OGD + 6 h Reperfusion und $n = 6$ für den Versuchszeitpunkt 6 h OGD + 6 h Reperfusion durch Vorversuche generiert.

4.1.1.1 Nekrotischer Zelltod

Zur Quantifizierung des nekrotischen Zelltodes wurde die Freisetzung des zytosolischen Proteins LDH durch kolorimetrische Messungen bestimmt. Die dargestellten Daten zeigen die LDH-Freisetzung der Versuchsgruppen in den Überstand im Vergleich zur Maximalschädigungskontrolle (100% Zytotoxizität) und der ungeschädigten Kontrollgruppe (0% Zyotoxizität). Während der OGD-Phase steigt mit zunehmender Dauer der simulierten Ischämie die Freisetzung von LDH (Abbildung 4A). In der normothermen Versuchsgruppe ist der Anstieg jeweils im Vergleich zum vorigen Versuchszeitpunkt signifikant. In der hypothermen Versuchsgruppe steigt die im Zellkulturüberstand messbare LDH ebenfalls mit zunehmender Versuchsdauer, ein signifikanter Unterschied zeigt sich jedoch erst zwischen 2 und 6 Stunden OGD. Nach 6 Stunden OGD führt moderate TH zu einer signifikanten Reduktion der LDH-Freisetzung im Vergleich zur normothermen Versuchsgruppe. In der Reperfusionsphase findet sich weder in der gekühlten, noch in der ungekühlten Versuchsgruppe ein Anstieg der LDH-Freisetzung (Daten nicht dargestellt).

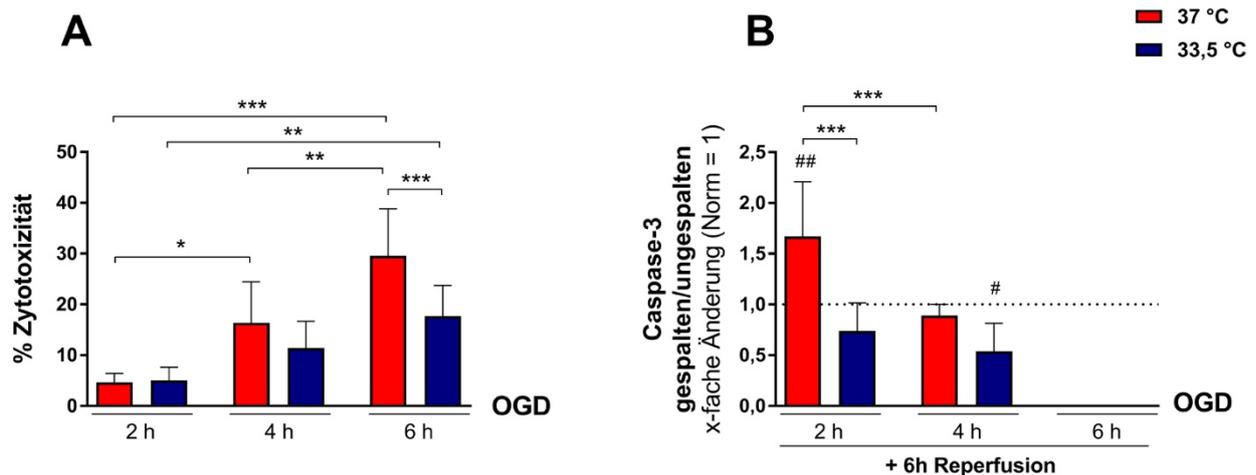


Abbildung 4: Nekrotischer und apoptotischer Zelltod in primären Kardiomyozyten. Die primären Kardiomyozyten wurden einer simulierten Ischämie (Oxygen-glucose-deprivation, OGD) mit 0,2% O₂ und Mangelmedium für 2, 4 und 6 Stunden ausgesetzt, gefolgt von 6 Stunden Reperfusion bei 21% O₂ und Vollmedium. Intraischämische Kühlung 1 Stunde nach Versuchsbeginn. (A) Zytotoxizität primärer Kardiomyozyten, gemessen an der Lactat-Dehydrogenase-Freisetzung, nach 2, 4 und 6 Stunden OGD. Die Daten sind dargestellt als % Zytotoxizität verglichen mit einer Positiv- (100%) und Normoxiekontrolle (0%) zum jeweiligen Versuchszeitpunkt. (B) Western-Blot-Analysen des Verhältnisses von gespaltenen/ungespaltenen Caspase-3 als Marker für apoptotischen Zelltod nach 2, 4, 6 Stunden OGD gefolgt von 6 Stunden Reperfusion. Die Daten zeigen die x-fache Änderung im Vergleich zur Normoxiekontrolle (=1) als Mittelwert ± SD zum jeweiligen Versuchszeitpunkt. Die statistische Analyse wurde durchgeführt mit One-way ANOVA und Tukey Post-Test, *.#p < 0,05, **.,###p < 0,01, ***,###p < 0,001 (#, im Vergleich zur Kontrollgruppe), n = 3-14.

4.1.1.2 Apoptotischer Zelltod

Die Aktivierung der Caspase-3 ist sowohl Bestandteil der extrinsischen als auch der intrinsischen Apoptose und stellt zusammen mit den Caspasen-6 und -7 die gemeinsame Endstrecke beider Signalwege dar. Um die Apoptose in primären Kardiomyozyten ungeachtet der Initiierung durch intrinsische oder extrinsische Stimuli beurteilen zu können, wurde die Proteinexpression der inaktivierten Caspase-3 und ihrer aktiven, gespaltenen Form via Western-Blot analysiert. Das Verhältnis der gespaltenen zur ungespaltenen Caspase-3 der Versuchsgruppen wurde gegen die Kontrollgruppe normalisiert. Die dargestellten Daten (Abbildung 4B) zeigen daher die relative Veränderung der Caspase-Aktivierung im Vergleich zur Kontrollgruppe zu dem jeweiligen Versuchszeitpunkt.

Während sich in der OGD-Phase zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Anstieg der Caspase-3-Aktivierung zeigt (Daten nicht dargestellt), kann nach der 6-stündigen Reperfusion in der normothermen Gruppe mit vorangegangenen 2 Stunden Ischämie ein signifikanter Anstieg der

aktivierten Caspase-3 im Vergleich zur Normoxiekontrolle beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt verringert moderate TH die Menge aktivierter Caspase-3 im Vergleich zur normothermen Gruppe signifikant. Die Menge gespaltener Caspase-3 sinkt in der Reperfusionphase mit zunehmender vorheriger OGD-Dauer. Nach 4 Stunden OGD gefolgt von 6 Stunden Reperfusion ist das Verhältnis der gespaltenen zur ungespaltenen Caspase-3 in der normothermen Gruppe signifikant niedriger als nach 2 Stunden OGD gefolgt von 6 Stunden Reperfusion und moderate TH verringert die Spaltung von Caspase-3 im Vergleich zur Normoxiekontrolle signifikant. In primären Kardiomyozyten mit 6-stündiger OGD Phase ist nach 6 Stunden Reperfusion keine aktivierte Caspase-3 mehr detektierbar.

4.1.2 Einfluss moderater Hypothermie auf oxidativen Stress

Stickstoffmonoxid (NO) wird im Rahmen der Ischämie/Reperfusion (I/R)-Schädigung in Kardiomyozyten über Umwandlung von L-Arginin in L-Citrullin vermehrt durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) produziert [97, 98] und stellt einen Marker für den oxidativen Stress dar. Um den oxidativen Stress in OGD/R-geschädigten primären Kardiomyozyten zu analysieren, wurde die Genexpression der iNOS zu unterschiedlichen Versuchszeitpunkten bestimmt.

Mit zunehmender OGD-Dauer steigt die Genexpression von iNOS (Abbildung 5A) in beiden Versuchsgruppen, was mit den Daten zur LDH-Freisetzung während der OGD-Phase korreliert. Nach 6 Stunden OGD ist die iNOS-Genexpression in sowohl der normothermen als auch der hypothermen Versuchsgruppe im Vergleich zur Normoxiekontrolle signifikant gesteigert. Moderate TH verringert die iNOS-Genexpression im Vergleich zur normothermen Versuchsgruppe nach 4 und 6 Stunden OGD, dieser Trend ist jedoch nicht signifikant.

In der Reperfusionphase sinkt die Genexpression von iNOS nach 12 und 24 Stunden Reperfusion (18 und 30 Stunden nach Versuchsbeginn) deutlich ab und ist, verglichen mit der Normoxiekontrolle, nicht mehr signifikant erhöht (Abbildung 5B). In der normothermen Versuchsgruppe ist die Genexpression nach 12 und 24 Stunden Reperfusion im Vergleich zur Expression nach 6 Stunden OGD signifikant erniedrigt.

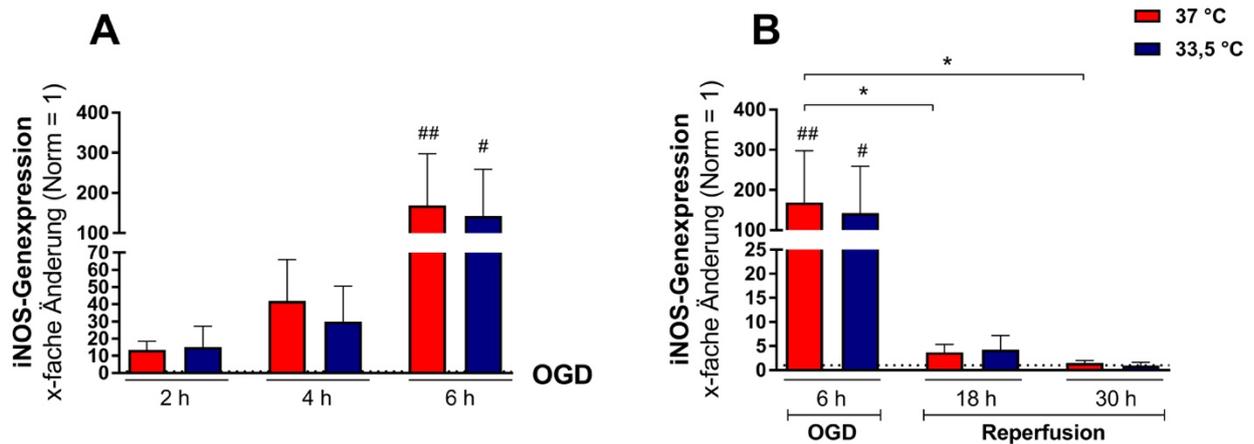


Abbildung 5: Oxidativer Stress in primären Kardiomyozyten. Darstellung der Genexpression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) als Marker für oxidativen Stress, ermittelt via quantitativer RT-PCR, (A) während 2, 4 und 6 Stunden simulierter Ischämie (Oxygen-glucose-deprivation, OGD) mit 0,2% O₂ und Mangelmedium und (B) nach 12 und 24 Stunden Reperfusion bei 21% O₂ und Vollmedium. Intraischämische Kühlung 1 Stunde nach Versuchsbeginn. Die Daten zeigen die x-fache Änderung der Genexpression im Vergleich zur Normoxiekontrolle (=1) als Mittelwert ± SD zum jeweiligen Versuchszeitpunkt. Die statistische Analyse wurde durchgeführt mit One-way ANOVA und Tukey Post-Test, *,#p < 0,05, **,#p < 0,01 (#, im Vergleich zur Kontrollgruppe), n = 3-7.

4.1.3 Einfluss moderater Hypothermie auf die Inflammationsreaktion

4.1.3.1 Moderate Hypothermie und pro-inflammatorische Zytokine

Es wurde untersucht, ob OGD- bzw. OGD/R-geschädigte Kardiomyozyten durch die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine zur Unterhaltung der Inflammationsreaktion beitragen können und inwiefern diese durch die Applikation therapeutischer Hypothermie moduliert werden kann. Hierzu wurde die Genexpression der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-1 β sowohl während 2, 4 und 6 Stunden OGD als auch nach 12 und 24 Stunden Reperfusion analysiert.

Während der OGD-Phase (Abbildung 6) ist die Genexpression von TNF- α (Abbildung 6A) in beiden Versuchsgruppen im Vergleich zur Normoxiekontrolle tendenziell, aber nicht signifikant, supprimiert. Zwischen der normothermen und der mit moderater TH behandelten Versuchsgruppe zeigt sich intraischämisch zu keinem Versuchszeitpunkt ein signifikanter Unterschied der TNF- α -Genexpression, jedoch steigt die Genexpression in der hypothermen Gruppe im Vergleich zur normothermen Gruppe nach 4 und 6 Stunden OGD tendenziell an und erreicht nach 6-stündiger OGD annähernd die Genexpressionsrate der Normoxiekontrolle.

Die Genexpression von IL-6 (Abbildung 6B) in primären Kardiomyozyten entspricht während der OGD-Phase etwa der Normoxiekontrolle. Sie zeigt jedoch während der OGD-Phase zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Regulation, weder im Vergleich zur Normoxiekontrolle, noch zwischen den Versuchsgruppen.

In den primären Kardiomyozyten ist während der OGD-Phase ebenfalls kein signifikanter Unterschied der IL-1 β -Genexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 6C) zu beobachten. Nach 2 Stunden OGD ist die Expression von IL-1 β tendenziell supprimiert, steigt nach 4-stündiger OGD jedoch zunächst auf das Niveau der Normoxiekontrolle an und ist nach 6 Stunden OGD leicht erhöht. Dabei ist kein signifikanter Unterschied zwischen der normothermen und der mit moderater TH behandelten Versuchsgruppe zu ermitteln. In der hypothermen Versuchsgruppe ist der Anstieg der IL-1 β -Genexpression zwischen 2- und 6-stündiger OGD signifikant.

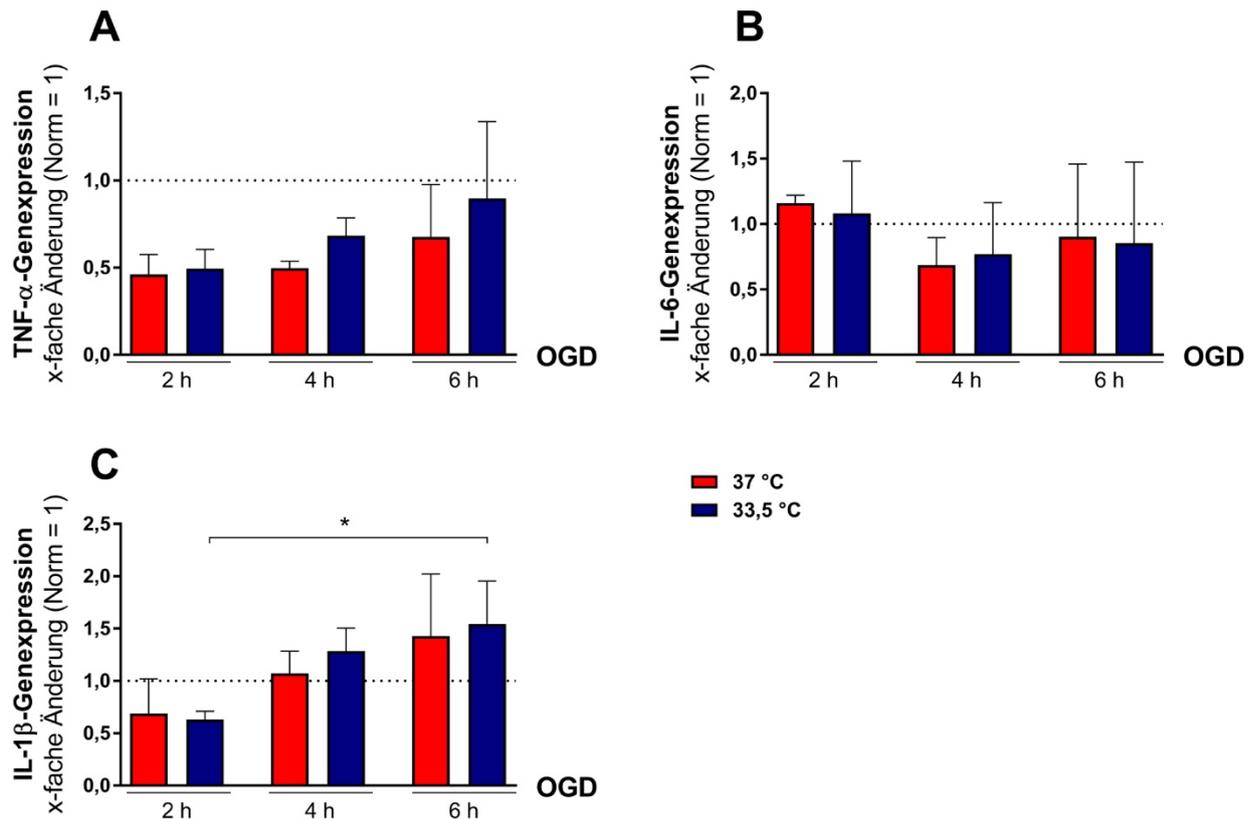


Abbildung 6: Genexpression pro-inflammatorischer Zytokine in primären Kardiomyozyten während der simulierten Ischämie. Darstellung der Genexpression der pro-inflammatorischen Zytokine (A) Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), (B) Interleukin-6 (IL-6) und (C) Interleukin-1 β (IL-1 β) als Marker für die Inflammationsreaktion, ermittelt via quantitativer RT-PCR, während 2, 4 und 6 Stunden simulierter Ischämie (Oxygen-glucose-deprivation, OGD) mit 0,2% O₂ und Mangelmedium. Intraischämische Kühlung 1 Stunde nach Versuchsbeginn. Die Daten zeigen die x-fache Änderung der Genexpression im Vergleich zur Normoxiekontrolle (=1) als Mittelwert \pm SD zum jeweiligen Versuchszeitpunkt. Die statistische Analyse wurde durchgeführt mit One-way ANOVA und Tukey Post-Test, *p < 0,05, n = 3-6.

In der Reperfusionphase (Abbildung 7) ist die Genexpression von TNF- α (Abbildung 7A) in beiden Versuchsgruppen im Vergleich zur Normoxiekontrolle nicht signifikant verändert. Tendenziell zeigt sich in der normothermen Versuchsgruppe nach 12 Stunden Reperfusion (18 Stunden nach Versuchsbeginn) weiterhin eine Suppression der TNF- α -Expression, die nach 24 Stunden Reperfusion (30 Stunden nach Versuchsbeginn) etwa das Niveau der Kontrollgruppe erreicht. Durch moderate TH bleibt die Genexpression von TNF- α in primären Kardiomyozyten zu den untersuchten Versuchszeitpunkten in der Reperfusionphase etwa auf dem Niveau der Normoxiekontrolle. Zu keinem Zeitpunkt unterscheidet sich die TNF- α -Genexpression beider Versuchsgruppen signifikant voneinander.

Nach 12 und 24 Stunden Reperfusion (18 und 30 Stunden nach Versuchsbeginn) steigt die Genexpression des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 (Abbildung 7B) in der normothermen Versuchsgruppe im Vergleich zur OGD-Phase an. Dieser Anstieg ist jedoch nicht signifikant im Vergleich zur Normoxiekontrolle. Durch moderate TH verbleibt die IL-6-Genexpression in der Reperfusion zu den untersuchten Zeitpunkten auf Höhe der Normoxiekontrolle. Zwischen den Versuchsgruppen zeigt sich zu keinem Versuchszeitpunkt ein signifikanter Unterschied der IL-6-Genexpression.

In sowohl der normothermen als auch in der mit moderater TH behandelten Versuchsgruppe sinkt die Genexpression von IL-1 β nach 12- und 24-stündiger Reperfusion (18 und 30 Stunden nach Versuchsbeginn) unter das Niveau der Normoxiekontrolle (Abbildung 7C). Diese Senkung ist in beiden Gruppen nach 24 Stunden Reperfusion deutlicher zu beobachten als nach 12 Stunden Reperfusion. In beiden Versuchsgruppen ist die Reduktion der IL-1 β -Genexpression nach jeweils 12 und nach 24 Stunden Reperfusion im Vergleich zur Genexpression in der jeweiligen Versuchsgruppe nach 6-stündiger OGD signifikant erniedrigt. Zwischen den Versuchsgruppen selbst zeigt sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied der IL-1 β -Genexpression.

Insgesamt ist in den untersuchten Zytokinen zu keinem Versuchszeitpunkt in der OGD- oder Reperusionsphase eine zur Normoxiekontrolle signifikant veränderte Regulation der Genexpression zu vermerken. Moderate TH verändert die Zytokinexpression im Vergleich zur normothermen Versuchsgruppe nicht signifikant.

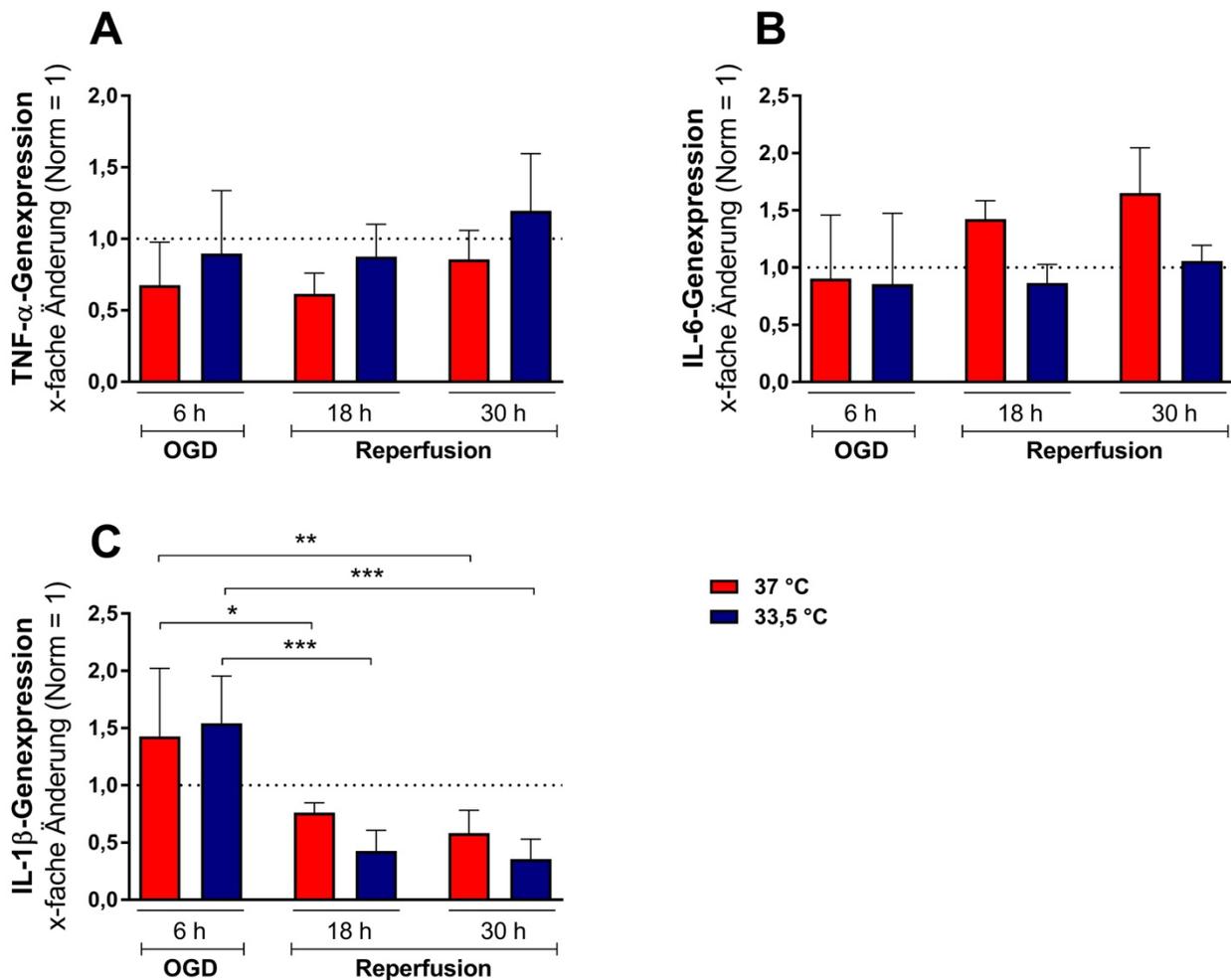


Abbildung 7: Genexpression pro-inflammatorischer Zytokine in primären Kardiomyozyten während der Reperusionsphase. Darstellung der Genexpression der pro-inflammatorischen Zytokine (A) Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), (B) Interleukin-6 (IL-6) und (C) Interleukin-1 β (IL-1 β) als Marker für die Inflammationsreaktion, ermittelt via quantitativer RT-PCR, nach 6 Stunden simulierter Ischämie (Oxygen-glucose-deprivation, OGD) mit 0,2% O₂ und Mangelmedium, gefolgt von 12 und 24 Stunden Reperfusion bei 21% O₂ und Vollmedium. Intraischämische Kühlung 1 Stunde nach Versuchsbeginn. Die Daten zeigen die x-fache Änderung der Genexpression im Vergleich zur Normoxiekontrolle (=1) als Mittelwert \pm SD zum jeweiligen Versuchszeitpunkt. Die statistische Analyse wurde durchgeführt mit One-way ANOVA und Tukey Post-Test, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, n = 4-6.

4.1.3.2 Moderate Hypothermie und die Freisetzung von DAMPs

Zellulärer Stress kann zur Freisetzung von DAMPs führen, die eine Inflammationsreaktion in der Umgebung initiieren. Sie können aktiv von immunkompetenten Zellen sezerniert werden [24] oder im Rahmen des Zelluntergangs passiv in den Extrazellularraum gelangen. Um zu untersuchen, ob Kardiomyozyten durch die Freisetzung von DAMPs an der Inflammationsreaktion beteiligt sind,

wurden HMGB-1, CIRBP und Hsp70 im Zellkulturüberstand geschädigter Kardiomyozyten bestimmt. Die extrazellulären Proteine konnten aufgrund des hohen Albumingehaltes im Vollmedium nur für die normothermen und hypothermen Versuchsgruppen während der OGD-Phase gemessen werden.

Mit zunehmender OGD-Dauer steigt die Freisetzung von HMGB-1 in den Zellkulturüberstand im Vergleich zum vorigen Versuchszeitpunkt (Abbildung 8A). Dieser Anstieg ist in beiden Versuchsgruppen zu beobachten und ist in der normothermen Gruppe zwischen 2 und 6 Stunden OGD signifikant. In der mit moderater TH behandelten Versuchsgruppe zeigt sich eine nicht signifikant verringerte Freisetzung von HMGB-1 nach 4- und 6-stündiger OGD.

Mit zunehmender Schädigungszeit ist extrazellulär auch ein Anstieg von CIRBP messbar (Abbildung 8B), der mit jedem Versuchszeitpunkt im Vergleich zum vorigen tendenziell steigt. Durch moderate TH wird die CIRBP-Freisetzung in den Extrazellularraum nach 4 und 6 Stunden OGD deutlich verringert, dieser Trend ist jedoch nicht signifikant.

Auch Hsp70 ist mit zunehmender OGD-Dauer vermehrt im Zellkulturüberstand nachweisbar (Abbildung 8C). Die Freisetzung steigt hierbei ebenso mit jedem Versuchszeitpunkt im Vergleich zum vorigen. Es zeigt sich eine durch moderate TH nicht signifikant verringerte Freisetzung des Proteins in die Versuchsmedien nach 2, 4 und 6 Stunden OGD. Dieser Trend nimmt mit zunehmender Schädigungsdauer ab.

Insgesamt führt eine zunehmende Schädigungsdauer in beiden Versuchsgruppen zu einer vermehrten Freisetzung der untersuchten DAMPs in den Zellkulturüberstand, was mit der Freisetzung der LDH bei zunehmender OGD-Dauer korreliert. Moderate TH kann die Freisetzung der DAMPs tendenziell verringern.

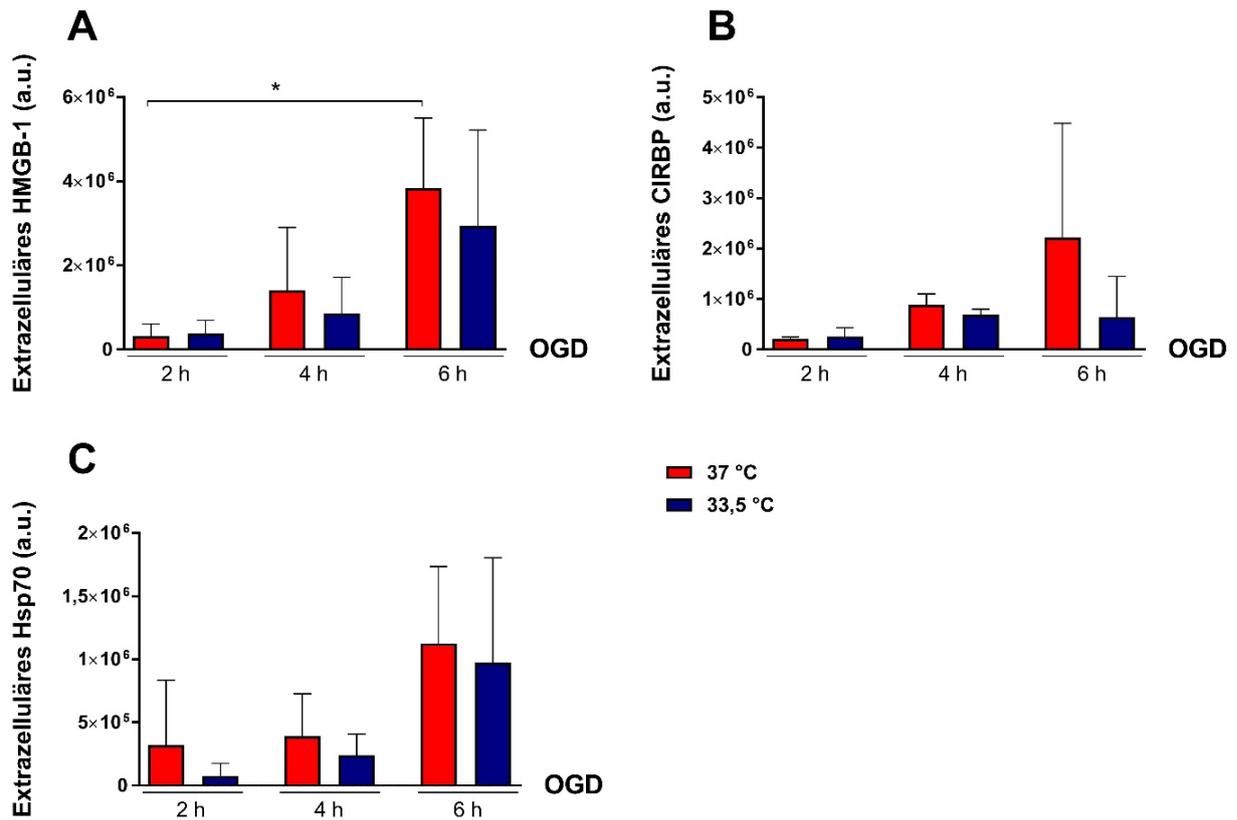


Abbildung 8: Freisetzung der DAMPs durch primäre Kardiomyozyten während der simulierten Ischämie. Die primären Kardiomyozyten wurden einer simulierten Ischämie (Oxygen-glucose-deprivation, OGD) mit 0,2% O₂ und Mangelmedium für 2, 4 und 6 Stunden ausgesetzt, gefolgt von 12 und 24 Stunden Reperfusion. Intraischämische Kühlung 1 Stunde nach Versuchsbeginn. Western-Blot-Analysen der Freisetzung Schädigungs-assoziiierter Moleküle (damage-associated molecular patterns, DAMPs) aus dem Zellkulturüberstand nach 2, 4 und 6 Stunden OGD. Die dargestellten Daten zeigen die absoluten Werte (Arbitrary Unit, a.u.) der densitometrischen Messung für (A) High Mobility Group Box-1 (HMGB-1), (B) Cold-inducible RNA-binding Protein (CIRBP) und (C) Hitzeschockprotein 70 (Hsp70) als Mittelwert ± SD zum jeweiligen Versuchszeitpunkt. Die statistische Analyse wurde durchgeführt mit One-way ANOVA und Tukey Post-Test, *p < 0,05, n = 2-7.

4.1.4 Einfluss moderater Hypothermie auf Kälteschockproteine

Das extrazellulär als DAMP agierende CIRBP gehört mit RBM3 zu den sogenannten Kälteschockproteinen, deren Expression durch Kälte induziert wird und die intrazellulär anti-apoptotisch wirken. In Kapitel 4.1.1.2 konnte bei kurzen OGD-Phasen in der anschließenden Reperfusionphase durch Kühlung eine signifikante Reduktion des apoptotischen Zelltodes anhand der Caspase-3-Aktivierung gezeigt werden. Um zu eruieren, ob moderate TH bei einer 6-stündigen OGD nicht nur den nekrotischen Zelltod verringert, sondern auch eine Regulation der anti-apoptotischen Kälteschockproteine zeigt, wurde die RNA-Expression von CIRBP und RBM3 sowohl intraschämisch als auch zu Zeitpunkten der späten Reperfusion (12 und 24 Stunden Reperfusion bzw. 18 und 30 Stunden nach Versuchsbeginn) via quantitativer RT-PCR analysiert. Die dargestellten Daten zeigen die relative Veränderung der Genexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe des jeweiligen Versuchszeitpunktes.

Die RBM3-Genexpression während der OGD-Phase (Abbildung 9A) sinkt in der normothermen Versuchsgruppe mit zunehmender OGD-Zeit und ist nach 6-stündiger OGD im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt. Die RBM3-Genexpression in der hypothermen Versuchsgruppe ist dabei unverändert zur Normoxiekontrolle. Zwischen beiden Versuchsgruppen zeigt sich in der OGD-Phase zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied.

Die Genexpression von CIRBP verhält sich in der OGD-Phase (Abbildung 9B) ähnlich zu der von RBM3. Mit zunehmender OGD-Dauer sinkt in der normothermen Versuchsgruppe die Genexpressionsrate von CIRBP im Vergleich zum vorigen Versuchszeitpunkt. Nach 6 Stunden OGD ist sie im Vergleich zur Normoxiekontrolle signifikant erniedrigt. Auch hier kann moderate TH die Expression konstant auf Höhe der unbehandelten Kontrollgruppe halten. Nach 6-stündiger OGD ist die CIRBP-Genexpression in der gekühlten Versuchsgruppe im Vergleich zur ungekühlten Versuchsgruppe signifikant erhöht.

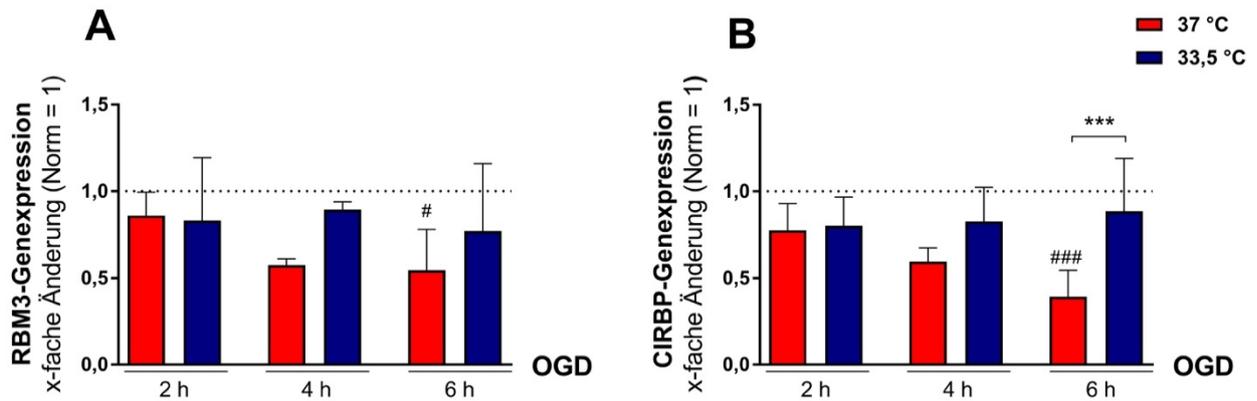


Abbildung 9: Genexpression von Kälteschockproteinen in primären Kardiomyozyten während der simulierten Ischämie. Darstellung der Genexpression der Kälteschockproteine (A) RNA-binding motif Protein 3 (RBM3) und (B) Cold-inducible RNA-binding Protein (CIRBP), ermittelt via quantitativer RT-PCR, während 2, 4 und 6 Stunden simulierter Ischämie (Oxygen-glucose-deprivation, OGD) mit 0,2% O₂ und Mangelmedium. Intraischämische Kühlung 1 Stunde nach Versuchsbeginn. Die Daten zeigen die x-fache Änderung der Genexpression im Vergleich zur Normoxiekontrolle (=1) als Mittelwert ± SD zum jeweiligen Versuchszeitpunkt. Die statistische Analyse wurde durchgeführt mit One-way ANOVA und Tukey Post-Test, *,#p < 0,05, **,###p < 0,01, ***,###p < 0,001 (#, im Vergleich zur Kontrollgruppe), n = 3-6

In der Reperfusionphase (Abbildung 10) steigt die Genexpression von RBM3 (Abbildung 10A) in der gekühlten Gruppe verglichen mit dem vorigen Versuchszeitpunkt jeweils signifikant an. Nach 24-stündiger Reperfusion (30 Stunden nach Versuchsbeginn) ist sie auch im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. In der normothermen Versuchsgruppe steigt die Genexpression in der Reperfusionphase im Vergleich zu 6-stündiger OGD leicht an und ist somit nicht mehr signifikant niedriger als in der Normoxiekontrolle, verbleibt jedoch für die gesamte Dauer der Reperfusion auf Niveau der Kontrollgruppe und wird nicht erhöht. Nach 12-stündiger (18 Stunden nach Versuchsbeginn) und auch 24-stündiger Reperfusion ist die Genexpression von RBM3 in der hypothermen Versuchsgruppe signifikant höher als in der normothermen Versuchsgruppe.

Die Genexpression von CIRBP verhält sich auch in der Reperfusionphase (Abbildung 10B) ähnlich zu RBM3 und nimmt in der gekühlten Versuchsgruppe im Vergleich zum jeweils vorigen Versuchszeitpunkt signifikant zu. Hierbei ist bereits nach 12-stündiger Reperfusion auch ein signifikanter Anstieg im Vergleich zur Normoxiekontrolle zu sehen, der nach 24 Stunden Reperfusion bestehen bleibt. Zu allen während der Reperfusion untersuchten Zeitpunkten ist die CIRBP-Genexpression in der gekühlten Gruppe verglichen mit der ungekühlten Gruppe signifikant erhöht. In der ungekühlten Versuchsgruppe bleibt sie während der Reperfusionphase unterhalb des Expressionsniveaus der Kontrollgruppe.

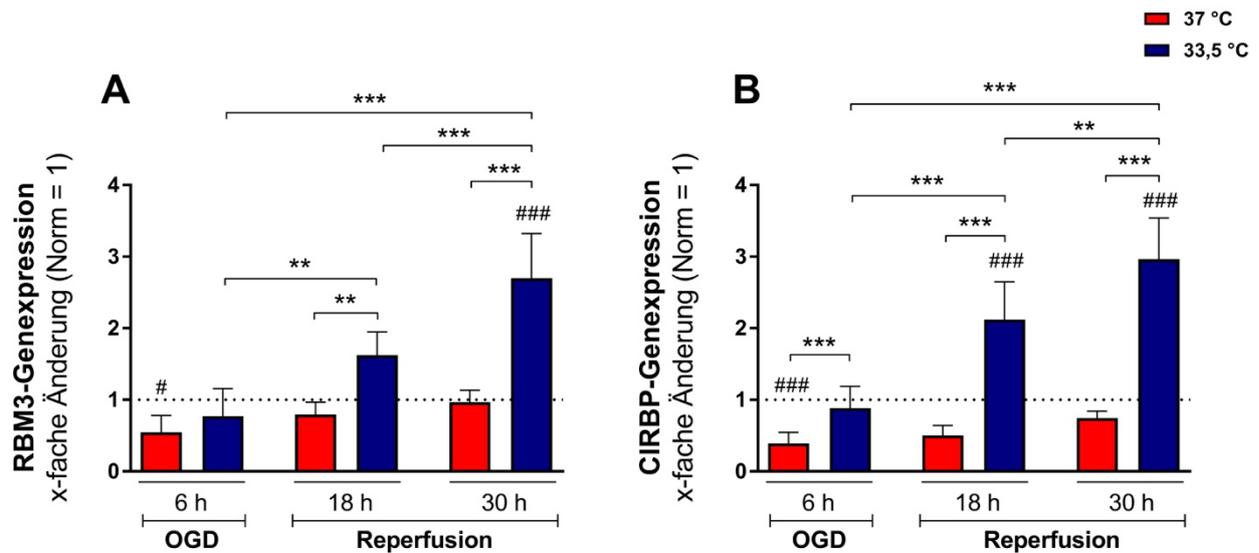


Abbildung 10: Genexpression von Kälteschockproteinen in primären Kardiomyozyten während der Reperfusionsphase. Darstellung der Genexpression der Kälteschockproteine (A) RNA-binding motif Protein 3 (RBM3) und (B) Cold-inducible RNA-binding Protein (CIRBP), ermittelt via quantitativer RT-PCR, nach 6 Stunden simulierter Ischämie (Oxygen-glucose-deprivation, OGD) mit 0,2% O₂ und Mangelmedium, gefolgt von 12 und 24 Stunden Reperfusion bei 21% O₂ und Vollmedium. Intraischämische Kühlung 1 Stunde nach Versuchsbeginn. Die Daten zeigen die x-fache Änderung der Genexpression im Vergleich zur Normoxiekontrolle (=1) als Mittelwert ± SD zum jeweiligen Versuchszeitpunkt. Die statistische Analyse wurde durchgeführt mit One-way ANOVA und Tukey Post-Test, *,#p < 0,05, **,###p < 0,01, ***,###p < 0,001 (#, im Vergleich zur Kontrollgruppe), n = 4-6

4.2 Teil B: RAW 264.7-Makrophagen

Nach Inkubation der Makrophagen mit den Überständen der OGD- bzw. OGD/R-geschädigten Kardiomyozyten wurde die Genexpression unterschiedlicher pro- und anti-inflammatorischer Marker via quantitativer RT-PCR analysiert. Keiner der untersuchten Marker (Tabelle 11) zeigt eine Regulation im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Zur Validierung der eingesetzten Methodik dienten als Positivkontrolle Makrophagen, die mit dem Überstand maximal geschädigter Kardiomyozyten (=100% Zytotoxizität im LDH-Assay) inkubiert wurden. Hier ist die Genexpression des Markers iNOS um das 2,7-fache und die des Monozyten-chemotaktischen Proteins-1 (MCP-1) um das 3,2-fache im Vergleich zur Kontrollgruppe (=1) erhöht (Daten nicht dargestellt).

Tabelle 11: Via quantitativer RT-PCR untersuchte Marker der RAW 264.7-Makrophagen

Untersuchte Marker in RAW 264.7-Makrophagen	
Pro-inflammatorisch	Anti-inflammatorisch
Interleukin-1 α (IL-1 α)	IL-10
IL-1 β	Suppressor of cytokine signaling-3
IL-6	(SOCS-3)
TNF- α	
Allograft Inflammatory Factor-1 (AIF-1)	
Cyclooxygenase-2 (COX-2)	
Induzierbare NO-Synthase (iNOS)	
Monozyten-chemotaktisches Protein-1 (MCP-1)	

Die Zugabe eines DAMP-neutralisierenden Antikörpers zu den mit dem Überstand der Kardiomyozyten inkubierten Makrophagen sollte untersuchen, inwiefern die Neutralisierung bestimmter DAMPs eine Inflammationsreaktion abschwächen kann. Somit sollten Rückschlüsse auf die Wirkung des jeweiligen DAMPs in der Initiierung der Inflammationsreaktion gezogen werden. Da die Zugabe eines CIRBP-neutralisierenden Antikörpers in den durchgeführten Vorversuchen zu einer deutlichen Erhöhung pro-inflammatorischer Marker führte (Daten nicht dargestellt), wurde in einem einzelnen Versuch getestet, ob bereits die alleinige Zugabe des Antikörpers eine Erhöhung der pro-inflammatorischen Marker hervorruft. Die Zugabe des CIRBP-

bindenden Antikörpers in absteigenden Konzentrationen von 8, 4 und 2 $\mu\text{g/ml}$ zu den mit ihrem Vollmedium inkubierten Makrophagen zeigt nach 24 Stunden für iNOS, MCP-1 und Interleukin-1 α (IL-1 α) eine in Abhängigkeit zur Antikörper-Konzentration deutliche Aktivierung der RAW 264.7-Makrophagen (Abbildung 11).

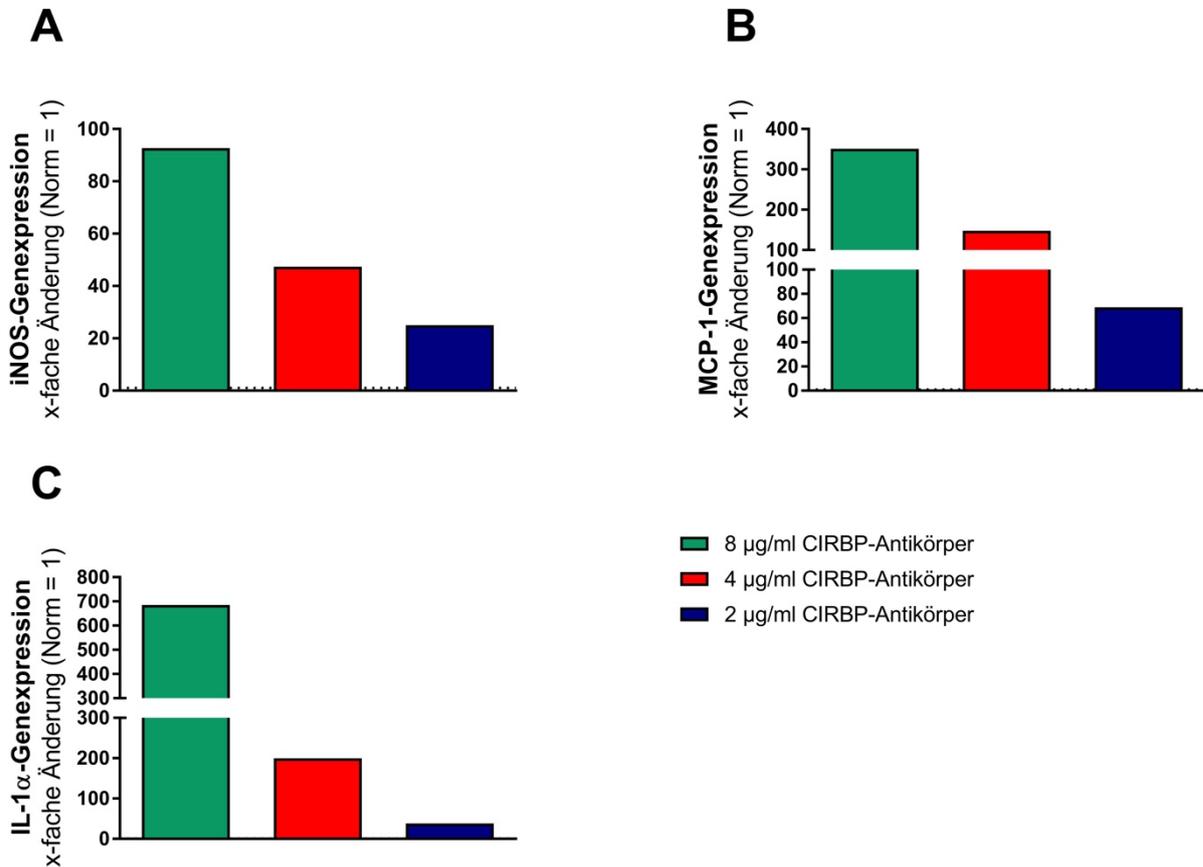


Abbildung 11: Genexpression in RAW 264.7-Makrophagen nach Inkubation mit einem CIRBP-neutralisierenden Antikörper. Darstellung der Genexpression von (A) induzierbarer Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), (B) Monozyten-chemotaktischem Protein-1 (MCP-1) und (C) Interleukin-1 α (IL-1 α), ermittelt via quantitativer RT-PCR, nach 24-stündiger Inkubation mit einem Cold-inducible RNA-binding Protein (CIRBP)-neutralisierenden Antikörper (8, 4 und 2 $\mu\text{g/ml}$) bei 37 $^{\circ}\text{C}$ und 21% O_2 . Die Daten zeigen die x-fache Änderung der Genexpression im Vergleich zur Normoxiekontrolle (=1), n = 1.

5 Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen wie viele *in vitro*- und *in vivo*-Studien den kardioprotektiven Effekt moderater TH durch die Reduktion des während der OGD- und Reperfusionphase jeweils vorherrschenden Zelltodmechanismus. Weiterhin induziert moderate TH die Genexpression der anti-apoptotischen Kälteschockproteine CIRBP und RBM3 während der Reperfusion, was potentiell einen weiteren protektiven Mechanismus der TH darstellt.

Ebenso wurde gezeigt, dass OGD/R-geschädigte primäre Kardiomyozyten nicht durch die Induktion pro-inflammatorischer Zytokine, sondern durch die Freisetzung von DAMPs in der OGD-Phase zur Initiierung einer sterilen Inflammationsreaktion beitragen können. Durch moderate TH wird die Freisetzung der DAMPs in den Zellkulturüberstand tendenziell verringert.

5.1 Therapeutische Hypothermie und kardiale Zelltodmechanismen

Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche zeigen, dass in OGD/R-geschädigten primären Kardiomyozyten während der OGD-Phase der nekrotische Zelltod überwiegt, während der apoptotische Zelltod erst in der Reperfusionphase eintritt. Dies korreliert mit Ergebnissen von Leist et al., die in lymphoiden Jurkat-Zellen belegten, dass der Zelltodmechanismus im Wesentlichen vom intrazellulären ATP-Gehalt abhängt, da entscheidende Schritte der Apoptose energieabhängig sind [99]. Jedoch konnte in diesem Forschungsprojekt auch gezeigt werden, dass der insgesamt vorherrschende Zelltodmechanismus in primären Kardiomyozyten von der Schädigungsintensität abhängt und einem allmählichen Wechsel zwischen beiden untersuchten Mechanismen unterliegt. So überwiegt bei einer kurzzeitigen Schädigung von 2 Stunden der apoptotische Zelluntergang, der jedoch erst mit der Reperfusion einsetzt. Eine stärkere Schädigung im Sinne einer längeren OGD führt zu einem allmählichen Übergang zum vorwiegend nekrotischen Zelltod bereits während der Ischämie. Eine mögliche Erklärung für diesen beobachteten Wechsel liegt ebenfalls im intrazellulären ATP-Gehalt der Kardiomyozyten, der während einer Ischämie abnimmt, und dem Versagen von Kompensationsmechanismen, das wie in Kapitel 1.4.2 beschrieben zum Platzen der Zellen führt. Dies bestätigen Bonfoco et al., die *in vitro* ebenfalls beobachten konnten, dass die Intensität der initialen Schädigung entscheidend für den resultierenden Zelltodmechanismus ist [100]. Während der OGD-Phase ist in primären Kardiomyozyten keine Regulation der aktivierten Caspase-3 zu beobachten, was folglich mit dem

ATP-Defizit während der OGD zu begründen ist. Die geringen Mengen an LDH im Zellkulturüberstand während der Reperfusionphase sind hingegen mit dem zwischen OGD und Reperfusion stattfindenden Mediumwechsel zu erklären (Daten nicht dargestellt). Dies belegt jedoch, dass in der Reperfusionphase keine zusätzliche Freisetzung der LDH in den Zellkulturüberstand, somit auch kein nekrotischer Zelltod, stattfindet.

Moderate TH reduziert sowohl den apoptotischen Zelltod (2 h OGD + 6 h Reperfusion) als auch den nekrotischen Zelltod (6 h OGD) signifikant und erhöht somit die Zellviabilität primärer Kardiomyozyten. Für den durch LDH-Freisetzung quantifizierten nekrotischen Zelltod wurde dies bereits durch Krech et al. bei der Etablierung des Zeit-Temperatur-Protokolls für primäre Kardiomyozyten belegt [92]. Der anti-apoptotische Effekt moderater TH durch reduzierte Caspase-3-Aktivierung konnte bisher vor allem in Neuronen nachgewiesen werden [76-78] und bestätigt sich hier auch in primären Kardiomyozyten. Da die aktivierte Caspase-3 Teil der gemeinsamen Endstrecke intrinsischer und extrinsischer Apoptose ist [44], lassen sich in dieser Arbeit keine Rückschlüsse auf den ursprünglichen Stimulus dieser Apoptose ziehen.

5.2 Ischämie/Reperfusions-bedingter oxidativer Stress

NO wirkt unter normoxischen Bedingungen antioxidativ und anti-inflammatorisch [101], kann unter hypoxischen Bedingungen jedoch durch Interaktion mit Hyperoxid-Anionen reaktive Stickstoffspezies generieren und zählt damit zu den freien Radikalen [97, 102]. Es wird durch NO-Synthasen (NOS) produziert, wobei sich insgesamt drei Subformen unterscheiden lassen. Die neuronale NOS (nNOS) und endotheliale NOS (eNOS) generieren NO in geringen Mengen (< 100 nM) konstitutiv. Im Gegensatz dazu wird die induzierbare NOS (iNOS) nur durch Stimuli wie LPS, pro-inflammatorische Zytokine oder Hypoxie hochreguliert und bewirkt eine beachtliche Steigerung der NO-Produktion (> 1 μ M) in Endothelzellen, Monozyten, Mastzellen, Makrophagen und glatten Muskelzellen [98]. In Kardiomyozyten wird die eNOS konstitutiv und die iNOS nach Stimulation exprimiert [102], letztere wurde in der vorliegenden Arbeit als Marker für oxidativen Stress analysiert.

In primären Kardiomyozyten steigt die iNOS-Genexpression während der OGD-Phase und ist nach 6-stündiger OGD in sowohl der normothermen als auch der hypothermen Versuchsgruppe signifikant erhöht. Hier zeigt sich ein statistisch nicht signifikanter Trend, dass moderate TH die Expression von iNOS verringert. Der intraischämische Anstieg korreliert dabei mit den Daten zum

nekrotischen Zelltod. In einem vorigen Projekt der Arbeitsgruppe zur Untersuchung der Post-Hypothermie-Pyrexie konnten Tong et al. nach 6 Stunden OGD in HL-1-Kardiomyozyten ebenfalls eine zur Normoxiekontrolle signifikante Steigerung der iNOS-Genexpression in beiden Versuchsgruppen beobachten [103]. Anders als in primären Kardiomyozyten war die Expression in hypothermen HL-1-Kardiomyozyten zu dem Versuchszeitpunkt jedoch tendenziell höher als in normothermen. Eine signifikante Reduktion der iNOS-Genexpression durch moderate TH zeigte sich dort erst in der späten Reperfusionsphase nach Erwärmung beider Versuchsgruppen auf 40 °C (31 und 41 Stunden nach Versuchsbeginn), war nach längerer Pyrexie (53 Stunden nach Versuchsbeginn) jedoch wieder aufgehoben [103]. Entgegen der in der Arbeitsgruppe beobachteten Ergebnisse in primären Kardiomyozyten und HL-1-Kardiomyozyten konnten Han et al. sowohl im Rattenmodell nach zerebralarterieller Okklusion als auch in einer mit LPS aktivierten Mikroglia-Kultur durch moderate TH (33 °C) eine Reduktion von NO und der iNOS-Proteinexpression nach der akuten Ischämiephase erzielen [104].

Obwohl moderate TH die iNOS-Genexpression in primären Kardiomyozyten während der OGD nicht signifikant reduziert, spricht dies nicht grundsätzlich gegen den protektiven Effekt der Hypothermie. Die Bedeutung von iNOS im Rahmen des I/R-Schadens ist in der Literatur umstritten [98]. Einerseits konnten Feng et al. im Tiermodell nachweisen, dass Mortalität und kardiale Dysfunktion nach einem durch Ligatur der linken Koronararterie induzierten AMI in Mäusen mit einem iNOS-Wildtyp im Gegensatz zu iNOS^{-/-}-mutierten Mäusen signifikant ansteigen und iNOS in der Pathogenese des myokardialen Schadens somit eine bedeutende Rolle spielt [105]. Andererseits belegen Takano et al., dass die iNOS ein entscheidender Mediator für die späte ischämische Präkonditionierung, einer durch kurze ischämische Reize ausgelösten Protektion des Myokards vor längerer Ischämie, nach einem Myokardinfarkt im Kaninchenmodell ist [106]. Ein zugrundeliegender Mechanismus dieser Kardioprotektion stellt die Reduktion OGD/R-induzierter ROS und die Inhibition der mPTP-Öffnung dar [107]. Weiterhin beobachteten Zhao et al. in Mäusen einen Zusammenhang zwischen mäßiger Erhöhung der iNOS-Expression und der Aktivierung kardiomyozytärer Adenosin-A₁-Rezeptoren, die ebenso eine entscheidende Rolle in der verzögerten Kardioprotektion bei Schädigung durch Ischämie spielen [108], was durch Versuche von Lasley et al. jedoch nicht bestätigt werden konnte [109]. Letztlich scheint vor allem das Verhältnis zwischen NO und reaktiven Stickstoffverbindungen, die bei der NO-Degradation entstehen, entscheidend für den resultierenden protektiven oder schädlichen Effekt der iNOS zu sein [98].

In dieser Arbeit kann während der Reperfusionphase weder eine signifikante Steigerung der iNOS-Genexpression noch eine Regulation zwischen den Versuchsgruppen beobachtet werden. Die Produktion von NO und Superoxiden gipfelt interessanterweise bereits in der frühen Reperfusion unmittelbar nach Wiederherstellung des Sauerstoff- und Nährstoffangebots [110, 111]. Die in diesem Zeit-Temperatur-Protokoll analysierten Versuchszeitpunkte 12 und 24 Stunden nach Reperfusionbeginn sind daher nicht geeignet, um eine adäquate Aussage über die oxidative Stressbelastung primärer Kardiomyozyten und eine mögliche Beeinflussung durch moderate TH in der frühen Reperfusion zu treffen.

5.3 Kälteschockproteine in primären Kardiomyozyten

Wie bereits in Kapitel 1.5.2.5 betont wurde, wirken die untersuchten Kälteschockproteine CIRBP und RBM3 intrazellulär aufgrund ihrer anti-apoptischen Effekte zytoprotektiv. In der Literatur wurden beide Proteine bisher vorwiegend in neuronalen Zellen beschrieben [33], konnten in dieser Arbeit aber auch in primären Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Es zeigt sich auf mRNA-Ebene keine signifikante Hochregulation von CIRBP und RBM3 während der OGD-Phase, jedoch hält moderate TH das Expressionsniveau von CIRBP und RBM3 etwa im Bereich der Normoxiekontrolle, während die Expression in der normothermen Versuchsgruppe intranschämisch stetig abnimmt. Da neben der Hypothermie auch hypoxischer Stress als Initiator der CIRBP- und RBM3-Expression beschrieben wurde [112], wäre eine intranschämische Hochregulation in beiden Versuchsgruppen, etwas stärker aber in der hypothermen Versuchsgruppe, denkbar. Die Ergebnisse dieser Arbeit korrelieren mit Resultaten eines vorigen Projektes unserer Arbeitsgruppe, in der Rosenthal et al. beobachteten, dass die RBM3-Expression in humanen SK-N-SH-Neuroblastomzellen sowohl auf transkriptioneller als auch translationaler Ebene durch Hypothermie, allerdings nicht durch Hypoxie induziert wird [113]. Zudem zeigten Liu et al. in einem Rattenmodell, dass auch die kortikale CIRBP-Expression durch zerebrale Ischämie trotz gleichzeitiger Hypothermie verzögert wird [114]. Eine signifikante Hochregulation der CIRBP- und RBM3-Expression zeigt sich in den primären Kardiomyozyten erst in der Reperfusionphase. Hierbei ist die CIRBP-Genexpression schon nach 12-stündiger Reperfusion im Vergleich zur Normoxiekontrolle signifikant erhöht, RBM3 jedoch erst nach 24 Stunden Reperfusion. Dies deutet auf eine schnellere Dynamik der CIRBP-Genexpression nach Initiierung der moderaten TH hin und korreliert ebenfalls mit vorigen Ergebnissen unserer

Arbeitsgruppe [81]. Die Aufrechterhaltung der RBM3- und CIRBP-Genexpression während der OGD-Phase und ihre Hochregulation in der Reperfusionphase stellt demnach auch in primären Kardiomyozyten einen potentiellen Schlüsselmechanismus in der Zytoprotektion durch moderate TH dar. Dabei deutet die signifikante Steigerung selbst 24 Stunden nach Eintritt der Reperfusion auf einen nachhaltig protektiven Effekt hin.

Auch in der Klinik nimmt die Bedeutung der Kälteschockproteine zu. So konnten Rosenthal et al. RBM3 in einer ersten prospektiven, monozentrischen Studie auch in menschlichem Serum nachweisen [115]. Hierfür wurde RBM3 in 13 Patienten mit angeborenem Herzfehler jeweils vor und nach einem herzchirurgischen Eingriff mit CPB und moderater TH analysiert. Zur Kontrolle wurden RBM3-Werte im Serum gesunder Probanden bestimmt, die sich nicht signifikant von den Werten der Patienten vor Behandlungsbeginn unterschieden. Postoperativ zeigten sich signifikant erhöhte RBM3-Level im Vergleich zu den präoperativen Werten. Ebenso wurde postoperativ eine komplexe Immunreaktion beobachtet, die sich in einer Erhöhung von MCP-1, interzellulärem Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1), diverser Interleukine (-1 β , -6, -8, -16, -18) und CC-Chemokin-Liganden-3 und -4 zeigte und vermutlich auf den Gebrauch der Herz-Lungen-Maschine zurückzuführen ist. Drei weitere Patienten wurden unter normothermen Bedingungen operiert. Aufgrund der geringen Patientenzahl in der normothermen Gruppe konnten jedoch keine Schlussfolgerungen bezüglich einer Aggravation der komplexen Immunreaktion ohne moderate TH oder einer im Vergleich zur gekühlten Patientengruppe postoperativ signifikanten Reduktion von RBM3 im Serum gezogen werden [115]. Allerdings belegt diese Studie, dass RBM3, welches in den gekühlten Patienten postoperativ signifikant erhöht war, in der Klinik einen potentiellen Marker für Kühlung darstellt.

5.4 Primäre Kardiomyozyten und die sterile Inflammationsreaktion

5.4.1 Zytokinproduktion in primären Kardiomyozyten

Eine Schädigung des Myokards durch Ischämie und anschließende Reperfusion führt über die Produktion von ROS, Freisetzung intrazellulärer Bestandteile und Expression von Adhäsionsmolekülen zur Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen zum Infarktareal. Diese initiieren über die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine eine Inflammationsreaktion [21].

In dieser Arbeit wurde die Genexpression von TNF- α , IL-6 und IL-1 β via quantitativer RT-PCR untersucht, um zu beurteilen, ob primäre Kardiomyozyten durch Hochregulation pro-inflammatorischer Zytokine neben immunkompetenten Zellen ebenso zur Initiierung und Aufrechterhaltung der sterilen Inflammationsreaktion beitragen. Weder in der OGD-Phase noch in der Reperfusion ist in den analysierten Zytokinen eine zur Normoxiekontrolle signifikant veränderte Genexpression zu vermerken. Ebenso zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen.

Lediglich die Genexpression von IL-1 β steigt während der OGD-Phase in der hypothermen Gruppe zwischen 2 und 6 Stunden OGD signifikant und ist im Vergleich zur normothermen Gruppe tendenziell erhöht. In beiden Versuchsgruppen ist die IL-1 β -Genexpression in der Reperusionsphase im Vergleich zur Expression bei 6-stündiger OGD signifikant vermindert. Dies korreliert mit Ergebnissen von Hwang et al., die in ihrem Infarktmodell der Maus nach Ligatur der linken anterioren Koronararterie einen raschen Anstieg der IL-1 β -Genexpression beschrieben. Diese zeigte ebenfalls ein Maximum 6 Stunden nach Versuchsbeginn mit einem darauffolgenden raschen Abfall [116]. Da die beschriebene Studie jedoch primär zur Analyse der Progression des linksventrikulären Remodelings diente, erfolgte keine Reperfusion des ischämischen Gewebes und der Abfall der IL-1 β -Genexpression erfolgte in der Ischämiephase.

Obwohl IL-1 β als pro-inflammatorisches Zytokin gilt, ist die Erhöhung seiner Genexpression durch moderate TH während der OGD-Phase jedoch nicht prinzipiell als schädlich zu beurteilen. So beschrieben Hwang et al. ebenfalls potentielle protektive Effekte durch die Hochregulation von IL-1 β in der Akutphase eines AMIs. In ihrer Studie führte die Applikation eines IL-1 β -neutralisierenden Antikörpers direkt nach Ischämiebeginn zu einer höheren Inzidenz von Ventrikelrupturen und einer reduzierten Kollagenakkumulation im Infarktareal. Ebenso waren vier und acht Wochen nach Versuchsbeginn eine signifikante Erhöhung des Gesamtherzgewichts und des linksventrikulären enddiastolischen Diameters mit der Antikörpertherapie assoziiert [116]. Da die in dieser Arbeit beobachtete Dynamik der IL-1 β -Genexpression sich jedoch nur innerhalb der Versuchsgruppen ändert und kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen oder zu der Normoxiekontrolle besteht, sind primäre Kardiomyozyten nicht durch die Produktion von IL-1 β an der Inflammationsreaktion beteiligt.

Die IL-6-Genexpression steigt in der normothermen Versuchsgruppe nach 12 und 24 Stunden Reperfusion (18 und 30 Stunden nach Versuchsbeginn) im Vergleich zur Normoxiekontrolle und der hypothermen Versuchsgruppe tendenziell, jedoch nicht signifikant. Die Genexpression des

Zytokins TNF- α zeigt weder in der OGD- noch in der Reperfusionphase eine Regulation. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen beobachteten Shi et al. *in vivo* nach einstündiger koronararterieller Okklusion gefolgt von 48-stündiger Reperfusion in Ratten eine im Vergleich zur schein-exponierten Gruppe erhöhte Genexpression von unter anderem TNF- α und IL-6 im Infarktareal. Die Körpertemperatur der Ratten sowohl der schein-exponierten Gruppe als auch der normothermen Versuchsgruppe wurde auf 37 °C gehalten, während die Körpertemperatur der hypothermen Versuchsgruppe 2 Minuten nach Experimentbeginn via Oberflächenkühlung auf 32 °C gesenkt wurde. Kühlung konnte die Inflamationsreaktion durch signifikante Reduktion der Genexpression von unter anderem TNF- α und IL-6 im Infarktareal mildern und die myokardiale Funktion, gemessen an der linksventrikulären Verkürzungsfraktion, im Vergleich zur normothermen Gruppe erhöhen [91]. Ähnliche Ergebnisse erzielten Vazquez-Jimenez et al. *in vivo* in Schweinen, die einem kardiochirurgischen Eingriff mit CPB unterzogen wurden. Eine TH von 28 °C führte neben einer verminderten Nekrose zu einer Reduktion von TNF- α und einer Hochregulation des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 [90]. In beiden Studien wurde die Inflamationsreaktion im gesamten Herzen eruiert. Jedoch machen Kardiomyozyten nur etwa 30-35% der gesamten Zellen des Herzens aus, während die restlichen 65-70% aus Endothelzellen, Fibroblasten, Perizyten, glatten Muskelzellen und Makrophagen bestehen [117]. Es lässt sich anhand dieser Daten daher nicht schlussfolgern, dass die Induktion der gemessenen pro-inflammatorischen Zytokine in den beschriebenen Studien durch die Kardiomyozyten selbst geschieht. So beobachteten Shames et al. im Myokard von Ratten ebenfalls eine Hochregulation der TNF- α -Genexpression durch Ischämie, die intranukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B, der die Produktion von Zytokinen induziert, fand jedoch primär in myokardialen interstitiellen Zellen statt. Daraus leiteten sie ab, dass myokardiales TNF- α hauptsächlich von nicht-kardiomyozytären Zellen generiert wird [118]. Dies korreliert daher mit dem Ergebnis dieser Arbeit, dass primäre Kardiomyozyten nicht durch Induktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α an der Initiierung und Aufrechterhaltung der sterilen Inflamationsreaktion beteiligt sind. Folglich ist in primären Kardiomyozyten auch keine Milderung der Inflamationsantwort durch moderate TH im Sinne einer Reduktion von Zytokinen zu erwarten. Die nach einer myokardialen Ischämie beobachtete Zytokinproduktion geht daher von nicht-kardiomyozytären Zellen des Herzens aus.

Die in Tierexperimenten beobachtete Reduktion der Zytokinproduktion nach myokardialer OGD/R-Schädigung ließ sich im Menschen bisher nicht bestätigen. In einer multizentrischen, prospektiven Studie, dem sogenannten „TTM-Trial“, verglichen Nielsen et al. in Patienten nach

einem HKS den Effekt von Kühlung auf 33 °C mit einer kontrollierten Normothermie von 36 °C. Eine Subanalyse dieser Studie zeigte zwar eine Korrelation des IL-6-Plasmalevels mit dem Ausprägungsgrad des „Post-Cardiac Arrest“-Syndroms, jedoch konnte moderate TH IL-6 im Plasma im Vergleich zur Normothermie nicht verringern und die Inflammationsreaktion somit nicht abschwächen [119, 120]. Eine Ursache für diese Beobachtung könnte in der kontrollierten Normothermie von 36 °C liegen, die sich definitionsgemäß nur um 0,1 °C vom Temperaturbereich der milden Hypothermie unterscheidet ($\leq 35,9$ °C) [47] und um 1 °C von der normalen Körperkerntemperatur von 37 °C abweicht [121]. Um eine Reduktion der inflammatorischen Antwort durch moderate TH im Menschen zu beurteilen, sind somit weitere Studien notwendig, deren normothermen Gruppen eine Körperkerntemperatur von etwa 37 °C aufweisen.

5.4.2 Freisetzung von DAMPs durch primäre Kardiomyozyten

Im Rahmen des Zelluntergangs während eines AMI kommt es zur Freisetzung intrazellulärer Zellbestandteile in den Extrazellularraum, die dort als DAMPs eine begleitende Inflammationsreaktion über die Aktivierung von unter anderem TLR auslösen [122]. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Proteinen HMGB-1, CIRBP und Hsp70, deren Rolle als DAMPs bereits in Kapitel 1.3 erläutert wurde, kann eine mit zunehmender OGD-Dauer ansteigende Freisetzung in den Zellkulturüberstand beobachtet werden. Das mit CIRBP eng verwandte RBM3 wurde ebenfalls analysiert, konnte jedoch nicht im Extrazellularraum nachgewiesen werden und ist auch in der Literatur bisher nicht als DAMP identifiziert worden [33]. Die während der OGD-Phase zunehmende Freisetzung der untersuchten DAMPs korreliert mit den gewonnenen Ergebnissen zum nekrotischen Zelltod, der in Abhängigkeit der OGD-Dauer ebenfalls zunimmt. Auch in der Literatur ist die Freisetzung von DAMPs mit dem nekrotischen Zelltod assoziiert [122-124]. Obwohl primäre Kardiomyozyten keine immunkompetenten Zellen sind, zeigen diese Daten, dass sie durch Freisetzung von DAMPs im Rahmen einer Schädigung durch OGD potentiell zur Stimulation und Aufrechterhaltung einer Inflammation beitragen können.

Neben der Initiierung einer Inflammationsreaktion hat die Freisetzung von DAMPs auch unterschiedliche klinische Konsequenzen. So konnten Cirillo et al. in Patienten nach einem AMI im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant erhöhte HMGB-1-Plasmaspiegel nachweisen, die mit schlechteren echokardiographischen und kardiopulmonalen Parametern assoziiert

waren [125]. Auch eine Assoziation mit einem verschlechterten neurologischen Outcome in Patienten mit einem „Post-Cardiac Arrest“-Syndrom nach präklinischem HKS wurde beschrieben [126]. Dagegen korreliert die Freisetzung von CIRBP mit dem Schweregrad einer Sepsis [37, 127]. Hsp70, dessen intrazelluläre Proteinexpression in einem vorigen Projekt der Arbeitsgruppe durch moderate TH in HL-1-Kardiomyozyten induziert wurde [28], fördert *in vitro* extrazellulär nicht nur die Inflamationsreaktion, sondern beeinträchtigt auch die Kontraktilität von HL-1-Kardiomyozyten [31]. Dybdahl et al. konnten in Patienten mit einem AMI im Gegensatz zu Patienten mit einer Angina Pectoris erhöhtes Hsp70 im Plasma nachweisen. Der Höchstwert korrelierte dabei zeitlich mit dem der Kreatinkinase und des kardialen Troponin T, weshalb es einen potentiellen Marker für myokardialen Schaden darstellt. Insgesamt wurde Hsp70 jedoch schneller aus dem Kreislauf eliminiert [128].

Die unterschiedlichen Studien unterstreichen die klinische Relevanz der DAMPs neben ihrer Funktion als Initiatoren der Inflamationsreaktion bei einem AMI. Moderate TH stellt hierbei eine potentielle therapeutische Interventionsmöglichkeit dar, um die Freisetzung der DAMPs und somit ihre multimodalen negativen Effekte zu reduzieren. *In vivo* konnte in einem Schlaganfallmodell bereits eine Reduktion von HMGB-1 im Serum durch moderate TH erreicht werden, die ebenfalls mit einer verminderten Produktion pro-inflammatorischer Zytokine einherging [129]. Im Gegensatz dazu verringert moderate TH die in dieser Arbeit analysierten DAMPs im Zellkulturüberstand OGD-geschädigter primärer Kardiomyozyten nur tendenziell. Zur weiteren Reduktion der vielseitigen potentiellen Schädigungen durch DAMPs wäre eine Ergänzung der TH durch DAMP-neutralisierende Antikörper [127] oder Filter denkbar. Vielversprechende Ergebnisse erzielten bereits Godwin et al., die nach hepatischer I/R-Schädigung in Mäusen durch die Applikation eines CIRBP-neutralisierenden Antikörpers eine signifikante Erhöhung der Überlebensrate (75%) im Vergleich zur Kontrollgruppe (37,5%), eine Reduktion von IL-6, eine verbesserte hepatische Mikroarchitektur und die Reduktion hepatischer Schädigungsmarker erreichen konnten [130].

In der vorliegenden Arbeit konnte die Freisetzung der DAMPs nur während der OGD-Phase untersucht werden, weshalb sich keine definitive Aussage über ihre Freisetzung in der Reperfusionphase treffen lässt. Da DAMPs in der Literatur jedoch vorrangig mit dem nekrotischen Zelltod assoziiert werden [22, 122-124], wäre eine im Vergleich zur OGD-Phase verringerte Freisetzung der DAMPs während der Reperfusion vorstellbar.

5.5 Vorversuche mit RAW 264.7-Makrophagen

Im zweiten Teil dieses Projektes wurden RAW 264.7-Makrophagen mit dem Zellkulturüberstand OGD/R-geschädigter primärer Kardiomyozyten inkubiert, um eine etwaige resultierende Aktivierung der Makrophagen im Sinne einer erhöhten Genexpression inflammatorischer Marker zu analysieren. In Anlehnung an die von Godwin et al. beschriebenen positiven Effekte durch die Applikation eines CIRBP-neutralisierenden Antikörpers nach hepatischer I/R-Schädigung [130] wurde in einem Versuch ebenfalls die Zugabe eines CIRBP-neutralisierenden Antikörpers getestet. Die Inkubation der RAW 264.7-Makrophagen mit dem Zellkulturüberstand OGD/R-geschädigter primärer Kardiomyozyten zeigt für keine der Versuchsgruppen eine Regulation pro- oder anti-inflammatorischer Marker. Ursächlich dafür könnte einerseits eine zu geringe Konzentration der DAMPs sein, da die Zellkulturüberstände der primären Kardiomyozyten 1:2 mit dem Vollmedium der RAW 264.7-Makrophagen verdünnt wurden. Dafür spricht, dass die Inkubation mit dem Überstand maximal geschädigter primärer Kardiomyozyten die Genexpression der Marker iNOS und MCP-1 in den Makrophagen induziert.

Andererseits wurde die Genexpression erst nach 24-stündiger Inkubation mit dem 1:2 verdünnten Zellkulturüberstand primärer Kardiomyozyten und anschließender 6-stündiger Inkubation mit dem Vollmedium der Makrophagen analysiert. Hobbs et al. untersuchten in LPS-stimulierten RAW 264.7-Makrophagen die Dynamik der Expression des Transkriptionsfaktors NF- κ B und der Zytokine TNF- α und IL-10 in einem Zeitraum von 15 Minuten bis 72 Stunden. Hierbei war der nukleare Proteingehalt von NF- κ B 30 Minuten nach LPS-Stimulation erhöht, erreichte sein Maximum nach bereits 45 Minuten und war nach 24 Stunden wieder auf das basale Niveau gesunken. Die Genexpression von TNF- α stieg bereits 1 Stunde nach LPS-Stimulation, kulminierte nach 6 Stunden und sank bereits nach 10 Stunden wieder ab. Die Genexpression des anti-inflammatorischen IL-10 wurde nach 10 Stunden induziert und gipfelte nach 16 Stunden [131]. Da NF- κ B die Transkription von IL-1 β , IL-6 und TNF- α augmentiert und sein Proteingehalt im Nucleus bereits nach 45 Minuten maximal ist, ist der in dieser Arbeit gewählte Zeitpunkt zur Untersuchung der Genexpression 30 Stunden nach Versuchsbeginn daher zu spät gewählt. Ebenso lässt die Analyse der Genexpression zu einem Versuchszeitpunkt keine Rückschlüsse auf die Dynamik der untersuchten Marker zu.

Bei dem in diesem Projekt verwendeten CIRBP-neutralisierenden Antikörper handelte es sich um einen kommerziell erwerbbaaren Antikörper der Firma Proteintech. Im Gegensatz zu den von

Godwin et al. erzielten Ergebnissen, führt die Inkubation der RAW 264.7-Makrophagen mit dem CIRBP-neutralisierenden Antikörper zu einer konzentrationsabhängigen Aktivierung der Makrophagen, gemessen an der Genexpression von iNOS, IL-1 α und MCP-1. Ursächlich dafür könnten das für die Lagerung des Antikörpers zugefügte Glycerol oder Natriumazid sein. Godwin et al. verwendeten für ihre Versuche einen polyklonalen CIRBP-bindenden Antikörper, der aus Antiseren gegen purifiziertes rekombinantes CIRBP aus Hasen generiert wurde. Die Isolierung der IgG-Fraktion aus den Antiseren wurde durch immobilisierte Immunopure Protein-A- und -G-Chromatographie durchgeführt [130].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für die Untersuchung einer durch den Zellkulturüberstand OGD/R-geschädigter primärer Kardiomyozyten induzierten Inflammationsreaktion in RAW 264.7-Makrophagen weitere Versuche in einem folgenden Projekt nötig sind. Dabei sollte sowohl die Verdünnung der Zellkulturmedien optimiert werden, als auch das Versuchsprotokoll für die RAW 264.7-Makrophagen um weitere Zeitpunkte ergänzt und ein für die Zellkultur geeigneter DAMP-neutralisierender Antikörper verwendet werden.

5.6 Limitationen

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die Versuche mit primären Kardiomyozyten durchgeführt. Da es sich hierbei um finite Zellen handelt, die im Gegensatz zu einer Tumorzelllinie keine bzw. nur eine eingeschränkte Vermehrungsfähigkeit besitzen, wurden für jeden Versuch erneut primäre Kardiomyozyten aus 1-3 Tage alten Mäusen isoliert. Dadurch war die Wahrscheinlichkeit metabolisch wirksamer Mutationen im Vergleich zu Tumorzelllinien zwar geringer, jedoch unterlagen die primären Kardiomyozyten mit jedem Versuch interindividuellen Schwankungen der präparierten Mäuse, die in der Auswertung der Ergebnisse nicht berücksichtigt werden konnten. Darunter zählten Faktoren wie beispielsweise der durch den Transport bedingte Stress der Mäuse, geschlechtsspezifische Unterschiede und die jeweilige Altersverteilung der Mäuse bei der Präparation. Ebenso ist nicht auszuschließen, dass es sich bei den untersuchten Zellen um keine reine Kultur primärer Kardiomyozyten handelt. So ist nach Herstellerangaben des genutzten Kits nach Zugabe des Wachstumszusatzes und entsprechender Kultivierung von einer Reinheit zwischen 80-90% auszugehen. Die Reinheit der primären Kardiomyozyten-Kultur wurde in

Vorversuchen der Arbeitsgruppe bestimmt und bestätigt, in diesem Projekt jedoch nicht für jeden einzelnen Versuch wiederholt.

Es konnte nicht abschließend beurteilt werden, ob moderate TH den oxidativen Stress in OGD/R-geschädigten primären Kardiomyozyten mindert. Zwar zeigt sich nach 6-stündiger OGD eine zur Normoxiekontrolle signifikante Erhöhung der iNOS-Genexpression ohne signifikanten Unterschied der beiden Versuchsgruppen, jedoch scheint, wie in Kapitel 5.2 beschrieben, das Verhältnis zwischen NO und reaktiven Stickstoffverbindungen für den resultierenden Effekt der iNOS-Genexpression verantwortlich zu sein [98]. In folgenden Projekten wäre neben der Analyse der iNOS-Genexpression folglich auch die Bestimmung reaktiver Stickstoffverbindungen denkbar, um das Verhältnis zwischen schädlicher und protektiver iNOS-Wirkung genauer zu eruieren.

In dieser Arbeit ist es gelungen die OGD-bedingte Freisetzung von DAMPs aus primären Kardiomyozyten nachzuweisen. Dabei konnte jedoch nicht eruiert werden, wie stark die durch DAMPs initiierte Inflammationsreaktion tatsächlich ausfällt. Daher wurden in einem zweiten Teil der Arbeit RAW 264.7-Makrophagen mit dem Zellkulturüberstand der geschädigten primären Kardiomyozyten inkubiert. Hierbei handelte sich um zwei unabhängig voneinander kultivierte Monokulturen. Da eine gewisse Degradation von DAMPs während der Lagerung des Zellkulturüberstands vor der Inkubation der RAW 264.7-Makrophagen nicht ausgeschlossen werden kann, ist eine direkte Co-Kultur der primären Kardiomyozyten und Makrophagen möglicherweise geeigneter, um eine durch die DAMPs ausgelöste sterile Inflammationsantwort direkt zu stimulieren. Dabei wäre eine Analyse der Genexpression via quantitativer RT-PCR jedoch problematisch, da in der Co-Kultur nicht unterschieden werden könnte, welche Zellen für die beobachtete Regulation verantwortlich wären. In Anlehnung an Shames et al. stellt in einer Co-Kultur die Immunfluoreszenzfärbung der zu untersuchenden Marker eine geeignete Alternative dar [118]. Auch wäre die Nutzung sogenannter „Transwell“-Membranen oder Zellkultureinsätze denkbar, die die unterschiedlichen Zellen voneinander trennen, jedoch durch Poren einen Austausch von Signalmolekülen ermöglichen. Weiterhin handelt es sich bei den RAW 264.7-Makrophagen um Tumorzellen murinen Ursprungs, die mit steigender Passage vermehrten Mutationen unterliegen können. Zudem sind die Ergebnisse von Zellen tierischen Ursprungs insgesamt nur bedingt auf Menschen übertragbar.

5.7 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die TH hat sich in der Klinik bisher insbesondere zur Neuroprotektion etabliert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass moderate TH durch signifikante Reduktion der Zelltodmechanismen die Zellviabilität OGD/R-geschädigter primärer Kardiomyozyten im Vergleich zu Normothermie erhöht. Dies bestätigt die Ergebnisse vieler *in vivo*-Studien, die ebenso einen kardioprotektiven Effekt der TH beschreiben [57-62]. Um zu untersuchen, ob TH auch in Menschen einen signifikanten kardioprotektiven Effekt aufweist, sind jedoch weiterhin klinische Studien notwendig, deren Fokus einerseits auf dem schnellen Erreichen der hypothermen Zieltemperatur und andererseits auf der Wahl einer geeigneten normothermen Vergleichstemperatur liegen sollte.

Vor allem in neuronalen Zellen wurde bereits eine durch Kühlung induzierte Hochregulation der anti-apoptischen Kälteschockproteine RBM3 und CIRBP beschrieben [36, 81, 86, 114]. Hier konnte eine Induktion ihrer Genexpression durch moderate TH auch in der Reperfusionsphase beobachtet werden. Dies zeigt, dass Kälteschockproteine auch im Myokard einen potentiellen Schlüsselmechanismus der durch moderate TH bedingten Kardioprotektion darstellen. Auch im menschlichen Serum konnte RBM3 bereits nachgewiesen werden [115] und könnte somit auch in der Klinik zukünftig eine bedeutende Rolle als Marker für eine erfolgreiche Kühlung darstellen. Im Gegensatz dazu ist der Nachweis von CIRBP im peripheren Blut vor allem mit dem Schweregrad einer Sepsis assoziiert [37, 127] und extrazelluläres CIRBP als DAMP beschrieben. Die vorliegende Arbeit belegt, dass primäre Kardiomyozyten durch die Freisetzung von DAMPs, nicht jedoch durch Hochregulation pro-inflammatorischer Zytokine, an der Initiierung und Aufrechterhaltung einer Inflammationsreaktion beteiligt sein können. Nach Optimierung des Behandlungsprotokolls für die RAW 264.7-Makrophagen zur Stimulation einer inflammatorischen Antwort wäre die Applikation eines für die Zellkultur geeigneten DAMP-neutralisierenden Antikörpers oder Filters der nächste Schritt, um die beobachtete tendenzielle Reduktion der DAMP-Freisetzung durch TH zu augmentieren und die protektive Wirkung damit zu verstärken. Um die Interaktionen der verschiedenen Zellen des Myokards untereinander besser beurteilen und simulieren zu können, ist die Übertragung des Modells wie in Kapitel 5.6 beschrieben zunächst auf eine Co-Kultur und perspektivisch auf ein *in vivo*-Modell notwendig.

6 Literaturverzeichnis

1. Roth GA, Johnson C, Abajobir A, Abd-Allah F, Abera SF, Abyu G, Ahmed M, Aksut B, Alam T, Alam K, Alla F, Alvis-Guzman N, Amrock S, Ansari H, Ärnlöv J, Asayesh H, Atey TM, Avila-Burgos L, Awasthi A, Banerjee A, Barac A, Bärnighausen T, Barregard L, Bedi N, Belay Ketema E, Bennett D, Berhe G, Bhutta Z, Bitew S, Carapetis J, Carrero JJ, Malta DC, Castañeda-Orjuela CA, Castillo-Rivas J, Catalá-López F, Choi JY, Christensen H, Cirillo M, Cooper L, Criqui M, Cundiff D, Damasceno A, Dandona L, Dandona R, Davletov K, Dharmaratne S, Dorairaj P, Dubey M, Ehrenkranz R, El Sayed Zaki M, Faraon EJA, Esteghamati A, Farid T, Farvid M, Feigin V, Ding EL, Fowkes G, Gebrehiwot T, Gillum R, Gold A, Gona P, Gupta R, Habtewold TD, Hafezi-Nejad N, Hailu T, Hailu GB, Hankey G, Hassen HY, Abate KH, Havmoeller R, Hay SI, Horino M, Hotez PJ, Jacobsen K, James S, Javanbakht M, Jeemon P, John D, Jonas J, Kalkonde Y, Karimkhani C, Kasaeian A, Khader Y, Khan A, Khang YH, Khera S, Khoja AT, Khubchandani J, Kim D, Kolte D, Kosen S, Krohn KJ, Kumar GA, Kwan GF, Lal DK, Larsson A, Linn S, Lopez A, Lotufo PA, El Razek HMA, Malekzadeh R, Mazidi M, Meier T, Meles KG, Mensah G, Meretoja A, Mezgebe H, Miller T, Mirrakhimov E, Mohammed S, Moran AE, Musa KI, Narula J, Neal B, Ngalesoni F, Nguyen G, Obermeyer CM, Owolabi M, Patton G, Pedro J, Qato D, Qorbani M, Rahimi K, Rai RK, Rawaf S, Ribeiro A, Safiri S, Salomon JA, Santos I, Santric Milicevic M, Sartorius B, Schutte A, Sepanlou S, Shaikh MA, Shin MJ, Shishehbor M, Shore H, Silva DAS, Sobngwi E, Stranges S, Swaminathan S, Tabarés-Seisdedos R, Tadele Atnafu N, Tesfay F, Thakur JS, Thrift A, Topor-Madry R, Truelsen T, Tyrovolas S, Ukwaja KN, Uthman O, Vasankari T, Vlassov V, Vollset SE, Wakayo T, Watkins D, Weintraub R, Werdecker A, Westerman R, Wiysonge CS, Wolfe C, Workicho A, Xu G, Yano Y, Yip P, Yonemoto N, Younis M, Yu C, Vos T, Naghavi M, Murray C. Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *J Am Coll Cardiol.* 2017;70(1):1-25.
2. Nowbar AN, Gitto M, Howard JP, Francis DP, Al-Lamee R. Mortality From Ischemic Heart Disease. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes.* 2019;12(6):e005375.
3. Murray CJ, Vos T, Lozano R, Naghavi M, Flaxman AD, Michaud C, Ezzati M, Shibuya K, Salomon JA, Abdalla S, Aboyans V, Abraham J, Ackerman I, Aggarwal R, Ahn SY, Ali MK, Alvarado M, Anderson HR, Anderson LM, Andrews KG, Atkinson C, Baddour LM, Bahalim

AN, Barker-Collo S, Barrero LH, Bartels DH, Basáñez MG, Baxter A, Bell ML, Benjamin EJ, Bennett D, Bernabé E, Bhalla K, Bhandari B, Bikbov B, Bin Abdulhak A, Birbeck G, Black JA, Blencowe H, Blore JD, Blyth F, Bolliger I, Bonaventure A, Boufous S, Bourne R, Boussinesq M, Braithwaite T, Brayne C, Bridgett L, Brooker S, Brooks P, Brugha TS, Bryan-Hancock C, Bucello C, Buchbinder R, Buckle G, Budke CM, Burch M, Burney P, Burstein R, Calabria B, Campbell B, Canter CE, Carabin H, Carapetis J, Carmona L, Cella C, Charlson F, Chen H, Cheng AT, Chou D, Chugh SS, Coffeng LE, Colan SD, Colquhoun S, Colson KE, Condon J, Connor MD, Cooper LT, Corriere M, Cortinovis M, de Vaccaro KC, Couser W, Cowie BC, Criqui MH, Cross M, Dabhadkar KC, Dahiya M, Dahodwala N, Damsere-Derry J, Danaei G, Davis A, De Leo D, Degenhardt L, Dellavalle R, Delossantos A, Denenberg J, Derrett S, Des Jarlais DC, Dharmaratne SD, Dherani M, Diaz-Torne C, Dolk H, Dorsey ER, Driscoll T, Duber H, Ebel B, Edmond K, Elbaz A, Ali SE, Erskine H, Erwin PJ, Espindola P, Ewoigbokhan SE, Farzadfar F, Feigin V, Felson DT, Ferrari A, Ferri CP, Fèvre EM, Finucane MM, Flaxman S, Flood L, Foreman K, Forouzanfar MH, Fowkes FG, Fransen M, Freeman MK, Gabbe BJ, Gabriel SE, Gakidou E, Ganatra HA, Garcia B, Gaspari F, Gillum RF, Gmel G, Gonzalez-Medina D, Gosselin R, Grainger R, Grant B, Groeger J, Guillemin F, Gunnell D, Gupta R, Haagsma J, Hagan H, Halasa YA, Hall W, Haring D, Haro JM, Harrison JE, Havmoeller R, Hay RJ, Higashi H, Hill C, Hoen B, Hoffman H, Hotez PJ, Hoy D, Huang JJ, Ibeanusi SE, Jacobsen KH, James SL, Jarvis D, Jasrasaria R, Jayaraman S, Johns N, Jonas JB, Karthikeyan G, Kassebaum N, Kawakami N, Keren A, Khoo JP, King CH, Knowlton LM, Kobusingye O, Koranteng A, Krishnamurthi R, Laden F, Lalloo R, Laslett LL, Lathlean T, Leasher JL, Lee YY, Leigh J, Levinson D, Lim SS, Limb E, Lin JK, Lipnick M, Lipshultz SE, Liu W, Loane M, Ohno SL, Lyons R, Mabweijano J, MacIntyre MF, Malekzadeh R, Mallinger L, Manivannan S, Marcenes W, March L, Margolis DJ, Marks GB, Marks R, Matsumori A, Matzopoulos R, Mayosi BM, McAnulty JH, McDermott MM, McGill N, McGrath J, Medina-Mora ME, Meltzer M, Mensah GA, Merriman TR, Meyer AC, Miglioli V, Miller M, Miller TR, Mitchell PB, Mock C, Mocumbi AO, Moffitt TE, Mokdad AA, Monasta L, Montico M, Moradi-Lakeh M, Moran A, Morawska L, Mori R, Murdoch ME, Mwaniki MK, Naidoo K, Nair MN, Naldi L, Narayan KM, Nelson PK, Nelson RG, Nevitt MC, Newton CR, Nolte S, Norman P, Norman R, O'Donnell M, O'Hanlon S, Olives C, Omer SB, Ortblad K, Osborne R, Ozgediz D, Page A, Pahari B, Pandian JD, Rivero AP, Patten SB, Pearce N, Padilla RP, Perez-Ruiz F, Perico N, Pesudovs K, Phillips D, Phillips MR, Pierce K, Pion S, Polanczyk GV, Polinder S, Pope CA, Popova S, Porrini E, Pourmalek F, Prince M, Pullan RL, Ramaiah KD, Ranganathan D, Razavi H, Regan M, Rehm JT, Rein DB, Remuzzi G, Richardson K, Rivara FP, Roberts T, Robinson C, De Leòn FR,

Ronfani L, Room R, Rosenfeld LC, Rushton L, Sacco RL, Saha S, Sampson U, Sanchez-Riera L, Sanman E, Schwebel DC, Scott JG, Segui-Gomez M, Shahrzad S, Shepard DS, Shin H, Shivakoti R, Singh D, Singh GM, Singh JA, Singleton J, Sleet DA, Sliwa K, Smith E, Smith JL, Stapelberg NJ, Steer A, Steiner T, Stolk WA, Stovner LJ, Sudfeld C, Syed S, Tamburlini G, Tavakkoli M, Taylor HR, Taylor JA, Taylor WJ, Thomas B, Thomson WM, Thurston GD, Tleyjeh IM, Tonelli M, Towbin JA, Truelsen T, Tsilimbaris MK, Ubeda C, Undurraga EA, van der Werf MJ, van Os J, Vavilala MS, Venketasubramanian N, Wang M, Wang W, Watt K, Weatherall DJ, Weinstock MA, Weintraub R, Weisskopf MG, Weissman MM, White RA, Whiteford H, Wiebe N, Wiersma ST, Wilkinson JD, Williams HC, Williams SR, Witt E, Wolfe F, Woolf AD, Wulf S, Yeh PH, Zaidi AK, Zheng ZJ, Zonies D, Lopez AD, AlMazroa MA, Memish ZA. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380(9859):2197-223.

4. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, White HD, for the Universal Definition of Myocardial Infarction EGobotJESoCEACoCAAHAAWHFWTF. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Circulation*. 2018;138(20):e618-e51.

5. Thygesen K, Alpert JS, White HD, Jaffe AS, Apple FS, Galvani M, Katus HA, Newby LK, Ravkilde J, Chaitman B, Clemmensen PM, Dellborg M, Hod H, Porela P, Underwood R, Bax JJ, Beller GA, Bonow R, Van der Wall EE, Bassand JP, Wijns W, Ferguson TB, Steg PG, Uretsky BF, Williams DO, Armstrong PW, Antman EM, Fox KA, Hamm CW, Ohman EM, Simoons ML, Poole-Wilson PA, Gurfinkel EP, Lopez-Sendon JL, Pais P, Mendis S, Zhu JR, Wallentin LC, Fernández-Avilés F, Fox KM, Parkhomenko AN, Priori SG, Tendera M, Voipio-Pulkki LM, Vahanian A, Camm AJ, De Caterina R, Dean V, Dickstein K, Filippatos G, Funck-Brentano C, Hellems I, Kristensen SD, McGregor K, Sechtem U, Silber S, Widimsky P, Zamorano JL, Morais J, Brener S, Harrington R, Morrow D, Lim M, Martinez-Rios MA, Steinhubl S, Levine GN, Gibler WB, Goff D, Tubaro M, Dudek D, Al-Attar N, Infarction JEAAWTFftRoM. Universal definition of myocardial infarction. *Circulation*. 2007;116(22):2634-53.

6. Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res*. 2014;114(12):1852-66.

7. Shah PK. New insights into the pathogenesis and prevention of acute coronary syndromes. *Am J Cardiol.* 1997;79(12B):17-23.
8. Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, Caforio ALP, Crea F, Goudevanos JA, Halvorsen S, Hindricks G, Kastrati A, Lenzen MJ, Prescott E, Roffi M, Valgimigli M, Varenhorst C, Vranckx P, Widimský P, Group ESD. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* 2018;39(2):119-77.
9. Sasson C, Rogers MA, Dahl J, Kellermann AL. Predictors of survival from out-of-hospital cardiac arrest: a systematic review and meta-analysis. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes.* 2010;3(1):63-81.
10. Nolan JP, Neumar RW, Adrie C, Aibiki M, Berg RA, Böttiger 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(3):350-79.
11. 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(5):H1723-41.
12. Kolwicz SC, Purohit S, Tian R. Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes. *Circ Res.* 2013;113(5):603-16.

13. Verma S, Fedak PW, Weisel RD, Butany J, Rao V, Maitland A, Li RK, Dhillon B, Yau TM. Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist. *Circulation*. 2002;105(20):2332-6.
14. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest*. 2013;123(1):92-100.
15. Cao F, Zervou S, Lygate CA. The creatine kinase system as a therapeutic target for myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Biochem Soc Trans*. 2018;46(5):1119-27.
16. Piper HM, Kasseckert SA, Schlüter KD, Abdallah Y. [Pathophysiology of myocardial reperfusion injury]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2008;133(12):586-90.
17. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. 2007;357(11):1121-35.
18. Kloner RA, Bolli R, Marban E, Reinlib L, Braunwald E. Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop. *Circulation*. 1998;97(18):1848-67.
19. 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.
20. He A, Wang JA, Gui C, Jiang Y, Sun Y, Chen T. Changes of mitochondrial pathway in hypoxia/reoxygenation induced cardiomyocytes apoptosis. *Folia Histochem Cytobiol*. 2007;45(4):397-400.
21. Steffens S, Montecucco F, Mach F. The inflammatory response as a target to reduce myocardial ischaemia and reperfusion injury. *Thromb Haemost*. 2009;102(2):240-7.
22. Lee SM, Hutchinson M, Saint DA. The role of Toll-like receptor 4 (TLR4) in cardiac ischaemic-reperfusion injury, cardioprotection and preconditioning. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2016;43(9):864-71.

23. Müller S, Scaffidi P, Degryse B, Bonaldi T, Ronfani L, Agresti A, Beltrame M, Bianchi ME. New EMBO members' review: the double life of HMGB1 chromatin protein: architectural factor and extracellular signal. *EMBO J.* 2001;20(16):4337-40.
24. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature.* 2002;418(6894):191-5.
25. El Mezayen R, El Gazzar M, Seeds MC, McCall CE, Dreskin SC, Nicolls MR. Endogenous signals released from necrotic cells augment inflammatory responses to bacterial endotoxin. *Immunol Lett.* 2007;111(1):36-44.
26. 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(8):469-75.
27. Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, Maise C, Daugas E, Zamzami N, Mak T, Jäättelä M, Penninger JM, Garrido C, Kroemer G. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol.* 2001;3(9):839-43.
28. 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;35:1-10.
29. Hulina A, Grdić Rajković M, Jakšić Despot D, Jelić D, Dojder A, Čepelak I, Rumora L. Extracellular Hsp70 induces inflammation and modulates LPS/LTA-stimulated inflammatory response in THP-1 cells. *Cell Stress Chaperones.* 2018;23(3):373-84.
30. Chase MA, Wheeler DS, Lierl KM, Hughes VS, Wong HR, Page K. Hsp72 induces inflammation and regulates cytokine production in airway epithelium through a TLR4- and NF-kappaB-dependent mechanism. *J Immunol.* 2007;179(9):6318-24.
31. Mathur S, Walley KR, Wang Y, Indrambarya T, Boyd JH. Extracellular heat shock protein 70 induces cardiomyocyte inflammation and contractile dysfunction via TLR2. *Circ J.* 2011;75(10):2445-52.

32. Nishiyama H, Higashitsuji H, Yokoi H, Itoh K, Danno S, Matsuda T, Fujita J. Cloning and characterization of human CIRP (cold-inducible RNA-binding protein) cDNA and chromosomal assignment of the gene. *Gene*. 1997;204(1-2):115-20.
33. Zhu X, Bühner C, Wellmann S. Cold-inducible proteins CIRP and RBM3, a unique couple with activities far beyond the cold. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(20):3839-59.
34. Zhang HT, Xue JH, Zhang ZW, Kong HB, Liu AJ, Li SC, Xu DG. Cold-inducible RNA-binding protein inhibits neuron apoptosis through the suppression of mitochondrial apoptosis. *Brain Res*. 2015;1622:474-83.
35. Liao Y, Tong L, Tang L, Wu S. The role of cold-inducible RNA binding protein in cell stress response. *Int J Cancer*. 2017;141(11):2164-73.
36. Wang G, Zhang JN, Guo JK, Cai Y, Sun HS, Dong K, Wu CG. Neuroprotective effects of cold-inducible RNA-binding protein during mild hypothermia on traumatic brain injury. *Neural Regen Res*. 2016;11(5):771-8.
37. Zhou Y, Dong H, Zhong Y, Huang J, Lv J, Li J. The Cold-Inducible RNA-Binding Protein (CIRP) Level in Peripheral Blood Predicts Sepsis Outcome. *PLoS One*. 2015;10(9):e0137721.
38. Kaczanowski S. Apoptosis: its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging. *Phys Biol*. 2016;13(3):031001.
39. Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, Dong W. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:4350965.
40. Liu L, Yenari MA. Therapeutic hypothermia: neuroprotective mechanisms. *Front Biosci*. 2007;12:816-25.
41. Candé C, Cohen I, Daugas E, Ravagnan L, Larochette N, Zamzami N, Kroemer G. Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie*. 2002;84(2-3):215-22.

42. Edlich F. BCL-2 proteins and apoptosis: Recent insights and unknowns. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;500(1):26-34.
43. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol.* 2000;157(5):1415-30.
44. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(4):a008656.
45. 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(5):H1923-35.
46. Marunouchi T, Tanonaka K. Cell Death in the Cardiac Myocyte. *Biol Pharm Bull.* 2015;38(8):1094-7.
47. 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(3):1101-20.
48. Nunnally ME, Jaeschke R, Bellingan GJ, Lacroix J, Mourvillier B, Rodriguez-Vega GM, Rubertsson S, Vassilakopoulos T, Weinert C, Zanotti-Cavazzoni S, Buchman TG. Targeted temperature management in critical care: a report and recommendations from five professional societies. *Crit Care Med.* 2011;39(5):1113-25.
49. Song SS, Lyden PD. Overview of therapeutic hypothermia. *Curr Treat Options Neurol.* 2012;14(6):541-8.
50. Jackson TC, Kochanek PM. A New Vision for Therapeutic Hypothermia in the Era of Targeted Temperature Management: A Speculative Synthesis. *Ther Hypothermia Temp Manag.* 2019;9(1):13-47.
51. Group HaCAS. Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest. *N Engl J Med.* 2002;346(8):549-56.

52. 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. *N Engl J Med*. 2002;346(8):557-63.
53. Callaway CW, Donnino MW, Fink EL, Geocadin RG, Golan E, Kern KB, Leary M, Meurer WJ, Peberdy MA, Thompson TM, Zimmerman JL. Part 8: Post-Cardiac Arrest Care: 2015 American Heart Association Guidelines Update for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Circulation*. 2015;132(18 Suppl 2):S465-82.
54. Gluckman PD, Wyatt JS, Azzopardi D, Ballard R, Edwards AD, Ferriero DM, Polin RA, Robertson CM, Thoresen M, Whitelaw A, Gunn AJ. Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial. *Lancet*. 2005;365(9460):663-70.
55. 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, Network NIOCHaHDNR. Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *N Engl J Med*. 2005;353(15):1574-84.
56. Saad H, Aladawy M. Temperature management in cardiac surgery. *Glob Cardiol Sci Pract*. 2013;2013(1):44-62.
57. Hale SL, Kloner RA. Mild hypothermia as a cardioprotective approach for acute myocardial infarction: laboratory to clinical application. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2011;16(2):131-9.
58. Abendschein DR, Tacker WA, Babbs CF. Protection of ischemic myocardium by whole-body hypothermia after coronary artery occlusion in dogs. *Am Heart J*. 1978;96(6):772-80.
59. Schwartz LM, Verbinski SG, Vander Heide RS, Reimer KA. Epicardial temperature is a major predictor of myocardial infarct size in dogs. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29(6):1577-83.
60. Hale SL, Kloner RA. Myocardial temperature in acute myocardial infarction: protection with mild regional hypothermia. *Am J Physiol*. 1997;273(1 Pt 2):H220-7.

61. Miki T, Liu GS, Cohen MV, Downey JM. Mild hypothermia reduces infarct size in the beating rabbit heart: a practical intervention for acute myocardial infarction? *Basic Res Cardiol.* 1998;93(5):372-83.
62. Duncker DJ, Klassen CL, Ishibashi Y, Herrlinger SH, Pavsek TJ, Bache RJ. Effect of temperature on myocardial infarction in swine. *Am J Physiol.* 1996;270(4 Pt 2):H1189-99.
63. Chien GL, Wolff RA, Davis RF, van Winkle DM. "Normothermic range" temperature affects myocardial infarct size. *Cardiovasc Res.* 1994;28(7):1014-7.
64. Tissier R, Chenoune M, Ghaleh B, Cohen MV, Downey JM, Berdeaux A. The small chill: mild hypothermia for cardioprotection? *Cardiovasc Res.* 2010;88(3):406-14.
65. Polderman KH. Induced hypothermia and fever control for prevention and treatment of neurological injuries. *Lancet.* 2008;371(9628):1955-69.
66. Erlinge D, Götberg M, Noc M, Lang I, Holzer M, Clemmensen P, Jensen U, Metzler B, James S, Bøtker HE, Omerovic E, Koul S, Engblom H, Carlsson M, Arheden H, Östlund O, Wallentin L, Klos B, Harnek J, Olivecrona GK. Therapeutic hypothermia for the treatment of acute myocardial infarction-combined analysis of the RAPID MI-ICE and the CHILL-MI trials. *Ther Hypothermia Temp Manag.* 2015;5(2):77-84.
67. Nielsen N, Sunde K, Hovdenes J, Riker RR, Rubertsson S, Stammet P, Nilsson F, Friberg H, Network H. Adverse events and their relation to mortality in out-of-hospital cardiac arrest patients treated with therapeutic hypothermia. *Crit Care Med.* 2011;39(1):57-64.
68. Valeri CR, Khabbaz K, Khuri SF, Marquardt C, Ragno G, Feingold H, Gray AD, Axford T. Effect of skin temperature on platelet function in patients undergoing extracorporeal bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1992;104(1):108-16.
69. Andresen M, Gazmuri JT, Marín A, Regueira T, Rovegno M. Therapeutic hypothermia for acute brain injuries. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med.* 2015;23:42.
70. Tang XN, Yenari MA. Hypothermia as a cytoprotective strategy in ischemic tissue injury. *Ageing Res Rev.* 2010;9(1):61-8.

71. Kang IS, Fumiaki I, Pyun WB. Therapeutic Hypothermia for Cardioprotection in Acute Myocardial Infarction. *Yonsei Med J.* 2016;57(2):291-7.
72. 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(2):233-9.
73. 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. *Cardiovasc Res.* 2009;83(2):345-53.
74. Maier CM, Sun GH, Cheng D, Yenari MA, Chan PH, Steinberg GK. Effects of mild hypothermia on superoxide anion production, superoxide dismutase expression, and activity following transient focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis.* 2002;11(1):28-42.
75. Zhang Z, Sobel RA, Cheng D, Steinberg GK, Yenari MA. Mild hypothermia increases Bcl-2 protein expression following global cerebral ischemia. *Brain Res Mol Brain Res.* 2001;95(1-2):75-85.
76. Zhou T, Lin H, Jiang L, Yu T, Zeng C, Liu J, Yang Z. Mild hypothermia protects hippocampal neurons from oxygen-glucose deprivation injury through inhibiting caspase-3 activation. *Cryobiology.* 2018;80:55-61.
77. Zgavc T, De Geyter D, Ceulemans AG, Stoop W, Hachimi-Idrissi S, Michotte Y, Sarre S, Kooijman R. Mild hypothermia reduces activated caspase-3 up to 1 week after a focal cerebral ischemia induced by endothelin-1 in rats. *Brain Res.* 2013;1501:81-8.
78. Fukuda H, Tomimatsu T, Watanabe N, Mu JW, Kohzuki M, Endo M, Fujii E, Kanzaki T, Murata Y. Post-ischemic hypothermia blocks caspase-3 activation in the newborn rat brain after hypoxia-ischemia. *Brain Res.* 2001;910(1-2):187-91.
79. Tong G, Walker C, Bühner C, Berger F, Miera O, Schmitt KR. Moderate hypothermia initiated during oxygen-glucose deprivation preserves HL-1 cardiomyocytes. *Cryobiology.* 2015;70(2):101-8.

80. Terao Y, Miyamoto S, Hirai K, Kamiguchi H, Ohta H, Shimojo M, Kiyota Y, Asahi S, Sakura Y, Shintani Y. Hypothermia enhances heat-shock protein 70 production in ischemic brains. *Neuroreport*. 2009;20(8):745-9.
81. Tong G, Endersfelder S, Rosenthal LM, Wollersheim S, Sauer IM, Bühner C, Berger F, Schmitt KR. Effects of moderate and deep hypothermia on RNA-binding proteins RBM3 and CIRP expressions in murine hippocampal brain slices. *Brain Res*. 2013;1504:74-84.
82. Danno S, Nishiyama H, Higashitsuji H, Yokoi H, Xue JH, Itoh K, Matsuda T, Fujita J. Increased transcript level of RBM3, a member of the glycine-rich RNA-binding protein family, in human cells in response to cold stress. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;236(3):804-7.
83. Ushio A, Eto K. RBM3 expression is upregulated by NF- κ B p65 activity, protecting cells from apoptosis, during mild hypothermia. *J Cell Biochem*. 2018;119(7):5734-49.
84. Smart F, Aschrafi A, Atkins A, Owens GC, Pilotte J, Cunningham BA, Vanderklish PW. Two isoforms of the cold-inducible mRNA-binding protein RBM3 localize to dendrites and promote translation. *J Neurochem*. 2007;101(5):1367-79.
85. Chip S, Zelmer A, Ogunshola OO, Felderhoff-Mueser U, Nitsch C, Bührer C, Wellmann S. The RNA-binding protein RBM3 is involved in hypothermia induced neuroprotection. *Neurobiol Dis*. 2011;43(2):388-96.
86. Peretti D, Bastide A, Radford H, Verity N, Molloy C, Martin MG, Moreno JA, Steinert JR, Smith T, Dinsdale D, Willis AE, Mallucci GR. RBM3 mediates structural plasticity and protective effects of cooling in neurodegeneration. *Nature*. 2015;518(7538):236-9.
87. Zhang F, Dong H, Lv T, Jin K, Jin Y, Zhang X, Jiang J. Moderate hypothermia inhibits microglial activation after traumatic brain injury by modulating autophagy/apoptosis and the MyD88-dependent TLR4 signaling pathway. *J Neuroinflammation*. 2018;15(1):273.
88. Sun YJ, Zhang ZY, Fan B, Li GY. Neuroprotection by Therapeutic Hypothermia. *Front Neurosci*. 2019;13:586.

89. Yanagawa Y, Kawakami M, Okada Y. Moderate hypothermia alters interleukin-6 and interleukin-1alpha reactions in ischemic brain in mice. *Resuscitation*. 2002;53(1):93-9.
90. Vazquez-Jimenez JF, Qing M, Hermanns B, Klosterhalfen B, Wöltje M, Chakupurakal R, Schumacher K, Messmer BJ, von Bernuth G, Seghaye MC. Moderate hypothermia during cardiopulmonary bypass reduces myocardial cell damage and myocardial cell death related to cardiac surgery. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38(4):1216-23.
91. Shi J, Dai W, Kloner RA. Therapeutic Hypothermia Reduces the Inflammatory Response Following Ischemia/Reperfusion Injury in Rat Hearts. *Ther Hypothermia Temp Manag*. 2017;7(3):162-70.
92. Krech J. Hypothermie zur Kardioprotektion: Einfluss therapeutischer Hypothermie während simulierter Ischämie/Reperfusion auf HL-1 Zellen und primäre Kardiomyozyten: Charité - Universitätsmedizin Berlin; 2017.
93. Sanchez L. TCA protein precipitation protocol (originally from Luis Sanchez): Caltech; 2001 [Verfügbar auf: http://www.its.caltech.edu/~bjorker/TCA_ppt_protocol.pdf, Abruf am 28. Januar 2020, 18:00 Uhr].
94. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn*. 2005;5(2):209-19.
95. Morrison LE. Basic principles of fluorescence and energy transfer applied to real-time PCR. *Mol Biotechnol*. 2010;44(2):168-76.
96. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
97. Wang XL, Liu HR, Tao L, Liang F, Yan L, Zhao RR, Lopez BL, Christopher TA, Ma XL. Role of iNOS-derived reactive nitrogen species and resultant nitritative stress in leukocytes-induced cardiomyocyte apoptosis after myocardial ischemia/reperfusion. *Apoptosis*. 2007;12(7):1209-17.

98. Yu X, Ge L, Niu L, Lian X, Ma H, Pang L. The Dual Role of Inducible Nitric Oxide Synthase in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: Friend or Foe? *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:8364848.
99. Leist M, Single B, Castoldi AF, Kühnle S, Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med*. 1997;185(8):1481-6.
100. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(16):7162-6.
101. Wu MY, Yiang GT, Liao WT, Tsai AP, Cheng YL, Cheng PW, Li CY, Li CJ. Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cell Physiol Biochem*. 2018;46(4):1650-67.
102. González-Montero J, Brito R, Gajardo AI, Rodrigo R. Myocardial reperfusion injury and oxidative stress: Therapeutic opportunities. *World J Cardiol*. 2018;10(9):74-86.
103. Tong G, von Garlen NNA, Wowro S, J., Lam PD, Krech J, Berger F, Schmitt KRL. Post-TTM Rebound Pyrexia after Ischemia-Reperfusion Injury Results in Sterile Inflammation and Apoptosis in Cardiomyocytes. *Mediators of Inflammation*. 2019;2019.
104. Han HS, Qiao Y, Karabiyikoglu M, Giffard RG, Yenari MA. Influence of mild hypothermia on inducible nitric oxide synthase expression and reactive nitrogen production in experimental stroke and inflammation. *J Neurosci*. 2002;22(10):3921-8.
105. Feng Q, Lu X, Jones DL, Shen J, Arnold JM. Increased inducible nitric oxide synthase expression contributes to myocardial dysfunction and higher mortality after myocardial infarction in mice. *Circulation*. 2001;104(6):700-4.
106. Takano H, Manchikalapudi S, Tang XL, Qiu Y, Rizvi A, Jadoon AK, Zhang Q, Bolli R. Nitric oxide synthase is the mediator of late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits. *Circulation*. 1998;98(5):441-9.

107. West MB, Rokosh G, Obal D, Velayutham M, Xuan YT, Hill BG, Keith RJ, Schrader J, Guo Y, Conklin DJ, Prabhu SD, Zweier JL, Bolli R, Bhatnagar A. Cardiac myocyte-specific expression of inducible nitric oxide synthase protects against ischemia/reperfusion injury by preventing mitochondrial permeability transition. *Circulation*. 2008;118(19):1970-8.
108. Zhao T, Xi L, Chelliah J, Levasseur JE, Kukreja RC. Inducible nitric oxide synthase mediates delayed myocardial protection induced by activation of adenosine A(1) receptors: evidence from gene-knockout mice. *Circulation*. 2000;102(8):902-7.
109. Lasley RD, Keith BJ, Kristo G, Yoshimura Y, Mentzer RM. Delayed adenosine A1 receptor preconditioning in rat myocardium is MAPK dependent but iNOS independent. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(2):H785-91.
110. Zweier JL, Flaherty JT, Weisfeldt ML. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(5):1404-7.
111. Neri M, Fineschi V, Di Paolo M, Pomara C, Riezzo I, Turillazzi E, Cerretani D. Cardiac oxidative stress and inflammatory cytokines response after myocardial infarction. *Curr Vasc Pharmacol*. 2015;13(1):26-36.
112. Wellmann S, Bühner C, Moderegger E, Zelmer A, Kirschner R, Koehne P, Fujita J, Seeger K. Oxygen-regulated expression of the RNA-binding proteins RBM3 and CIRP by a HIF-1-independent mechanism. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 9):1785-94.
113. 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 (Auckl)*. 2017;5:33-43.
114. Liu A, Zhang Z, Li A, Xue J. Effects of hypothermia and cerebral ischemia on cold-inducible RNA-binding protein mRNA expression in rat brain. *Brain Res*. 2010;1347:104-10.
115. Rosenthal LM, Tong G, Wowro S, Walker C, Pfitzer C, Böttcher W, Miera O, Berger F, Schmitt KRL. A Prospective Clinical Trial Measuring the Effects of Cardiopulmonary Bypass Under Mild Hypothermia on the Inflammatory Response and Regulation of Cold-Shock Protein RNA-Binding Motif 3. *Ther Hypothermia Temp Manag*. 2019.

116. Hwang MW, Matsumori A, Furukawa Y, Ono K, Okada M, Iwasaki A, Hara M, Miyamoto T, Touma M, Sasayama S. Neutralization of interleukin-1beta in the acute phase of myocardial infarction promotes the progression of left ventricular remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2001;38(5):1546-53.
117. Nag AC. Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution. *Cytobios.* 1980;28(109):41-61.
118. Shames BD, Barton HH, Reznikov LL, Cairns CB, Banerjee A, Harken AH, Meng X. Ischemia alone is sufficient to induce TNF-alpha mRNA and peptide in the myocardium. *Shock.* 2002;17(2):114-9.
119. Bro-Jeppesen J, Kjaergaard J, Stammet P, Wise MP, Hovdenes J, Åneman A, Horn J, Devaux Y, Erlinge D, Gasche Y, Wanscher M, Cronberg T, Friberg H, Wetterslev J, Pellis T, Kuiper M, Nielsen N, Hassager C, Investigators T-T. Predictive value of interleukin-6 in post-cardiac arrest patients treated with targeted temperature management at 33 °C or 36 °C. *Resuscitation.* 2016;98:1-8.
120. Bro-Jeppesen J, Kjaergaard J, Wanscher M, Nielsen N, Friberg H, Bjerre M, Hassager C. The inflammatory response after out-of-hospital cardiac arrest is not modified by targeted temperature management at 33 °C or 36 °C. *Resuscitation.* 2014;85(11):1480-7.
121. Walker HK, Hall WD, Hurst JW. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations.* 1990.
122. Christia P, Frangogiannis NG. Targeting inflammatory pathways in myocardial infarction. *Eur J Clin Invest.* 2013;43(9):986-95.
123. Sachet M, Liang YY, Oehler R. The immune response to secondary necrotic cells. *Apoptosis.* 2017;22(10):1189-204.
124. Lotze MT, Zeh HJ, Rubartelli A, Sparvero LJ, Amoscato AA, Washburn NR, Devera ME, Liang X, Tör M, Billiar T. The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunol Rev.* 2007;220:60-81.

125. Cirillo P, Giallauria F, Pacileo M, Petrillo G, D'Agostino M, Vigorito C, Chiariello M. Increased high mobility group box-1 protein levels are associated with impaired cardiopulmonary and echocardiographic findings after acute myocardial infarction. *J Card Fail.* 2009;15(4):362-7.
126. Omura T, Kushimoto S, Yamanouchi S, Kudo D, Miyagawa N. High-mobility group box 1 is associated with neurological outcome in patients with post-cardiac arrest syndrome after out-of-hospital cardiac arrest. *J Intensive Care.* 2016;4:37.
127. Aziz M, Brenner M, Wang P. Extracellular CIRP (eCIRP) and inflammation. *J Leukoc Biol.* 2019;106(1):133-46.
128. Dybdahl B, Slørdahl SA, Waage A, Kierulf P, Espevik T, Sundan A. Myocardial ischaemia and the inflammatory response: release of heat shock protein 70 after myocardial infarction. *Heart.* 2005;91(3):299-304.
129. Lee JH, Yoon EJ, Seo J, Kavoussi A, Chung YE, Chung SP, Park I, Kim CH, You JS. Hypothermia inhibits the propagation of acute ischemic injury by inhibiting HMGB1. *Mol Brain.* 2016;9(1):81.
130. Godwin A, Yang WL, Sharma A, Khader A, Wang Z, Zhang F, Nicastro J, Coppa GF, Wang P. Blocking cold-inducible RNA-binding protein protects liver from ischemia-reperfusion injury. *Shock.* 2015;43(1):24-30.
131. Hobbs S, Reynoso M, Geddis AV, Mitrophanov AY, Matheny RW. LPS-stimulated NF- κ B p65 dynamic response marks the initiation of TNF expression and transition to IL-10 expression in RAW 264.7 macrophages. *Physiol Rep.* 2018;6(21):e13914.

7 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Phuong D. Lam, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Welchen Einfluss hat moderate Hypothermie auf einen Ischämie/Reperfusionsschaden in primären 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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

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

Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

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

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

Datum

Unterschrift

8 Lebenslauf

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

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

9 Publikationsliste

Journalpublikationen als Erst- oder Ko-Autorin

Tong G, von Garlen NNA, Wowro SJ, **Lam PD**, Krech J, Berger F, Schmitt KRL: Post-TTM Rebound Pyrexia after Ischemia-Reperfusion Injury Results in Sterile Inflammation and Apoptosis in Cardiomyocytes. Mediators of Inflammation, Special Issue “Regulation of Inflammation in Myocardial Ischemia-Reperfusion”, 2019.

Vortragspräsentationen mit Abstract-Veröffentlichungen

Lam P, Tong G, Brey F, Berger F, Schmitt K: Targeted temperature management protects murine primary cardiomyocytes from ischaemia/reperfusion-induced injury and prevents the onset of sterile inflammation by attenuating the release of DAMPs. Kongress des European Resuscitation Council (ERC) “New technologies in resuscitation” in Bologna (Italien), 20. - 22. September 2018.

Krech J, **Lam P**, Tong G, Berger F, Rosenthal LM, Schmitt K: Cardiomyocytes: The heart of DAMPs release and sterile inflammation in Ischemia/Reperfusion Injury. 52. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie und angeborene Herzfehler e.V. in Wiesbaden (Deutschland), 29. Februar – 03. März 2020.

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. med. Katharina Schmitt für die professionelle Betreuung dieser Arbeit. Ihr unermüdlicher Enthusiasmus für das Thema, die immer konstruktive Kritik, ihre Unterstützung und Herzlichkeit haben mich in den letzten Jahren stets motiviert und inspiriert.

Bei Ph.D. Giang Tong möchte ich mich für seine Unterstützung bei der Projektkonzipierung, für die Diskussion der Daten und die zahlreichen Denkanstöße bedanken.

Dr. rer. medic. Sylvia Wowro und Dr. med. Jana Krech bin ich für die Korrektur der Arbeit und ihre jederzeitige Erreichbarkeit für Rückfragen und zahlreiche Ratschläge dankbar. Nora Künzel bin ich für ihre Hilfe bei laborpraktischen Arbeiten und Fragen ebenfalls großen Dank schuldig. Bei ihr und Franka Brey möchte ich mich zudem besonders für die Vorarbeiten und die praktische Einarbeitung in dieses Projekt bedanken. Auch bei Nele Rolfs und Nalina von Garlen möchte ich mich für die gegenseitige Bestärkung und den Erfahrungsaustausch bedanken. Ich werde immer mit großer Freude auf die Zeit im Forschungslabor zurückschauen.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern, meinem Bruder Hai-Tam und Pascal Kuschel für die emotionale Unterstützung nicht nur während der Erstellung dieser Arbeit, sondern in allen Lebenslagen, bedanken.