

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

DISSERTATION

Der Einfluss milder Hypothermie auf das Überleben von
H9c2-Kardiomyoblasten nach CoCl_2 -induzierter HIF-Akkumulation

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Poya Soltani

aus Berlin

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. K. Schmitt
2. Prof. Dr. med. Ch. Bühner
3. Prof. Dr. med. B. Stiller

Datum der Promotion: 25.10.2013

Meinen Eltern

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	II
Tabellenverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Klinischer Hintergrund	1
1.2 Hypothermie	2
1.3 <i>In vitro</i> -Modell und Zellkultur von Kardiomyoblasten (H9c2-Zellen)	4
1.4 Hypoxie	5
1.4.1 HIF-1 α	5
1.5 Apoptose.....	7
1.5.1 Bcl-2-Proteinfamilie.....	9
1.5.1.1 Bax (Bcl-2 associated protein)	10
1.5.1.2 Bcl-2 (B-cell lymphoma-2)	11
1.5.2 Caspase 3	12
1.6 Hypothermie und medikamentöse Therapie	13
1.6.1 Katecholamintherapie: β -Agonist Isoprenalin	13
1.6.2 Sedierung mit Propofol	14
1.7 Zielsetzung	16
2 Materialien	17
2.1 Geräte.....	17
2.2 Chemikalien	18
2.3 Zellkultur	19
2.4 Proteine, Antikörper und Medikamente.....	20
2.5 Software	20
3 Methoden	21
3.1 Zeit-Temperatur-Protokoll des <i>in vitro</i> -Modells.....	21
3.2 Zellkultur und -pflege.....	22
3.3 Morphologische Untersuchung nach der CoCl ₂ -Behandlung am Phasenkontrastmikroskop	23
3.4 Enzymatische Zellaktivität im MTT-Test.....	24

3.5	Immunzytochemische Fluoreszenzmikroskopie	25
3.5.1	Untersuchung des hypoxiespezifischen Proteins HIF-1 α	25
3.5.2	Zellschädigung in der Propidiumjodidfärbung.....	26
3.5.3	Apoptoseexekution anhand des gespaltenen Zytokeratin 18	27
3.6	Zellüberleben in der Trypanblaufärbung.....	28
3.6.1	Einfluss der Hypothermie auf das Zellüberleben mock-behandelter H9c2-Zellen.....	29
3.6.2	Einfluss der Behandlung mit unterschiedlichen CoCl ₂ -Konzentrationen auf H9c2-Zellen	29
3.6.3	Einfluss der Hypothermie auf das Zellüberleben CoCl ₂ -behandelter H9c2-Zellen.....	30
3.6.4	Einfluss von Propofol und Isoprenalin auf CoCl ₂ -behandelte H9c2-Zellen ..	30
3.7	Intrazelluläre Signalwege in der Western-Blot-Analyse.....	30
3.7.1	Proteingewinnung	31
3.7.2	Proteinaufbereitung	31
3.7.3	BCA-Methode zur Bestimmung der Proteinmenge	32
3.7.4	Gelelektrophorese	32
3.7.5	Proteintransfer	34
3.7.6	Applikation von Primär- und Sekundärantikörpern.....	34
3.7.7	Detektion der Proteine mittels ChemiDoc TM	34
3.7.8	Densitometrische Auswertung der Proteine mittels ImageLab TM -Software..	35
3.8	Statistische Auswertung	35
4	Ergebnisse	36
4.1	Wirkung milder Hypothermie auf die Zellvitalität	36
4.2	Wirkung der CoCl ₂ -Behandlung auf die Morphologie und Zellvitalität.....	36
4.3	Zellschaden in einer Propidiumjodidfärbung	39
4.4	Transkriptionsfaktor HIF-1 α als Regulator der CoCl ₂ -Schädigung.....	41
4.5	Zellüberleben nach einer CoCl ₂ -Behandlung unter Normo- und Hypothermie	42
4.6	Regulation Apoptose-assoziiierter Proteine	43
4.6.1	Bax und Bcl-2	43
4.6.2	Caspase 3	46

4.7	Ausführung der Apoptose durch die Effektor-Caspasen	48
4.8	Einfluss eines β -Agonisten (Isoprenalin) auf H9c2-Zellen nach einer CoCl ₂ -Behandlung.....	50
4.9	Einfluss von Propofol auf H9c2-Zellen nach einer CoCl ₂ -Behandlung	51
5	Diskussion.....	53
5.1	Kardioprotektion nach Hypoxie	53
5.2	Zellüberleben im <i>in vitro</i> -Modell	53
5.2.1	Zellüberleben nach Behandlung mit CoCl ₂ und milder Hypothermie.....	55
5.2.2	Einfluss von Propofol und Isoprenalin auf das Zellüberleben	56
5.3	Apoptose nach einer simulierten Hypoxie	58
5.3.1	Wirkung der milden Hypothermie auf Bcl-2-Proteine	58
5.3.2	Wirkung der milden Hypothermie auf die Caspase 3.....	60
6.	Schlussfolgerung.....	62
7.	Ausblick.....	63
8.	Zusammenfassung	64
9.	Abstract	66
	Literaturverzeichnis	IV
	Lebenslauf.....	V
	Publikationsliste.....	VI
	Erklärung	VII
	Danksagung	VIII

Abkürzungsverzeichnis

µM	Mikromolar
AMI	akuter Myokardinfarkt
ANOVA	<i>analysis of variance</i> / Varianzanalyse
APAF1	<i>apoptotic protease activating factor 1</i>
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ARNT	<i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i> (= HIF-1β)
Bad	<i>Bcl-2-associated death promotor</i>
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist killer</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BCA	2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BH-Domäne	Bcl-2-homologe Domäne
Bid	<i>BH3-interacting domain death antagonist</i>
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Caspase	<i>Cysteine-aspartic acid proteases</i>
CoCl₂	Kobaltchlorid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i> / verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FasL	Fas-Ligand

FCS	Fetales Kälberserum
GABA	γ -Aminobuttersäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF-1α	<i>Hypoxia inducible factor-1</i>
HKS	HerzKreislaufstillstand
HLW	Herzlungenwiederbelebung
IgG	Immunglobulin G
ISO	Isoprenalin
kDa	Kilodalton
MAC	Mitochondriale Apoptose-induzierte Kanäle
mM	Millimolar
MTT	3-[4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromid
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
Nm	Nanometer
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> / Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBST	PBS-Tween 20
PI	Propidiumjodid
PMM	<i>Permeability of mitochondrial membrane</i> / mitochondriale Membranpermeabilität
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRO	Propofol
RNS	Ribonukleinsäure
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> / Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> /

	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
Tween 20	Poly(oxy-1,2-ethandiyl)- monododekansäuresorbitylester
ZNS	zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Grundlegende protektive Mechanismen der Hypothermie.	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung des HIF-1 Signalweges.	6
Abbildung 3: Schema der intrinsischen Apoptose	8
Abbildung 4: Die Bcl-2-Proteinfamilie.	10
Abbildung 5: Zeit-Temperatur-Protokoll des in vitro-Modells.	21
Abbildung 6: Einfluss unterschiedlicher CoCl₂-Konzentrationen auf das Überleben von H9c2-Zellen	37
Abbildung 7: H9c2-Zellen nach einer CoCl₂-Behandlung.	38
Abbildung 8: Untersuchung des Zellschadens anhand der Membranpermeabilität	40
Abbildung 9: Regulation von HIF-1α nach einer CoCl₂-Behandlung.	41
Abbildung 10: Zellüberleben nach CoCl₂ unter Normo- und Hypothermie.	42
Abbildung 11: Regulation der Proteine Bax und Bcl-2.	44
Abbildung 12: Aktivitätsgrad der Effektor-Caspase 3.	47
Abbildung 13 c-f: Exekution der Apoptose.	49
Abbildung 14: Einfluss der additiven Isoprenalin-Applikation auf das Überleben von H9c2-Zellen.	51
Abbildung 15: Einfluss der additiven Propofol-Applikation auf das Überleben von H9c2-Zellen.	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zellvitalität unter Normothermie (37°C) und Hypothermie (34°C).....	36
Tabelle 2: Densitometrische Analyse des Proteins Bax aus dem Western-Blot in Abbildung 11.	44
Tabelle 3: Densitometrische Analyse des Proteins Bcl-2 aus dem Western-Blot in Abbildung 11.	45
Tabelle 4: Vergleich des Apoptose-Index‘ (Bax/Bcl-2).....	46
Tabelle 5: Bestimmung der Caspase 3-Aktivierung durch Bildung der Ratio Caspase 3/ Pro-Caspase 3.	47

1 Einleitung

1.1 Klinischer Hintergrund

In Europa wird jährlich bei mehr als 275.000 Menschen eine Herz-Lungen-Wiederbelebung (HLW) aufgrund eines Herz-Kreislauf-Stillstandes (HKS) außerhalb einer medizinischen Einrichtung durchgeführt¹. Nur 26% der Patienten können nach primär erfolgreicher Reanimation im Krankenhaus intensivmedizinisch versorgt werden². Dennoch werden von den erwachsenen Patienten nur 7% lebend nach Hause entlassen². Diese Zahl liegt für Patienten im Kindes- und Jugendalter (0-18 Jahre) mit 6,1% noch niedriger, wobei sie abhängig von der Lebensphase starke Schwankungen aufweist³. Bei genauer Betrachtung ergeben sich nach der Reanimation von Kindern folgende Überlebenszahlen: 3,4% im Säuglingsalter, 9,1% zwischen einem und elf Jahren und 8,9% zwischen zwölf bis neunzehnjährigen Jugendlichen³. Die Prognose dieser Patienten wird maßgeblich durch die neurologische Schädigung und Stabilität des Kreislaufes bestimmt⁴. Zur Aufrechterhaltung des Kreislaufes ist eine suffiziente Myokardfunktion obligat. Eine Sauerstoffunterversorgung, die sogenannte Hypoxie, trägt im Herzen nach einer Ischämie durch Beeinträchtigung des Stoffwechsels zum Zelltod, Gewebeschaden und zu myokardialer Dysfunktion bei⁵. Letztere kann sich durch Herzrhythmusstörungen oder eine eingeschränkte myokardiale Kontraktilität äußern^{4, 6}.

Die Kardioprotektion nach Hypoxie ist ein wesentlicher Bestandteil zur Aufrechterhaltung des Herzkreislaufsystems⁵. Sowohl die Überlebenschancen als auch die Lebensqualität könnten somit nach einem HKS oder akuten Myokardinfarkt (AMI) steigen, wenn weitere Möglichkeiten der Kardioprotektion genutzt würden. Die vorliegende Arbeit untersucht die therapeutische Hypothermie nach Hypoxie als Methode zur Kardioprotektion.

In der klinischen Anwendung werden therapeutische und prophylaktische Hypothermie unterschieden. Die therapeutische Anwendung erfolgt, nachdem ein Schaden verursacht wurde, während die prophylaktische Hypothermie per definitionem bereits vor der Organschädigung einsetzt. Die prophylaktische Hypothermie während des kardiopulmonalen Bypassverfahrens ist bereits ein etabliertes Verfahren und gängige Praxis im klinischen Alltag der Kardiochirurgie⁷. Ihr Einfluss wurde in klinischen Studien und experimentellen Arbeiten untersucht und bleibt Gegenstand aktueller Forschung⁷⁻¹⁰.

Zwei unabhängige klinische Studien haben belegt, dass eine therapeutische Hypothermie bei bewusstlosen Patienten das neurologische Ergebnis¹¹ verbessert und die Mortalität nach erfolgreicher Herz-Lungen-Wiederbelebung außerhalb eines Krankenhauses senkt^{11, 12}. Die therapeutische Hypothermie wurde aufgrund dieser Erkenntnisse sowohl vom European Resuscitation Council (ERC) als auch von der American Heart Association (AHA) in die aktuellen Leitlinien zur HLW aufgenommen^{13, 14}. Die Anwendung der Hypothermie erfolgt hierbei vor allem aufgrund des neuroprotektiven Effektes und der nachgewiesenen Senkung der Mortalität^{11, 12}.

Da das Überleben der Patienten auch durch die Myokardfunktion und Aufrechterhaltung des Kreislaufes beeinflusst wird, wird in der vorliegenden Arbeit eine mögliche Wirkung der Hypothermie auf das Myokard untersucht. Organprotektive Effekte der therapeutischen Hypothermie, die nach einem HKS im zentralen Nervensystem (ZNS) beobachtet wurden, könnten dabei auch in kardialen Gewebe Wirkung zeigen¹⁵. Die Zahl klinischer Studien über die therapeutische Hypothermie zur Kardioprotektion ist überschaubar. Zusammen mit *in vitro* und *in vivo*-Modellen haben sie bisher widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der Effizienz einer therapeutischen Hypothermie gezeigt¹⁵⁻²¹.

Die vorliegende Studie befasst sich mit dem Effekt der therapeutischen Hypothermie auf Hypoxie geschädigte Kardiomyoblasten, indem sie mögliche Regulationsmechanismen aufzeigen soll. Darüber hinaus wurde der Einfluss von Medikamenten aus der Intensivmedizin auf das Überleben von Kardiomyoblasten untersucht.

Aufgrund einer zunehmenden klinischen Anwendung der Hypothermie ist das Wissen um ihren Einfluss auf den Gesamtorganismus und die einzelnen Organsysteme von großer Bedeutung. Da die Anwendung der Hypothermie meist systemisch erfolgt, sind auch neue organspezifische Erkenntnisse von interdisziplinärem Interesse. Die vorliegende Arbeit soll zum besseren Verständnis der Wirkung milder Hypothermie auf Hypoxie-geschädigtes Myokard beitragen.

1.2 Hypothermie

In der Medizin beschreibt der Begriff der Hypothermie den Zustand, in dem sich der gesamte Körper oder einzelne Körperregionen unterhalb der normalen Körpertemperatur befinden (Normothermie). Die sogenannte Normothermie ist altersabhängig. Bei Säug-

lingen und Kleinkindern beschreibt sie eine Temperaturspanne zwischen 36,5 - 38,0°C und ab dem fünften Lebensjahr zwischen 36,0 - 37,5°C²².

Die klinische Einteilung der Hypothermie bezieht sich auf Normwerte ab dem fünften Lebensjahr. In der medizinischen Anwendung kann die milde Hypothermie (34°C - 35,9°C) von moderater (32°C - 33,9°C), moderat-tiefer (30°C - 31,9°C) und tiefer Hypothermie (<30°C) unterschieden werden^{7, 10}. Eine weitere klinische Einteilung berücksichtigt die zeitliche Relation der Kühlung zum Schaden, indem sie prophylaktische von therapeutischer Hypothermie differenziert. Dabei wird die prophylaktische Hypothermie vor oder spätestens während der Einwirkung einer Noxe induziert. Die therapeutische Hypothermie hingegen wird erst nach der Einwirkung einer Noxe angewandt.

Obwohl die Hypothermie eines der ältesten Therapeutika zur Organprotektion ist, wird noch immer eine kontroverse Diskussion um ihren Einfluss auf Krankheitsbilder, medizinische Prozeduren und Organsysteme geführt. Belegte protektive Wirkungsweisen werden in **Abbildung 1** illustriert (S. 4). Während die Hypothermie nach der Asphyxie des reifen Neugeborenen, im kardiopulmonalen Bypassverfahren und nach kardiopulmonaler Reanimation erfolgreich eingesetzt wird^{13, 23, 24, 25}, wurde bei der neurochirurgischen Versorgung intrazerebraler Gefäßaneurysmata kein signifikanter Vorteil beobachtet²⁶. Auf vielen Gebieten ist der Nutzen der Hypothermie noch unklar, da bei der Anwendung die protektiven Effekten gegen die unerwünschten Nebenwirkungen abgewogen werden müssen. Hierzu zählen Hypovolämie, Elektrolytstörungen, eine erhöhte Blutungsneigung, Muskelzittern, Schmerzempfinden, ein erhöhtes Risiko für Infektionen und unter 30°C auch hochgradige kardiale Arrhythmien^{7, 10}. Das Ausmaß dieser Nebenwirkungen geht mit der Tiefe der Hypothermie einher⁷, sodass für den klinischen Einsatz vor allem die milde Hypothermie von Interesse ist. Außerdem ist in der klinischen Umsetzung die milde Hypothermie (34-35,9°C) mit einem geringeren Aufwand und schneller zu erreichen als darunterliegende Kühlungstemperaturen (< 34°C). Im klinischen Gebrauch haben sich vier Faktoren herauskristallisiert, die den protektiven Effekt der Hypothermie beeinflussen: die Geschwindigkeit der Kühlung und Wiedererwärmung, die Dauer der Kühlung und das Auftreten von Nebenwirkungen¹⁰. Um die optimale Wirkung einer Hypothermiebehandlung zu erreichen, ist daher das Verständnis für die Wirkungsmechanismen von großer Bedeutung.

Die Erforschung von lange bekannten und neu entdeckten Effekten der milden Hypothermie wird durch den heutigen Stand der Wissenschaft auf zellulärer Ebene ermög-

licht. Frühe Erkenntnisse haben die Senkung der Stoffwechselrate und des Energieverbrauchs als protektive Mechanismen der Hypothermie auf Organsysteme belegt⁷. Spätere Untersuchungen wiesen auf eine darüber hinausgehende Wirkungsweise mit der Beeinflussung weiterer Mechanismen wie der Apoptose hin^{7, 27}.

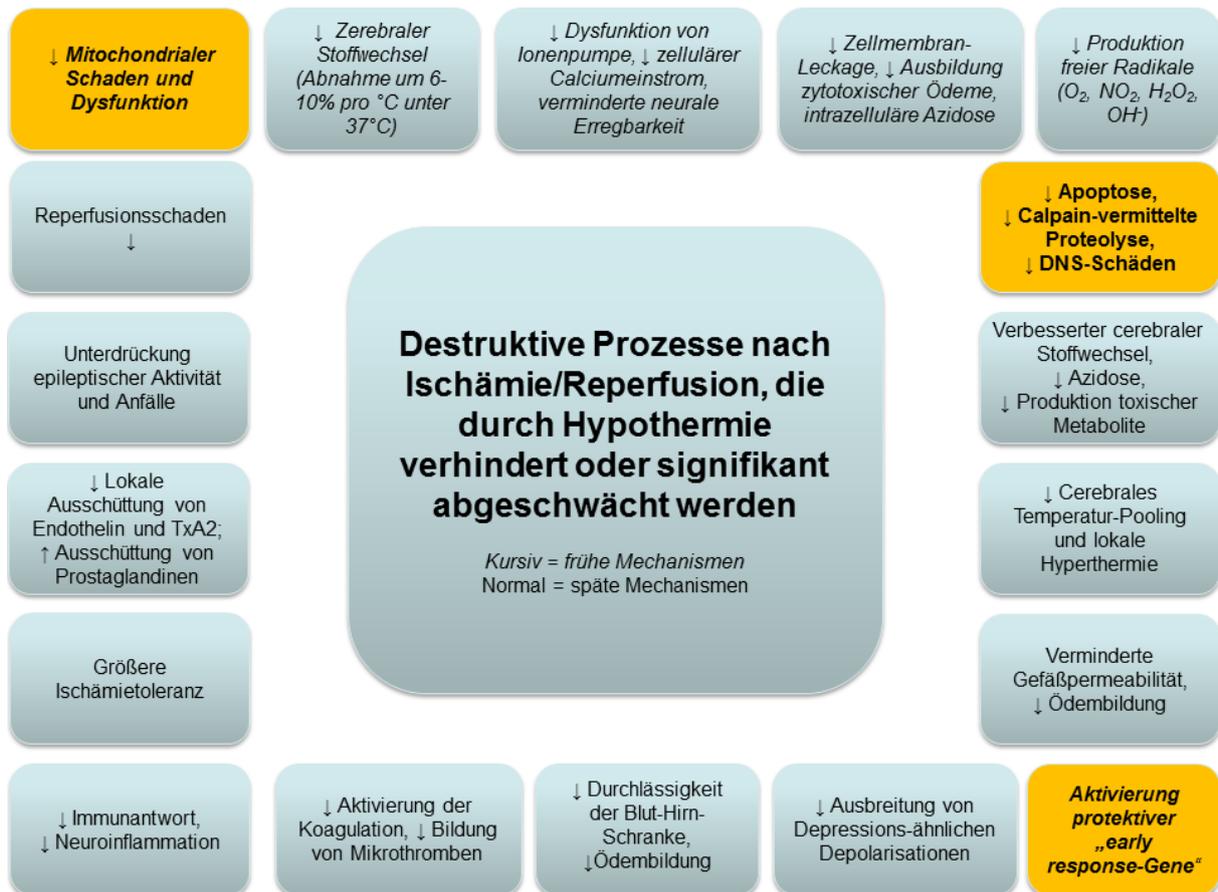


Abbildung 1: Grundlegende protektive Mechanismen der Hypothermie.

In Anlehnung an Polderman et al. sind protektive Effekte milder bis tiefer Hypothermie und deren Mechanismen illustriert⁷. Hauptaspekte der vorliegenden Forschungsarbeit sind orange hervorgehoben.

1.3 *In vitro*-Modell und Zellkultur von Kardiomyoblasten (H9c2-Zellen)

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der therapeutischen Hypothermie auf die Apoptose in Herzmuskelzellen in einem Zellkulturmodell untersucht. In klinischer Anlehnung an einen HKS oder AMI wurde ein eigens entwickeltes Zeit-Temperatur-Protokoll eingesetzt, um intrazelluläre Prozesse im Rahmen einer Myokardhypoxie und eine anschließende therapeutische Hypothermie zu simulieren (siehe **Abbildung 5**, S. 21). Für

das *in vitro*-Modell wurde eine Zelllinie von Kardiomyoblasten (H9c2-Zellen) ausgewählt, die ursprünglich aus fetalem Rattenmyokard gewonnen worden waren^{28, 29}.

Diese Zellen sind aufgrund einer großen Ähnlichkeit zu fetalen Kardiomyozyten der Ratte als *in vitro*-Modelle des Herzens etabliert^{9, 30-32}.

1.4 Hypoxie

Die Hypoxie ist definiert als ein Zustand von Sauerstoffunterversorgung. Im medizinischen Zusammenhang kann diese den gesamten Körper oder isolierte Körperregionen betreffen. Der Sauerstoffmangel führt zu einer Störung des Zellstoffwechsels, da wichtige zelluläre Stoffwechselprozesse wie die mitochondriale Atmungskette und der Energiehaushalt der Zelle eingeschränkt werden^{33, 34}. Energieaufwändige Abläufe in der Zelle wie Synthese- und Reparaturprozesse können nicht in erforderlichem Maße erfolgen. Das Gleichgewicht an auf- und abbauenden Prozessen, die zelluläre Homöostase, wird gestört und führt in überschwelligem Ausmaß zum Zelltod durch Nekrose oder Apoptose³⁵.

Kobaltchlorid (CoCl_2) ist als Hypoxie-Imitator zur *in vitro*-Simulation hypoxisch-ischämische Bedingungen etabliert, da es die Regulation intrazellulärer Signale im Sinne einer Hypoxie beeinflusst sowie die Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies induziert³⁶⁻⁴¹. Die intrazellulären Signale umfassen das spezifische Protein „Hypoxie induzierbarer Faktor 1 α (HIF-1 α)“ sowie in die Apoptose involvierten Proteine p53, pCNA und p21^{40-42,46-50}.

1.4.1 HIF-1 α

Die Hypoxie beeinflusst und induziert in der Zelle bedeutende Signalwege. Eine spezifische Signalkaskade beinhaltet das HIF-1-Protein. Der durch Hypoxie induzierbare Faktor 1 (HIF-1) ist ein Proteindimer, bestehend aus einer α -Einheit (HIF-1 α , HIF-2 α oder HIF-3 α) und einer β -Einheit (HIF-1 β / ARNT). HIF-1 β wird konstitutiv gebildet und abgebaut, wobei er weder in seiner Menge noch in seiner Aktivität von Hypoxie abhängig ist⁴³. Das Protein HIF-1 α wird ebenfalls konstitutiv gebildet, ist jedoch im Abbau abhängig von Sauerstoff.

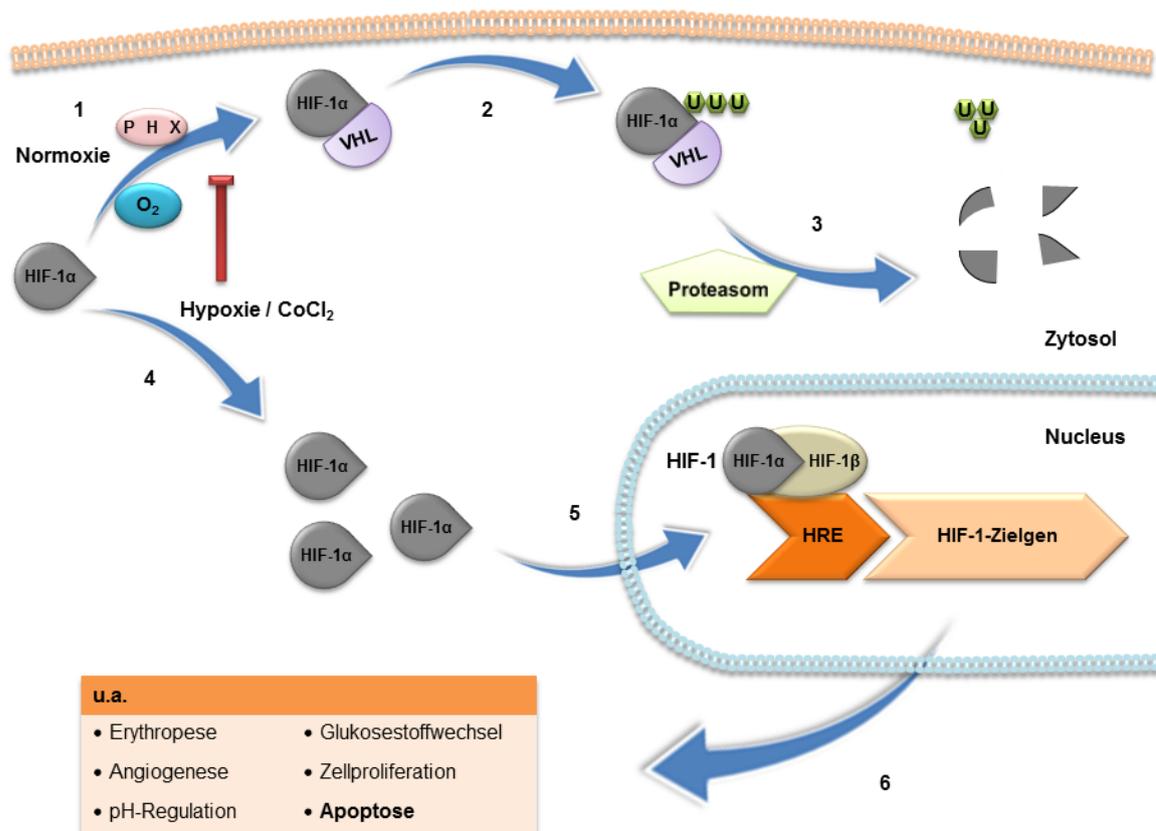


Abbildung 2: Schematische Darstellung des HIF-1 Signalweges.

HIF-1: Hypoxia Inducible Factor-1. HIF-1 α / β : Monomere des HIF-1. PHX: Prolylhydroxylasen. VHL: Von-Hippel-Lindau-Protein. U: Ubiquitin. HRE: High Responsive Elements. Unter Normoxie: Hydroxylierung von HIF-1 α durch PHX (1). Anschließend Bindung an VHL, Ubiquitinierung (2) und Degradierung durch Proteasom (3). Unter Hypoxie: Hemmung der PHX-Aktivität und Akkumulation von HIF-1 α (4). Dimerisierung mit HIF-1 β zu HIF-1 (5) und Aktivierung der HIF-1-Zielgene via High Responsive Elements (6).

In Normoxie wird HIF-1 α unter Sauerstoffverbrauch mithilfe von Eisenionen hydroxyliert, nach Bindung an das von-Hippel-Lindau-Protein (VHL) ubiquitiniert und schließlich durch Proteasomen degradiert⁴⁴ (siehe **Abbildung 2**). Hierbei stehen Synthese und Abbau im Gleichgewicht. Unter Hypoxie hingegen wird der Abbau mangels adäquater Sauerstoffmengen gehemmt, sodass HIF-1 α akkumuliert und vermehrt mit HIF-1 β das Dimer HIF-1 bildet. Eine Mimikry dieser Hypoxiewirkung wurde für CoCl₂ beobachtet^{42, 45, 46}. Der Transkriptionsfaktor HIF-1 bindet nukleär an High Responsive Elements (HRE) von Promotoren und beeinflusst die Expression von über 60 Proteinen^{47, 48}. Diese sind in die Erythropese, Angiogenese, Eisenhomöostase sowie den Glukose- und Energiestoffwechsel involviert⁴⁴, beeinflussen jedoch auch die Zellproliferation und zel-

luläre Überlebenskaskaden⁴³. So wurde nachgewiesen, dass die Stabilisierung des Tumor-Suppressors p53 unter Hypoxie abhängig vom Protein HIF-1 ist^{42, 49-52}. Hierzu ist eine schwere Hypoxie in Kombination mit Reoxygenierung, DNS-Schäden oder Redox-Stress erforderlich⁵³⁻⁵⁵.

Der Tumorsuppressor p53 wird in vitalen Zellen durch das Protein murine double minute 2 (MDM-2) ubiquitiniert und anschließend abgebaut^{56, 57}. Durch mehrere Forschungsgruppen wurde eine hemmende Wirkung des Proteins HIF-1 auf das Protein MDM-2 nachgewiesen, wodurch das Tumorsuppressorprotein p53 indirekt stabilisiert wird⁵⁸⁻⁶⁰.

1.5 Apoptose

Die Apoptose ist eine Form des Zelltodes, im Rahmen derer durch endogene oder exogene Signale eine Kaskade eingeleitet wird, die zum programmierten Zelltod führt⁶¹. Im Gegensatz zur Nekrose wird die Apoptose aktiv von der Zelle ausgeführt, wobei die Proteingruppe der Caspasen (Cysteine-aspartic acid proteases) eine herausragende Rolle spielt⁶². Es werden zwei Signalwege der Apoptose unterschieden: die extrinsische und die intrinsische Apoptose. Die extrinsische Apoptose wird über Oberflächenrezeptoren der Proteine Fas-Ligand (FasL), Tumornekrosefaktor $\alpha 1$ (TNF- $\alpha 1$) und TNF-verwandter Apoptose induzierender Ligand (TRAIL) induziert, welche die Initiator-Caspase 8 aktivieren⁶¹. Die intrinsische Apoptose hingegen wird mitochondrial vermittelt (siehe **Abbildung 3**, S. 8). Dabei gelangen katabole Enzyme durch mitochondriale Apoptose-induzierte Kanäle (MAC) aus der mitochondrialen Matrix in das Zytosol^{63, 64}. Intrinsische und extrinsische Apoptose münden somit in der Aktivierung der sogenannten Effektor-Caspase 3 und im Abbau überlebenswichtiger Zellstrukturen. Im Rahmen der intrinsischen Apoptose ist die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran (PMM) und die Bildung der MAC ausschlaggebend zur Ausschüttung kataboler Enzyme und derer Aktivatoren (v.a. Cytochrom c, Smac/Diablo, AIF)^{63, 65}. Die Bildung von MACs und die Freisetzung von Cytochrom c werden durch die *B-cell-lymphoma-2* (Bcl-2)-Proteinfamilie reguliert⁶⁶ (siehe **Abschnitt 1.5.1**, S. 9). Zytosolisches Cytochrom c aggregiert mit dem *Apoptotic protease activator protein* (APAF-1) und Pro-Caspase 9 zu sogenannten Apoptosomen⁶⁷. Apoptosomen spalten unter ATP-Verbrauch Pro-Caspase 3 zur aktiven Caspase 3. Die gespaltene Caspase 9 kann in ihrer Funktion durch das Protein XIAP (*x-linked inhibitor of apoptosis*) gehemmt werden⁶⁸.

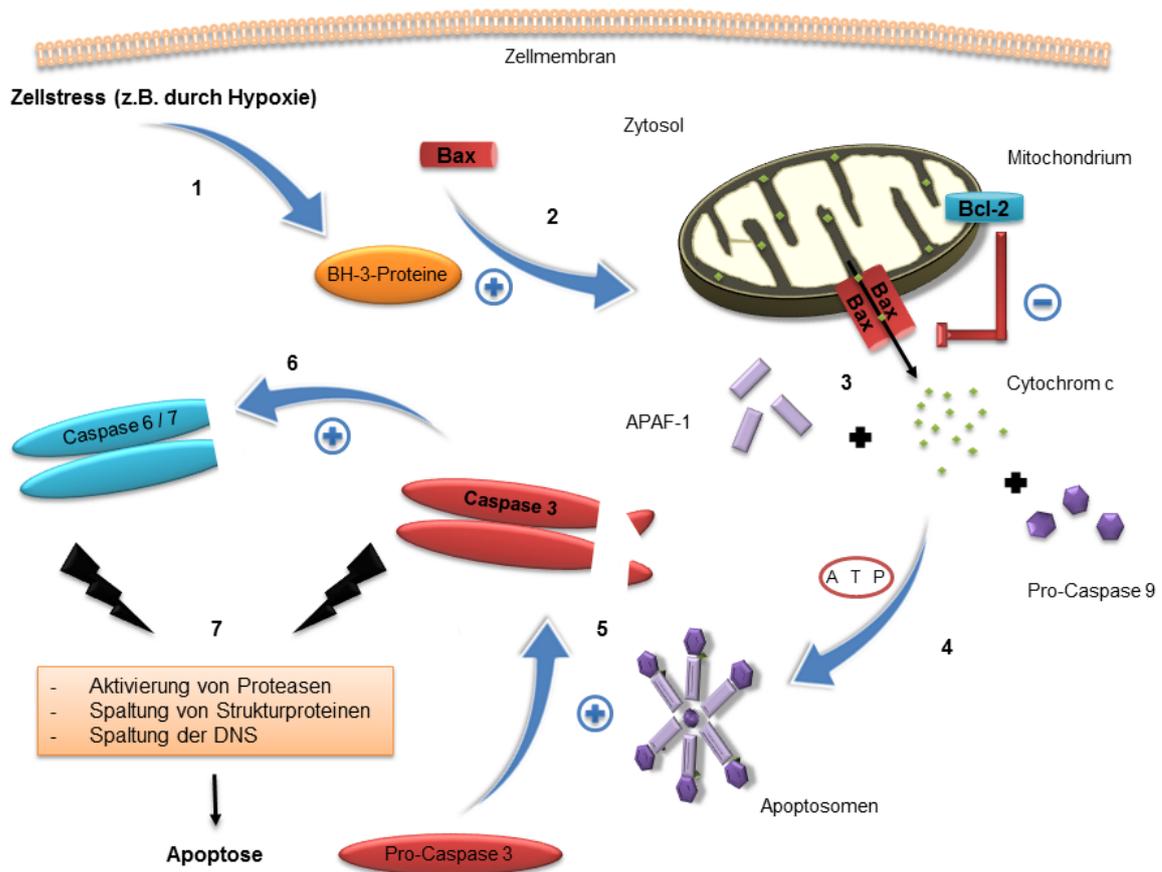


Abbildung 3: Schema der intrinsischen Apoptose

Bax: Bcl-2-associated Protein. **Bcl-2:** B cell lymphoma. **APAF-1:** Apoptotic Protease Activator Protein-1. **ATP:** Adenosintriphosphat. Stressinduzierte Aktivierung von BH-3-Proteinen (1). Verstärkte Translokation und Dimerisierung von Bax an der mitochondrialen Membran (2). Erhöhung der Permeabilität der mitochondrialen Membran durch Porenbildung des Bax (3). Freisetzung von Cytochrom c von der mitochondrialen Matrix in das Zytosol. Energieaufwändige Verbindung von Cytochrom c und APAF-1 zur Bindung und Aktivierung von Pro-Caspase 9. Bildung der Apoptosomen aus Cytochrom c, APAF-1 und Caspase 9 (4). Aktivierung der Effektor-Caspase 3 nach limitierter Proteolyse der Pro-Caspase 3 durch Apoptosomen (5). Aktivierung weiterer Effektor-Caspasen 6/7 durch Caspase 3 (6). Aktivierung von Proteasen und Aufspaltung zelleigener Strukturproteine und des Erbgutes (7).

Neben dem Cytochrom c werden weitere katabole Enzyme aus der mitochondrialen Matrix freigesetzt, zu denen auch SMAC/DIABLO (*second mitochondria derived activator of apoptosis / direct IAP binding protein of low pI*) zählt. Das Protein SMAC/DIABLO ist in der Lage Caspase 9 kompetitiv von der Bindungsstelle des Inhibitors XIAP zu verdrängen und somit die Signalkaskade auszulösen⁶⁸. Die sogenannte Effektor-Caspase 3 aktiviert weitere Effektor-Caspasen (Caspasen 6 und 7) und spaltet gemeinsam mit diesen zelluläre Schlüsselproteine⁶⁹. Dieser Prozess ruft funktionelle und morphologische Veränderungen wie Kernkondensierung, DNS-Abbau und die Präsentation Apoptose-spezifischer Phosphatidylserine an der Zelloberfläche hervor. So haben die

intrinsische und die extrinsische Apoptose eine gemeinsame Endstrecke, obwohl sich die ersten Schritte unterscheiden. Darüber hinaus gibt es jedoch in frühen Phasen der Apoptose eine Verbindung zwischen den beiden Wegen. Denn in einigen Zellen existiert ein Zusammenhang zwischen den Proteinen Caspase 8 (extrinsisch) und Bid (intrinsisch)⁷⁰. Der *BH3-interacting domain death antagonist* (Bid) ist in der Lage die Aktivität des *Bcl-2-associated X protein* (Bax) zu steigern (siehe **Abschnitt 1.5.1**, S. 9). Der Zusammenhang von Hypoxie und Apoptose durch die Beobachtung von Cytochrom c, Caspaseaktivierung und Spaltung des Caspasesubstrates poly(-ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) ist zwar vorbeschrieben⁷¹⁻⁷³, jedoch wurden die erwähnten Schlüsselproteine der intrinsischen Apoptose bisher in keinem vergleichbaren in vitro-Modell näher untersucht.

Die Apoptose hat für das Myokard wie auch für andere Organe einen ambivalenten Wert. Zum einen gewährleistet sie physiologisch eine limitierte Beseitigung defekter und schadhafter Zellen, zum anderen kann sie in zunehmendem Ausmaß die Funktion des betroffenen Organs beeinträchtigen⁷⁴.

1.5.1 Bcl-2-Proteinfamilie

Die Bcl-2-Proteine bilden eine Familie, die funktionell mit der Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran (PMM) assoziiert ist. Durch die Regulation der PMM beeinflussen sie die intrinsische Apoptose maßgeblich^{63, 65}. In dieser Proteinfamilie werden drei Gruppen nach Struktur und Funktion unterschieden (siehe **Abbildung 4**)^{75, 76}. Bax und Bak sind pro-apoptotische Schlüsselenzyme der intrinsischen Apoptose. Sie oligomerisieren an der mitochondrialen Membran, bilden MACs und bewirken die Freisetzung kataboler Enzyme⁷⁷. In Zellen, welche diese Enzyme nicht enthalten, konnte bisher keine intrinsische Apoptoseaktivität nachgewiesen werden⁷⁷. Die anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl-1) sind in der Lage die Bindung und den Prozess des Oligomerisierens pro-apoptotischer Proteine an der mitochondrialen Membran zu unterbinden⁷⁸. Den pro-apoptotischen Proteinen (Bax, Bak) und den anti-apoptotischen Proteinen (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl-1) sind drei Bcl-2-homologe Domänen (BH-Domänen 1-3) gemeinsam (siehe **Abbildung 4**). Von diesen beiden antagonistischen Gruppen der Bcl-2-Proteine unterscheiden sich die sogenannten BH3-Proteine strukturell (Bid, Bim/ Bod, Bad, Bmf, Bik/ Nbk, Blk, Noxa, Puma/Bbc3, Hrk/ DP5): Sie besitzen nur ein kurzes Bcl-2-ähnliches Motiv, die BH3-Domäne⁷⁹. Einige

BH3-Proteine können die Aktivität der anti-apoptotischen Proteine hemmen (*Sensitizer*), andere die der pro-apoptotischen Proteine direkt fördern (Aktivatoren). Daher wirken sie insgesamt pro-apoptotisch⁸⁰.

Anti-apoptotisch

Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1, A1



Pro-apoptotisch

Bax, Bak, Bok



BH3-Gruppe: Bid (keine TM), Bcl-x_s, Bik, Hrk)



Abbildung 4: Die Bcl-2-Proteinfamilie.

Einteilung der Proteine nach ihrem Einfluss auf die intrinsische Apoptose und Strukturdomänen.

1.5.1.1 Bax (*Bcl-2 associated protein*)

Das pro-apoptotische Protein Bax befindet sich in vitalen Zellen vornehmlich im Zytosol und in geringerem Ausmaß an der mitochondrialen Membran. Bei Zellstress oligomerisiert es an der äußeren Mitochondrienmembran. Dies führt zu einer erhöhten Membranpermeabilität und Ausschüttung von Cytochrom c und weiteren katabolen Enzymen in das Zytosol^{63, 65}. Anti-apoptotische Bcl-2-Proteine können die Aktivität von Bax und dessen Translokation an die Membran inhibieren⁸¹. Hypoxie führt zur erhöhten Aktivität von Bax^{82, 83}. Proteine aus der Gruppe der BH3-Proteine beeinflussen die Aktivität von Bax, indem sie dessen Inhibitoren hemmen oder in direkter Interaktion mit Bax eine Oli-

gomerisierung an der mitochondrialen Membran begünstigen^{84, 85}. Der genaue Mechanismus der Permeabilisierung ist nicht geklärt. Ein Modell beschreibt die Bildung von Poren durch Bax oder Bak. Diese Variante stützt sich auf Beobachtungen⁸⁶, die belegen, dass Bax in der Lage ist Poren in Lipiddoppelmembranen zu bilden. Bax ist somit maßgeblich an der Regulation der intrinsischen Apoptose beteiligt.

1.5.1.2 Bcl-2 (B-cell lymphoma-2)

Bcl-2 als namensgebendes Mitglied der Proteinfamilie wirkt anti-apoptotisch. Das Protein ist an der mitochondrialen Membran lokalisiert und entfaltet seine Wirkung entweder durch Hemmung der pro-apoptotischen BH3-Proteine oder durch direkte Hemmung von Bax-Monomeren^{66, 87}. Dadurch senkt Bcl-2 die Permeabilität der äußeren mitochondrialen Membran und die Freisetzung von Cytochrom c sowie weiterer kataboler Proteine in das Zytosol^{78, 88}. Umgekehrt sind jedoch auch einzelne Mitglieder der BH3-Proteine (sogenannte Sensitizer) in der Lage Bcl-2 zu hemmen. So haben Chen et al. die Interaktion der Proteine Bcl-2 und Bad (Bcl-2 Antagonist of cell Death) untersucht⁸⁹. Hierbei stellten sie eine inhibierende Wirkung des Proteins Bad auf das Protein Bcl-2 fest. Darüber hinaus wurde durch Kvanakul et al. belegt, dass auch die Proteine Bim (Bcl-2 *interacting mediator of death*) und PUMA inhibierend auf das Protein Bcl-2 wirken⁹⁰. Der genaue Mechanismus ist jedoch nicht vollständig geklärt. Dabei könnte eine kompetitive Verdrängung anti-apoptotischer Proteine von membranständigen Bax- und Bad (*Bcl-2-associated death promotor*)-Monomeren die Oligomerisierung und Porenbildung ermöglichen⁹¹.

In einer vitalen Zelle herrscht ein Gleichgewicht pro- und anti-apoptotischer Bcl-2-Proteine. Dieses wird durch Noxen wie die Hypoxie beeinflusst, deren Ausmaß darüber entscheiden, ob die Zelle nach der Schädigung überlebt oder den Zelltod erleidet^{61, 83}. Im Zusammenhang von Hypoxie und Apoptose wurde beobachtet, dass Hypoxie zu einer Hochregulation der Proteine Bcl-2 und p53 führt⁹². Eine Reoxygenierung hingegen lässt die Expression von Bcl-2 wieder sinken und die von p53 weiter steigen⁹². Das Protein p53 spielt eine aktive Rolle in der Apoptoseregulation und wirkt unter anderem über die Aktivierung des Bcl-2-Gegenspielers Bax pro-apoptotisch⁹².

Das Verhältnis der Antagonisten Bax und Bcl-2 (Ratio Bax / Bcl-2) kann Aufschluss über das Zellüberleben nach einem apoptotischen Stimulus wie der simulierten Hypoxie

geben⁹³. Die Zunahme zugunsten von Bax führt zu einer erhöhten intrinsischen Apoptoseaktivität, während eine niedrige Ratio auf eine geringere Apoptoseaktivität deutet.

1.5.2 Caspase 3

Caspasen (Cysteine-aspartic acid proteases) sind an der Inflammation und Apoptose beteiligte Enzyme. Eine Unterteilung der apoptotischen Vertreter kann in Initiator- und Effektor-Caspasen erfolgen⁹⁴. Alle Caspasen werden als inaktive Zymogene synthetisiert und werden proteolytisch in aktive Fragmente von ca. 20 kDa und 10 kDa gespalten⁹⁴. Die Initiator-Caspasen (Caspase 2, 8, 9 und 10) aktivieren durch limitierte Proteolyse die Effektor-Caspasen (Caspase 3, 6 und 7)⁹⁴. Diese führen die Apoptose aus, indem sie Kernproteine, Signalproteine und Bestandteile des Zytoskeletts proteolytisch spalten und inaktivieren⁶⁹ (siehe Abbildung 3, S. 8). Dieser Vorgang führt zur Apoptose typischen Morphologie mit Abrundung der Zellform, Blasenbildung in der Zellmembran, Kernkondensation, zum Zerfall des Zellkerns⁹⁵ und zur leiterartigen Aufteilung der DNS in der Elektrophorese. Die Caspase 3 nimmt innerhalb der Effektor-Caspasen funktionell eine Schlüsselposition ein, da sie sowohl die Aktivität der Caspasen 6 und 7 reguliert als auch eine direkte proteolytische Funktion auf für die Zellvitalität wichtigen Proteine hat⁹⁶. Die besondere Rolle der Caspase 3 wird auch bei der Betrachtung ihrer vollen Funktionsfähigkeit in einem breiten pH-Spektrum deutlich, welche sie von den anderen Caspasen unterscheidet⁹⁷. Das Zymogen der Caspase 3, die Pro-Caspase 3 (32 kDa), wird im Rahmen der intrinsischen Apoptose durch Oligomere aus Apoptosomen (siehe **Abbildung 3**, S. 8), in ein 17 kDa und ein 12 kDa großes Fragment gespalten. Letztendlich befinden sich die funktionell wichtigen Reste His-235 und Cys-285 in den 17 kDa-Fragmenten⁹⁷. Jeweils zwei solcher Dimere aggregieren zu einem Heterotetramer, der aktiven Form der Caspase 3⁹⁸. Die aktive Caspase 3 ist in der Lage weitere Effektor-Caspasen (6 und 7) proteolytisch zu aktivieren und im Rahmen des programmierten Zelltods Zellbestandteile zu spalten. So ist die Caspase 3 in allen Zellen unabkömmlich für die apoptotische Chromatin-Kondensation und DNS-Fragmentierung⁹⁶.

Daher wird in der vorliegenden Arbeit das Verhältnis zwischen nicht gespalteener Pro-Caspase 3 und den aktivierten Fragmenten als Indikator für den Aktivierungsgrad und die Apoptoseexekution verwendet.

1.6 Hypothermie und medikamentöse Therapie

In der intensivmedizinischen Versorgung werden sowohl pharmakologische als auch physikalische Methoden zur Stabilisierung des Organismus‘ eingesetzt. Deswegen ist auch der Einfluss pharmakologischer Wirkstoffe auf das Zellüberleben nach Hypoxie im Zusammenspiel mit der milden Hypothermie von Interesse. Zur Untersuchung wurden zwei Wirkstoffe ausgewählt, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

1.6.1 Katecholamintherapie: β -Agonist Isoprenalin

Katecholamine sind in der Klinik ein wichtiger Bestandteil in der Behandlung des akuten Herzversagens⁹⁹. Die Wirkung der Katecholamine wird über Adrenozeptoren vermittelt. Adrenozeptoren sind G-Protein-gekoppelte Oberflächenrezeptoren, die durch die natürlichen Agonisten Adrenalin und Noradrenalin oder strukturähnliche Pharmaka aktiviert werden¹⁰⁰. Die Aktivierung führt zu einem intrazellulären Anstieg von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), welche eine zellspezifische Wirkung zeigt. Die Adrenozeptoren werden aufgrund ihrer Molekularbiologie und Wirkungsweise in α_1 -, α_2 - und β -Rezeptoren unterteilt¹⁰⁰. Eine Subtypisierung der β -Rezeptoren unterscheidet zwischen β_1 -, β_2 - und β_3 -Rezeptoren. Adrenozeptoren zeigen eine unterschiedliche Verteilung in den Organsystemen¹⁰⁰. α_1 -Rezeptoren finden sich vornehmlich in der glatten Muskulatur der Gefäßwände und führen bei Aktivierung zu Vasokonstriktion und Blutdruckanstieg. α_2 -Rezeptoren werden vor allem im vegetativen und zentralen Nervensystem sowie auf Thrombozyten exprimiert. Das Myokard weist eine hohe Dichte an β -Rezeptoren auf. Eine Aktivierung dieser führt zu einer Senkung der Reizschwelle (positive Bathmotropie), Erhöhung der Herzfrequenz (Chronotropie), Kontraktilität (Inotropie), Relaxationsfähigkeit (Lusitropie) und zu einer Beschleunigung der Reizleitung (Dromotropie)¹⁰⁰. Auch auf das Zellüberleben kann die Aktivierung von Adrenozeptoren Einfluss nehmen: *In vivo* und *in vitro* wurde bereits gezeigt, dass β -Agonisten in hohen Konzentrationen Apoptose in Kardiomyozyten auslösen können¹⁰¹. Laut Communal et al. und Zaugg et al. sei dieser Effekt eher durch β_1 -Adrenozeptoren als durch β_2 -Adrenozeptoren zu beobachten gewesen^{101, 102}. Allerdings wird auch von einer Apoptose hemmenden Wirkung durch β -Agonisten, insbesondere durch Isoproterenol, berichtet^{101, 103-105}. Weitere Forschungsgruppen haben diese Beobachtungen bestätigt und

legen darüber hinaus nahe, dass die β_1 -induzierte Apoptose über die intrinsische Signalkaskade vermittelt wird¹⁰². Dabei sei eine pro-apoptische Regulation von Bax und Bcl-2 im Rahmen des adrenerg induzierten Zelltodes zu beobachten gewesen¹⁰².

Vor dem klinischen Hintergrund des Katecholamineinsatzes bei akuter Herzinsuffizienz und der geschilderten Ergebnisse aus der Grundlagenforschung wurde in der vorliegenden Forschungsarbeit der Einfluss des β -Agonisten Isoproterenol ($C_{11}H_{17}NO_3$; IUPAC: 4-[1-hydroxy-2-(propan-2-ylamino)ethyl]benzene-1,2-diol) auf das Überleben Hypoxie geschädigter Kardiomyoblasten untersucht. Darüber hinaus wurde die Wirkung bei gleichzeitiger Applikation von milder Hypothermie analysiert. Isoproterenol wird zur Gruppe der unspezifischen β -Agonisten gezählt und wird *in-vivo* durch Katechol-O-Methyl-Transferase (COMT) innerhalb kurzer Zeit und primär hepatisch abgebaut. Aufgrund einer schlechten Resorption erfolgt die Applikation häufig intravenös. Im klinischen Gebrauch ist der Einsatz mit einer Dosierung von 0,02-0,5 $\mu\text{g}/\text{kg KG} \cdot \text{min}$ etabliert¹⁰⁶.

1.6.2 Sedierung mit Propofol

Unter Hypothermie führt das Muskelzittern des Patienten zur unbeabsichtigten Wärme-freisetzung und einem erhöhten Sauerstoffbedarf. Daher sollten neben der Kühlung stets auch eine Sedierung und Relaxation der Patienten erfolgen^{11, 12}. In der Intensivmedizin deutscher Kliniken ist Propofol neben Midazolam das am häufigsten eingesetzte Sedativum¹⁰⁷.

Propofol ($C_{12}H_{18}O$; IUPAC: 2,6-di(propan-2-yl)phenol) ist ein fettlösliches Narkotikum, dessen Wirkweise bisher nicht vollständig geklärt ist. Diskutiert werden eine unspezifische Wirkung an Lipidmembranen, das Sensitizing an GABA-Rezeptoren oder die Veränderung von Untereinheiten von Natriumkanälen¹⁰⁸. Propofol wird überwiegend hepatisch metabolisiert. Propofol kann zur Narkose von Kindern ab einem Alter von einem Monat eingesetzt werden. Zur langfristigen Sedierung auf Intensivstationen ist Propofol in Deutschland für Kinder ab 16 Jahren zugelassen¹⁰⁹. Die Halbwertszeit ist abhängig von der Applikationsdauer und Verteilung auf das zentrale und periphere langsam äquibrierende sowie schnell äquibrierende Kompartiment¹¹⁰.

In Tiermodellen konnte für Propofol bei oxidativem Stress eine protektive Wirkung auf das Myokard belegt werden^{111, 112}. Wang *et al.* ist in einem Zellkulturmodell mit H9c2-

Zellen der Nachweis gelungen, dass die prophylaktische Applikation von Propofol durch Überexpression von Bcl-2 die H9c2-Zellen vor oxidativem Stress schützt¹¹³.

Bei einer zellprotektiven Wirkung von Propofol könnte dessen Einsatz ein weiterer Faktor sein, der zur Kardioprotektion und hämodynamischen Stabilisierung nach hypoxischem Schaden beiträgt. Daher wurde auch die Wirkung von Propofol auf das Überleben hypoxiegeschädigter Kardiomyoblasten im Rahmen dieser Arbeit analysiert. Darüber hinaus ist die Wirkung bei gleichzeitiger Applikation von therapeutischer Hypothermie ein Untersuchungsgegenstand.

1.7 Zielsetzung

Hypothermie ist ein etabliertes Verfahren in der aktuellen Medizin mit einer breiten klinischen Anwendung: In der Neonatologie, im kardiochirurgischen Bypass-Verfahren und nach Herzkreislaufstillstand wird die Hypothermie zur Neuroprotektion eingesetzt^{13, 24, 25}. Neben dem ZNS ist das Herz ein weiteres Hypoxie sensibles Organ⁴. Nach einem hypoxischen Schaden des Myokards treten strukturelle und funktionelle Schäden auf, die eine Aufrechterhaltung des Kreislaufes gefährden können⁵. Durch die therapeutische Hypothermie könnte das Herz nach einer Hypoxie von ähnlichen protektiven Mechanismen profitieren wie das ZNS¹⁵. Die Optimierung der Myokard- und Kreislauffunktion nach einem Herzkreislaufstillstand könnte eine Möglichkeit darstellen, die Mortalität zu senken und die Lebensqualität überlebender Patienten zu steigern. Der Fortschritt in der Kardioprotektion durch das Erschließen und Etablieren klinisch praktikabler Methoden stützt sich auf Ergebnisse der Grundlagenforschung. *In vitro*-Modelle helfen durch die Untersuchung grundlegender zellulärer Mechanismen bei der Annäherung an klinische Fragestellungen. Aufgrund einer einfachen Umsetzbarkeit und dem geringeren Ausmaß an Nebenwirkungen ist die Anwendung einer milden Hypothermie (34°C) weiter etabliert als eine darüber hinausgehende Kühlung (siehe **Abschnitt 1.2**, S. 2). Die vorliegende Arbeit untersucht in Grundzügen den Einfluss der milden, therapeutischen Hypothermie auf hypoxisch geschädigtes Myokard. Das eigens hierzu entwickelte Zellkulturmodell mit Kardiomyoblasten (H9c2-Zellen) simuliert eine Hypoxie und die anschließende Kühlungsphase. Anhand des *in vitro*-Modells werden die folgenden Aspekte untersucht:

1. Kann milde Hypothermie (34°C) das Überleben von H9c2-Zellen nach imitierter Hypoxie beeinflussen?
2. Ist die intrinsische Apoptose bei einer simulierten hypoxischen Schädigung von H9c2-Zellen involviert?
3. Hat milde Hypothermie einen Einfluss auf die intrinsische Apoptose?
4. Haben Propofol oder Isoprenalin einen Einfluss auf das Überleben von H9c2-Zellen nach simulierter Hypoxie?
5. Hat die Kombination von Propofol oder Isoprenalin mit Hypothermie einen Einfluss auf das Überleben von H9c2-Zellen nach simulierter Hypoxie?

2 Materialien

2.1 Geräte

Bio-Fuge primo / fresco (Zentrifugen)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Brutschrank (34°C), CO2-Incubator 55	mytron, Heiligenstadt, Deutschland
Brutschrank (37°C)	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
ChemiDoc XRS™	Bio-Rad, München, Deutschland
Elektrophorese- / Blotting-Netzteil	Biometra, Göttingen, Deutschland
Elektrophoresekammer	Bio-Rad, München, Deutschland
Fluoreszenz-Eindeckmittel	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Fluoreszenzmikroskop Axio Imager. M1 + AxioCam mRC	Zeiss, Jena, Deutschland
Magnetrührer	Roth, München, Deutschland
Multiskan Reader Ascent	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Phasenkontrastmikroskop Axiovert 40 CFL + uEye USB-Kamera	Zeiss, Jena, Deutschland IDS, Obersulm, Deutschland
Schüttler Promax	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Sicherheitswerkbank LaminAir	Heraeus, Hanau, Deutschland
Tank-Blot-System	Bio-Rad, München, Deutschland
Thermoblock	Biometra, Göttingen, Deutschland
Tiefkühlschrank (-80°C)	FRYKO, Esslingen, Deutschland
Wasserbad WB 10	Memmert, Schwabach, Deutschland

2.2 Chemikalien

Acrylamid [30%]	Roth, München, Deutschland
APS-Lösung	Serva, Heidelberg, Deutschland
BCA-Reagenz	Pierce, Rockford, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Cobaltchlorid (CoCl₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
ECL-Detektionskit	Pierce, Rockford, USA
Ethanol [99%]	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Glycin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
HCl [37%]	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Methanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
MTT-Reagenz	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Paraformaldehyd [4%] in PBS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PMSF	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ponceau-Färbelösung	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Proteinlysispuffer	Ansatz siehe Abschnitt 3.7.2, S. 31
SDS	Roth, München, Deutschland
Stripping-Puffer	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Roth, München, Deutschland
TRIS	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Trypanblau	Biochrom, Berlin, Deutschland
Tween 20	Roth, München, Deutschland

2.3 Zellkultur

24-Well-Platten	TPP, Trasadingen, Schweiz
96-Well Platten	TPP, Trasadingen, Schweiz
DMEM 10x	Biochrom, Berlin, Deutschland
Eppendorfgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FCS	Biochrom, Berlin, Deutschland
Gelatine	Biochrom, Berlin, Deutschland
HEPES	Biochrom, Berlin, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Biochrom, Berlin, Deutschland
Natriumpyruvat	Biochrom, Berlin, Deutschland
PBS	Biochrom, Berlin, Deutschland
Penicillin / Streptomycin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Trypsin / EDTA	Biochrom, Berlin, Deutschland
Zellkulturflaschen 150 cm²	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturröhrchen 15 ml + 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschalen 150 cm²	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschalen 22 cm²	TPP, Trasadingen, Schweiz

2.4 Proteine, Antikörper und Medikamente

Anti – HIF-1α – Antikörper	abcam, Cambridge, Großbritannien
Anti – Bax – Antikörper	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti – Bcl-2 – Antikörper	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti – Caspase 3 – Antikörper	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti – Rabbit-IgG – Antikörper	Jackson laboratory, Bar Harbor, USA
Anti – Cytokeratin 18 – Antikörper (M30 CytoDEATH)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Anti – β-Aktin – Antikörper	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
DAPI	Pierce, Rockford, USA
Page Ruler / plus Protein-Marker	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Isoprenalinhydrochlorid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Propopfol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

2.5 Software

Adobe Illustrator (Abbildungen)	Adobe Systems, San Jose, USA
Excel (Datenerhebung)	Microsoft, Redmond, USA
ImageLabTM-Software (Densitometrie)	Bio-Rad, München, Deutschland
PowerPoint (Abbildungen)	Microsoft, Redmond, USA
Prism-Software (Auswertung & Statistik)	GraphPad Software, La Jolla, USA
Quantity One (Proteindetektion)	Bio-Rad, München, Deutschland
uEye – Software (Phasenkontrastbilder)	IDS, Obersulm, Deutschland

3 Methoden

3.1 Zeit-Temperatur-Protokoll des *in vitro*-Modells

Das *in vitro*-Modell vereint die zentrale Frage nach möglichen protektiven Effekten einer milden Hypothermie für das Myokard mit Aspekten der klinischen Anwendung nach einem Hypoxieschaden. Zur Simulation der Hypoxie fand Kobaltchlorid (CoCl_2) Anwendung, welches sowohl *in-vivo* als auch *in vitro* ein etablierter chemischer Imitator der Hypoxie ist³⁶⁻³⁹. H9c2-Zellen (Kardiomyoblasten) wurden einem imitierten hypoxischen Reiz ausgesetzt und anschließend für 24 bis 48 Stunden einer therapeutischen Hypothermie (34°C) zugeführt (siehe **Abbildung 5**). Die Inkubation der H9c2-Zellen erfolgte unter kontrollierten Bedingungen bei 5% CO_2 Luftanteil, 95% Luftfeuchtigkeit und 37°C (Normothermie). Die Hypothermie-Behandlung bestand in einer Kühlung auf 34°C .

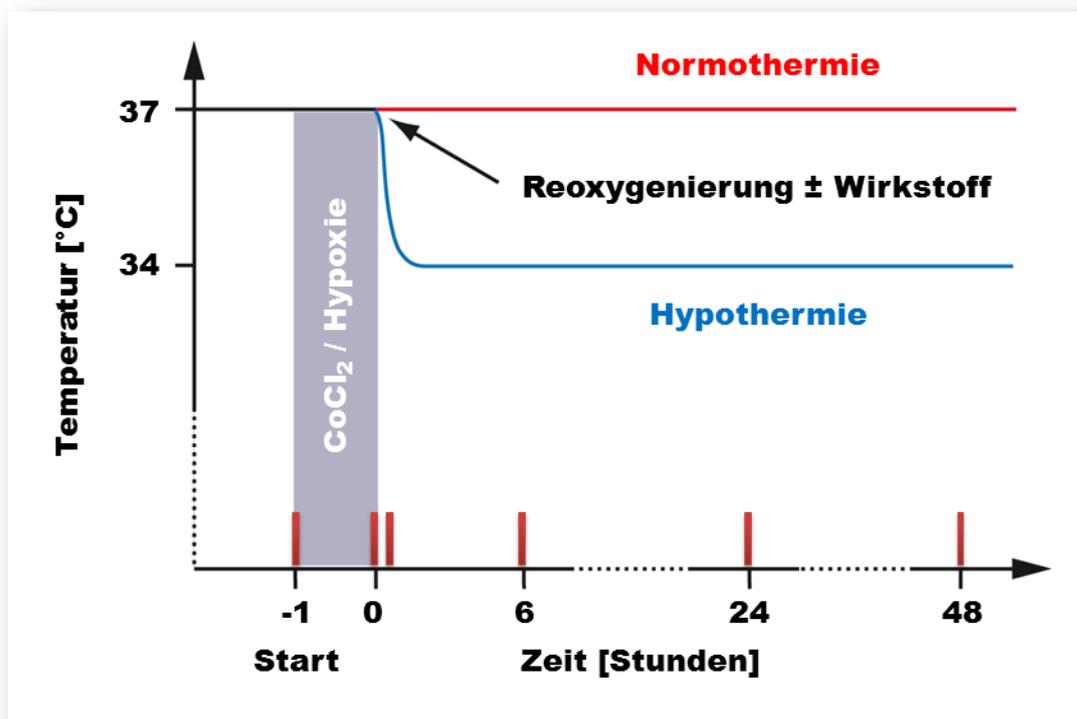


Abbildung 5: Zeit-Temperatur-Protokoll des *in vitro*-Modells.

Simulation einer einstündigen Hypoxie mit CoCl_2 . Anschließende Reoxygenierung durch Mediumwechsel und Kühlung der Proben auf 34°C . Normotherme Kontrollen bei 37° . Optionale Applikation eines pharmakologischen Wirkstoffes bei Reoxygenierung. Untersuchung abhängig von der Methode und Fragestellung zu unterschiedlichen Zeitpunkten bis 48 Stunden nach der CoCl_2 -Behandlung (rote Striche).

Durch den Zusatz von CoCl_2 zum Medium wurde für eine Stunde ein hypoxischer Reiz bei 37°C imitiert. Neben den CoCl_2 -behandelten H9c2-Zellen wurden als Kontrollen stets Zellen mit Normalmedium (= mock) mitgeführt. Nach der Hypoxiephase wurde entsprechend einer Reoxygenierung das Hypoxiemedium durch CoCl_2 -freies Medium ersetzt und für bis zu 48 Stunden belassen. Das „Reperusionsmedium“ bestand aus Normalmedium oder enthielt zusätzlich einen Wirkstoff (Isoprenalin/Propofol).

Die H9c2-Zellen wurden je nach Methode zu folgenden Zeiten untersucht: vor der CoCl_2 -Behandlung (Start), direkt nach simulierter Hypoxie (Start + 60 Minuten), 15 Minuten nach Hypoxie (Start + 75 Minuten), sechs Stunden nach Hypoxie (Start + sieben Stunden), 24 Stunden nach Hypoxie (Start + 25 Stunden) und 48 Stunden nach Hypoxie (Start + 49 Stunden).

3.2 Zellkultur und -pflege

H9c2-Zellen sind eine subklonale Zelllinie von Kardiomyoblasten (BD1X), welche ursprünglich aus fetalem Rattenmyokard gewonnen wurden^{28, 29}. Die verwendeten Zellen wurden von ATCC erworben. Trotz der Eigenschaft einer Zelllinie und kleiner Unterschiede zu primären Zellen weisen H9c2-Zellen wichtige Übereinstimmungen mit Kardiomyozyten auf: Wang et al. konnten herzspezifische K^+ -Kanäle nachweisen und Tsiani et al. haben für die zelluläre Membran von H9c2-Zellen herzspezifische Eigenschaften im Glukosetransport belegt^{114, 115}. Der Einsatz von H9c2-Zellen ist für in vitro-Modelle des Myokards eine etablierte Anwendung in der Grundlagenforschung.

Die Zelleigenschaften werden durch die Anzahl der vorhergehenden Generationen und die Kultivierungsmethoden beeinflusst. Die Abwandlung der zellulären Eigenschaften kann eine valide Untersuchung und den Vergleich unterschiedlicher Proben beeinflussen. Daher wurden für die Versuche der vorliegenden Arbeit maximal Zellpassagen bis zur 12-15. Subkultivierung genutzt. Außerdem kann eine wiederholte Kultivierung bis zur vollständigen Konfluenz des Zellrasens die Veränderung der Zelleigenschaften beschleunigen. Um diesen Prozess zu verzögern wurde die Subkultivierung der H9c2-Zellen bereits bei 70-90% Konfluenz mit einer Ratio von 1:4 durchgeführt. Die Subkulturen für Versuche wurden bei einer Dichte des Zellrasens von 80-100% geerntet und ausplattiert. Auf die verwendete Zellzahl wird im Rahmen der Erläuterung der einzelnen

Methoden eingegangen. Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer (siehe **Abschnitt 3.6**, S. 28)

Die Kultivierung der H9c2-Zellen und die Versuche erfolgten in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) unter Zusatz von FCS (10%), L-Glutamin (4 mM), Natriumhydrogencarbonat (1,5 g/l), HEPES (10 mM), Natriumpyruvat (1 mM), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml). 24 Stunden nach dem schonenden Auftauen neuer Cryokulturen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um das im Cryomedium enthaltene zytotoxische Dimethylsulfoxid zu entfernen.

Soweit nicht anders beschrieben, wurden die H9c2-Zellen zum Passagieren, Ausplattieren und Auszählen mit Trypsin + EDTA von den Zellkulturflaschen und -schalen gelöst. Dieser Prozess wurde anschließend durch den Zusatz von Medium zeitgerecht beendet. Für alle Ergebnisse der quantitativen Analysen wurden Zellen aus mindestens drei unterschiedlichen Passagen untersucht.

3.3 Morphologische Untersuchung nach der CoCl₂-Behandlung am Phasenkontrastmikroskop

In Anlehnung an die klinische Behandlung eines hypoxischen Myokardschadens sollte auch die Hypoxie im *in vitro*-Modell der induzierten Hypothermie zeitlich vorausgehen. Die einstündige Behandlung der H9c2-Zellen mit CoCl₂ musste gleichzeitig einen starken hypoxischen Stimulus und eine ausreichende Zahl überlebender Zellen gewährleisten. Die bisherige Datenlage beschreibt für Zellkulturen lange Behandlungszeiten mit niedrigen CoCl₂-Konzentrationen^{36, 116, 117}. Zur Ermittlung einer adäquaten CoCl₂-Konzentration im *in vitro*-Modell wurden die Zellmorphologie und das Zellüberleben der H9c2-Zellen für unterschiedliche CoCl₂-Konzentrationen (0 – 200 mM) untersucht (siehe **Abschnitt 4.2**, S. 36).

Mithilfe der Phasenkontrastmikroskopie konnte der Einfluss von Hypothermie und CoCl₂ auf die Morphologie von H9c2-Zellen untersucht werden. Die Methode ermöglicht die Darstellung vitaler Zellen und Gewebe durch Unterschiede im Lichtbrechungsindex.

Die H9c2-Zellen wurden mit einer Zellzahl von 2×10^5 / ml in einem Endvolumen von 3 ml auf Zellkulturschalen ($A = 22 \text{ cm}^2$) ausplattiert und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurde eine Hypoxie unterschiedlichen Ausmaßes simuliert, indem H9c2-Zellen für eine Stunde mit 0, 1, 10, 30, 50 und 200 mM CoCl₂ behandelt wurden. Nach der CoCl₂-Behandlung erfolgte zur Simulation einer Reoxygenierung ein Mediumwechsel. Daraufhin wurden die H9c2-Zellen für weitere 24 Stunden bei Normothermie (37°C) inkubiert. Nach sechs und 24 Stunden wurden die Proben hinsichtlich Morphologie und Zellvitalität untersucht. Die Untersuchung der Morphologie wurde am Phasenkontrastmikroskop und die Dokumentation mit der uEye-Software durchgeführt. Die Zellvitalität wurde mit der Trypanblau-Färbung untersucht (siehe **Abschnitt 3.6**, S. 28).

3.4 Enzymatische Zellaktivität im MTT-Test

Der MTT-Test ermöglicht die Untersuchung der mitochondrialen Atmungskette und Glykolyserate von Zellen¹¹⁸. Der Test beruht auf der Reduktion von MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromid) zu blau-violetten Formazankristallen auf zwei Wegen: zum einen durch die mitochondriale Succinat-Dehydrogenase, zum anderen - und in größerem Umfang - durch NADH und NADPH¹¹⁸. Die Absorption wird als absoluter Wert gemessen und lässt keine Differenzierung zwischen Zellzahl oder Stoffwechselaktivität zu. Daher sollten die Ergebnisse des MTT-Tests stets im Kontext der Ergebnisse weiterer Methoden zur quantitativen Analyse herangezogen werden, welche einen qualitativen Hinweis auf die Zellproliferation oder –aktivität liefern. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der MTT-Test in Vorversuchen zur Untersuchung der Zytotoxizität des CoCl₂, Propofols, und Isoprenalins eingesetzt. Die ergänzende Untersuchung der Zellzahl mit der Trypanblaufärbung ermöglichte jeweils in der MTT-Auswertung die Differenzierung zwischen Zellaktivität und –überleben.

Die H9c2-Zellen wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn in einer Konzentration von 1×10^5 / ml in einem Endvolumen von 200 µl im 96-Well-Format bei 37°C ausgesät. Die anschließende zu untersuchende Behandlung richtete sich nach der Fragestellung und wird in den jeweiligen Abschnitten beschrieben. Zum Untersuchungszeitpunkt wurde das Medium durch MTT-Reagenz (1:10 gelöst in Medium) ersetzt und die Proben für zwei Stunden bei 37°C inkubiert, nach denen dann der MTT-Überstand verworfen wurde. Zur Freisetzung und Homogenisierung der intrazellulär entstandenen Formazankristalle erfolgte eine Inkubation mit 100 µl MTT-Lysispuffer auf dem Schüttler für 20 Minuten lichtgeschützt und bei Raumtemperatur. Die Menge des Formazans wurde dann

fotometrisch mit dem Multiskan Reader Ascent bei einer Wellenlänge von 570 nm in einer Fünffachbestimmung ermittelt. Die Mittelwerte jeder Probe wurden in Relation zum Mittelwert mock-behandelter Kontrollen (=100%) gesetzt:

$$\text{Zellaktivität} = \frac{\text{Absorption Probe}}{\text{Absorption mock}} \times 100.$$

3.5 Immunzytochemische Fluoreszenzmikroskopie

3.5.1 Untersuchung des Hypoxie-spezifischen Proteins HIF-1 α

Hypoxia Inducible Factor-1 α (HIF-1 α) ist ein charakteristisches Protein in der Signalkaskade der Hypoxie¹¹⁹⁻¹²¹ (siehe **Abschnitt 1.4.1**, S. 5). Sowohl unter physikalischer als auch unter chemisch induzierter Hypoxie akkumuliert HIF-1 α (**Abbildung 2**, S. 6). Des Weiteren wurde beim Einsatz von CoCl₂ in neuronalen Zellen auch eine Aktivierung der FAS induzierten, extrinsischen Apoptose beschrieben¹²². Der Einsatz von CoCl₂ ist für die hier verwendete Konzentration und Behandlungszeit nicht in der Literatur zu Zellkulturen vorbeschrieben. Daher war der Nachweis einer Aktivierung spezifischer hypoxischer Signalmoleküle obligat für die Legitimation des *in vitro*-Modells als Hypoxiemodell. Die Regulation des Proteins HIF-1 wurde im Rahmen dieser Arbeit anhand einer immunzytochemischen Färbung qualitativ untersucht. Dazu wurde die Untereinheit HIF-1 α markiert, die unter Normoxie degradiert wird, unter Hypoxie akkumuliert und mit HIF-1 β das Dimer HIF-1 bildet (**Abbildung 2**, S. 6). Zur besseren Beurteilung wurde die DNS der Zellen mit DAPI [4',6-diamidino-2-phenylindole] kenntlich gemacht. Die Auswertung erfolgte mit Fotodokumentation am Immunfluoreszenzmikroskop (siehe **Abschnitt 4.4**, S. 41).

H9c2-Zellen wurden mit einer Zellzahl von 2 x 10⁴/ ml bei einem Endvolumen von 1 ml auf Glasplättchen in 24-Well-Platten für 24 Stunden bei 37°C kultiviert. Jeweils ein Glasplättchen stellte eine Probe dar. Die Proben wurden gemäß des Versuchsprotokolls für eine Stunde mit 30 mM CoCl₂ behandelt und anschließend bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert. Zu den Zeitpunkten null und 48 Stunden nach CoCl₂-Behandlung erfolgte die Fixierung der Proben bei Raumtemperatur durch einmaliges Waschen in PBS und Inkubation mit 4% Paraformaldehyd (pH 7,4) für 15 Minuten. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurde die Zellmembran mit 0,25% Triton X-100 für

10 Minuten permeabilisiert und die Proben erneut dreimalig mit PBS gewaschen. Unspezifische Antigene wurden anschließend durch die Inkubation mit 1% BSA in PBST für 30 Minuten blockiert. Danach wurden die Präparate über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper gegen HIF-1 α inkubiert (1:1000). Am nächsten Tag erfolgte die Inkubation mit dem Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI durchgeführt. Zuletzt wurden die Glasplättchen mit den Proben auf Glasobjektträger transferiert und mit DAKO-Abdecklösung versiegelt. Nach 24-stündigem Trocknen wurden die Präparate am Fluoreszenzmikroskop Axio Imager M.1 untersucht und mit der Software AxioVision 4.6 dokumentiert.

3.5.2 Zellschädigung in der Propidiumjodidfärbung

Propidiumjodid (PI) ist ein Membran-impermeabler Fluoreszenzfarbstoff. Bei Zellschädigung ist es in der Lage durch Bindung der Basen in RNS und DNS zu interkalieren¹²³. Die Färbung mit PI ist somit eine Möglichkeit die Integrität der Zellmembran zu untersuchen. Für eine bessere Beurteilung wurde die DNS der H9c2-Zellen mit DAPI [4',6-diamidino-2-phenylindole] markiert. Eine Auswertung mittels Fotodokumentation erfolgte am Immunfluoreszenzmikroskop (siehe **Abschnitt 4.3**, S. 39).

H9c2-Zellen wurden mit einer Zellzahl von 2×10^4 / ml bei einem Endvolumen von 1 ml auf Glasplättchen in 24-Well-Platten für 24 Stunden bei 37°C kultiviert. Jedes Glasplättchen stellte eine eigene Probe dar. Die Zellen wurden gemäß des Versuchsprotokolls für eine Stunde mit 30 mM CoCl₂ behandelt und anschließend mit Normalmedium inkubiert. 24 Stunden nach CoCl₂-Behandlung erfolgte die Fixierung der Proben bei Raumtemperatur durch einmaliges Waschen in PBS und Inkubation mit 4% Paraformaldehyd (pH 7,4) für 15 Minuten. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die H9c2-Zellen bei Raumtemperatur für fünf Minuten mit PI (0,3 μ g/ml PBS) inkubiert. Nach einmaligem Waschen in PBS wurde die Zellmembran mit 0,25% Triton X-100 für 10 Minuten permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde die Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (1 μ g/ ml PBS) durchgeführt und ein weiteres Mal mit PBS gewaschen. Zuletzt fand der Transfer der Proben auf Glasobjektträger statt, welche mit DAKO-Abdecklösung versiegelt wurden.

24 Stunden nach dem Transfer wurden die Präparate am Fluoreszenzmikroskop Axio Imager M.1 untersucht und mit der Software AxioVision 4.6 dokumentiert.

3.5.3 Apoptoseexekution anhand des gespaltenen Cytokeratin 18

Cytokeratin 18 ist ein Caspasesubstrat, das im Rahmen der Apoptose gespalten wird. Die Spaltprodukte treten ausschließlich im Rahmen der Apoptose auf und sind somit ein Indikator für die Aktivität der Effektor-Caspasen (Kapitel 1.5: Apoptose). Der Antikörper M30 CytoDEATH bindet spezifisch an gespaltene Fragmente von Keratin 18¹²⁴. Zur Untersuchung der Caspase-Aktivität wurden H9c2-Zellen direkt und 48 Stunden nach CoCl₂-Behandlung fixiert und auf eine Spaltung des Cytokeratin 18 untersucht. Zur differenzierten Beurteilung wurden Teile des Zytoskeletts mit f-Aktin und die DNS mit DAPI markiert. Eine Auswertung mittels Fotodokumentation erfolgte am Immunfluoreszenzmikroskop (siehe 4.7, S. 48).

H9c2-Zellen wurden mit einer Zellzahl von 2×10^4 / ml in einem Endvolumen von 1 ml auf Glasplättchen in 24-Well-Platten für 24 Stunden bei 37°C kultiviert. Jedes Glasplättchen stellte eine eigene Probe dar. Die Zellen wurden gemäß des Versuchsprotokolls für eine Stunde mit 30 mM CoCl₂ behandelt und mit unterschiedlichen Temperaturen inkubiert. Zu den Zeitpunkten null und 48 Stunden nach CoCl₂-Behandlung fand die Fixierung der Proben bei Raumtemperatur durch einmaliges Waschen in PBS und Inkubation mit 4% Paraformaldehyd (pH 7,4) für 15 Minuten statt. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurde die Zellmembran mit 0,25% Triton X-100 für 10 Minuten permeabilisiert und erneut dreimalig mit PBS gewaschen. Unspezifische Antigene wurden durch die Inkubation mit 1% BSA in PBST für 30 Minuten blockiert. Anschließend wurden die Präparate im Dunkeln mit dem Primärantikörper M30 CytoDEATH inkubiert (1:200 in PBS + 1% BSA). Nach dreimaligem Waschen in PBS + 1% BSA erfolgte die Inkubation mit dem Antikörper gegen f-Aktin (1:400 in PBS + 1% BSA). Nach erneutem, dreimaligem Waschen in PBS wurden die Proben mit dem Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper für eine Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde die Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (1µg/ml PBS) durchgeführt. Zuletzt fand der Transfer der Glasplättchen mit den Proben auf Glasobjektträger statt, welche dann mit DAKO-Abdecklösung versiegelt wurden.

24 Stunden nach dem Transfer wurden die Präparate am Fluoreszenzmikroskop Axio Imager M.1 untersucht und mit der Software AxioVision dokumentiert.

3.6 Zellüberleben in der Trypanblaufärbung

Die quantitative Untersuchung des Zellüberlebens ist mit der Trypanblaufärbung erfolgt. Die Trypanblaufärbung ist eine Lebendfärbung und dient der Differenzierung vitaler und geschädigter Zellen¹²⁵. Die Methode beruht auf der Undurchlässigkeit integrier Zellmembranen für den Farbstoff Trypanblau. Bei einer Zellschädigung steigen sowohl die Permeabilität der Zellmembran als auch die intrazelluläre Farbstoffmenge, wodurch die Zelle sich dunkelblau färbt. Durch die farbstofffreie Erscheinung vitaler Zellen ist eine quantitative Auswertung des Zellüberlebens möglich. Die Färbung erlaubt jedoch keine Differenzierung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen. Zur weitergehenden Beurteilung diesbezüglich ist daher die Untersuchung intrazellulärer Signalwege notwendig.

Die H9c2-Zellen wurden mit einer Zellzahl von 2×10^5 / ml bei einem Endvolumen von 3 ml auf Zellkulturschalen (22 cm^2) ausplattiert und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden die H9c2-Zellen abhängig von der Fragestellung behandelt (siehe **Abschnitte 3.6.1 - 3.6.4**, S. 29 - 30).

Zum Untersuchungszeitpunkt wurde der Überstand abgenommen und in ein Röhrchen überführt, um auch nicht adhärente vitale Zellen zu erfassen. Der Zellrasen am Boden der Kulturschalen wurde mit 2 ml PBS gewaschen und durch die Behandlung mit 2,5 ml Trypsin/ EDTA für 5 Minuten bei 37°C von den Zellkulturschalen gelöst. Der enzymatische Prozess wurde dann mit 5 ml Medium unterbrochen, woraufhin die nunmehr gelösten Zellen ebenfalls in das erwähnte Röhrchen überführt und für fünf Minuten bei 1.200 U/ min zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde dann verworfen und das verbliebene Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert. Gleiche Volumina der Zellsuspension und des verdünnten Farbstoffes ($100 \mu\text{l} + 100 \mu\text{l} \rightarrow$ Verdünnungsfaktor 0,5) wurden gemischt und in acht Gesichtsfeldern einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Aus dem Mittelwert konnte die Zellzahl bestimmt werden:

$$\text{Zellzahl} = \text{gezählte Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 \times \text{Zellsuspension [ml]}.$$

Das Zellüberleben wurde ermittelt, indem die zu untersuchende Probe in Relation zu mock-behandelter Zellen (37°C) gesetzt wurde:

$$\text{Zellüberleben [\%]} = \frac{\text{Zellzahl CoCl}_2\text{-behandelter Zellen (37°C oder 34°C)}}{\text{Zellzahl mock-behandelter Zellen (37°C)}}$$

3.6.1 Einfluss der Hypothermie auf das Zellüberleben mock-behandelter H9c2-Zellen

Der Einfluss der Hypothermie auf das Zellüberleben sollte zunächst ohne CoCl₂-Behandlung analysiert werden. Dazu wurden H9c2-Zellen ausschließlich mit Normalmedium (mock) für bis zu 24 Stunden unter Hypothermie (34°C) inkubiert.

Die Untersuchung der Proben erfolgte wie unter 3.6 beschrieben für die Zeitpunkte sechs und 24 Stunden nach Induktion der Hypothermie (siehe **Abschnitt 4.1**, S. 36).

3.6.2 Einfluss der Behandlung mit unterschiedlichen CoCl₂-Konzentrationen auf H9c2-Zellen

Zur Ermittlung einer Arbeitskonzentration für CoCl₂ erfolgte nach der Behandlung mit 1, 10, 30, 50 und 200 mM CoCl₂ neben der morphologischen Untersuchung eine quantitative Analyse der Zellvitalität. Diese wurde zunächst ohne den Einfluss der Hypothermie untersucht. Dazu wurden H9c2-Zellen gemäß dem Versuchsprotokoll mit den angegebenen CoCl₂-Konzentrationen behandelt und anschließend ausschließlich unter Normothermie inkubiert. 24 Stunden nach der simulierten Hypoxie erfolgte gemäß **Abschnitt 3.6** eine Analyse des Zellüberlebens (siehe **Abschnitt 4.2**, S. 36).

Wie im Abschnitt 4.2 näher erläutert wird, wurde die Arbeitskonzentration für CoCl₂ nach der Analyse der Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen in den darauffolgenden Versuchen auf 30 mM festgelegt.

3.6.3 Einfluss der Hypothermie auf das Zellüberleben CoCl₂-behandelter H9c2-Zellen

Ein Kernaspekt der Untersuchungen dieser Arbeit ist die Wirkung milder Hypothermie auf das Überleben von H9c2-Zellen nach einer simulierten Hypoxie.

Hierzu wurden H9c2-Zellen gemäß dem Zeit-Temperatur-Protokoll unmittelbar nach Behandlung mit 30 mM CoCl₂ für bis zu 24 Stunden unter Normothermie (37°C) und Hypothermie (34°C) inkubiert.

Die Untersuchung der Proben erfolgte wie unter 3.6 beschrieben für die Zeitpunkte sechs und 24 Stunden nach der CoCl₂-Behandlung (siehe **Abschnitt 4.3, S. 39**).

3.6.4 Einfluss von Propofol und Isoprenalin auf CoCl₂-behandelte H9c2-Zellen

Für die Untersuchung möglicher pharmakologischer Einflüsse auf das Zellüberleben nach einer simulierten Hypoxie des Myokards wurden zwei unterschiedliche Wirkstoffe ausgewählt. Propofol und Isoprenalin sind aufgrund ihres intensivmedizinischen Einsatzes oder vorbeschriebener Effekte auf die Zellvitalität von Interesse (Kapitel 1.6). Die Wirkung von Propofol und Isoprenalin auf das Zellüberleben von H9c2-Zellen wurde jeweils für den Zeitpunkt 24 Stunden nach der CoCl₂-Behandlung unter Normothermie und Hypothermie untersucht.

Hierzu wurden dem Medium nach der CoCl₂-Behandlung unterschiedliche Konzentrationen an Propofol [50, 100 und 500 µM] oder Isoprenalin [10 µM] zugesetzt. Nach 24-stündiger Inkubation erfolgte die Untersuchung der Zellvitalität (siehe **Abschnitte 4.8 und 4.9, S. 50 und 51**).

3.7 Intrazelluläre Signalwege in der Western-Blot-Analyse

Um die Wirkung der Hypoxie und Hypothermie auf das Zellüberleben zu analysieren, wurde die intrinsische Apoptose als möglicher Mechanismus auf der Proteinebene untersucht. Die Charakterisierung mehrerer Proteine an Schlüsselpositionen der intrinsischen Signalkaskade wurde mittels Western-Blot-Analyse durchgeführt. Die Proben wurden in einem mehrstufigen Prozess gewonnen.

Dieser besteht aus der Zellbehandlung gemäß dem Protokoll, der Proteingewinnung und -aufbereitung, der Konzentrationsbestimmung (BCA-Methode), der Proteinauftrennung (Gelelektrophorese), dem -transfer (Western-Blot), der Applikation spezifischer Antikörper, der Detektion und anschließenden Quantifizierung.

3.7.1 Proteingewinnung

Die H9c2-Zellen wurden in Zellkulturschalen (150 cm²) bei 37°C bis 80 – 100 % Konfluenz kultiviert, um dann gemäß Zeit-Temperatur-Protokoll mit 30 mM CoCl₂ behandelt und mit dem Reperusionsmedium auf 34°C gekühlt oder bei 37°C inkubiert zu werden. Die Proteingewinnung erfolgte sechs Stunden und 24 Stunden nach der CoCl₂-Behandlung, wobei sie vollständig auf Eis und in Kühlzentrifugen (4°C) durchgeführt wurde.

Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurde den Petrischalen mit den Proben 20 ml eiskaltes PBS (4°C) zugefügt, um Stoffwechselprozesse und intrazelluläre Signalwege zum Untersuchungszeitpunkt zu arretieren. Der Überstand wurde nicht verworfen, um auch nicht adhärente Zellen zu erfassen. Der Zellrasen wurde anschließend mit Zellschabern vom Gefäßboden gelöst und im Medium-PBS-Gemisch in ein Zellröhrchen überführt. Im Gefäß verbliebene Zellen wurden mit weiteren 10 ml PBS resuspendiert und ebenfalls überführt. Zur Trennung von Zellen und Flüssigkeit wurden die Zellkulturröhrchen für fünf Minuten bei 1.200 U/min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen ein weiteres Mal in 1 ml PBS gewaschen, resuspendiert und bei 2.000 U/ min zentrifugiert.

3.7.2 Proteinaufbereitung

Nach 3.7.1 wurde der Überstand verworfen und das verbliebene Zellpellet in einer Mischung aus Proteinlysispuffer, Protease- und Phosphatase-Inhibitoren resuspendiert und bei – 80 °C gelagert. Durch den Lysispuffer und die Kristallbildung während des Einfrierens wird die Zellmembran sowohl chemisch als auch mechanisch permeabilisiert. Zur Erhöhung der Proteinausbeute wurde die Zellmembran nach dem Auftauen der Proben zusätzlich mechanisch geschädigt, indem das Suspensat mit ausgezogenen, englumigen Pipettenspitzen repetitiv auf- und abpipettiert wurde. Anschließend

erfolgte die Trennung der cytosolischen Proteine von Zellmembran und –organellen durch Zentrifugieren für 10 Minuten bei 12.000 U/min. Die cytosolische Proteinfraction im Überstand wurde unmittelbar nach der Aufbereitung gemäß 3.7.3 prozessiert und das Pellet aus Zellmembran und DNS verworfen.

Der genutzte Proteinlysepuffer wurde aus folgenden Bestandteilen angesetzt:

Tris (pH 7,5)	20 mM	Triton X-100	1%
NaCl	150 mM	PMSF	1 mM
EDTA	1 mM	EGTA	1 mM
Proteinaseinhibitor-Cocktail 1:1000.			

3.7.3 BCA-Methode zur Bestimmung der Proteinmenge

Die Gesamtkonzentration an Protein musste für jede Probe ermittelt und an eine Standardmenge angeglichen, um auf Basis des Western-Blot quantitative Aussagen treffen zu können.

In zwei Teilreaktionen konnte die Proteinmenge kolorimetrisch mit 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure (BCA) nach Smith quantifiziert werden¹²⁶. Hierzu wurde ein kommerzieller Assay gemäß Herstelleranleitung eingesetzt, wobei die Inkubation der Proben mit BCA-Reagenz im 96-well-Format erfolgte. In einem ersten Schritt werden Cu^{2+} -Ionen durch Peptidbindungen der Proteine bei 37 °C zu Cu^{1+} -Ionen reduziert, wodurch ein blauer Farbumschlag erfolgt. Im zweiten Schritt binden BCA-Moleküle Cu^{1+} -Ionen und bewirken einen violetten Farbumschlag, der dann bei einer Wellenlänge von 570 nm mit dem Multiskan Reader Ascent gemessen werden konnte.

Für den Western-Blot wurden die Proben mit standardisierten Proteinmengen (40 µg oder 50 µg), fünffach Probenpuffer und Deionat zu gleichen Volumina angesetzt.

3.7.4 Gelelektrophorese

Die angeglichenen und gemischten Proben wurden mittels *sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) nach ihrer molekularen Größe aufge-

trennt. Das in Proteinpuffer und Gel enthaltene SDS lagert sich an die Proteine an. Dabei denaturiert es die Proteinstruktur und maskiert ihre Ladung, sodass die Auftrennung vornehmlich nach der Molekülgröße erfolgt¹²⁷. Dazu wurden die Proben vor der Gelelektrophorese für fünf Minuten bei 95 °C mit dem im Probenpuffer enthaltenen SDS inkubiert. Durch Variation des Acrylamid-Anteils im Elektrophoresegel kann der Fokus an unterschiedliche Proteingrößen angepasst werden.

Die Proben und der Proteinmarker zur Bestimmung der Bandenhöhen wurden in bis zu zehn Taschen des Sammelgels gefüllt. Im Sammelgel erfolgte die Konzentration der Proben unter 50 V und 400 mA. Die Separation der Proteine fand im Trenngel unter 100 V und 400 mA statt. Die Laufzeit der Elektrophorese war vom Gel und der gesuchten Molekülgröße abhängig.

Die Elektrophoresegele wurden kurz vor der Durchführung aus folgenden Bestandteilen angesetzt:

Sammelgel		Trenngel	
Sammelgel-Puffer	129 mM TRIS-HCL pH 6,8	Trenngel-Puffer	384 mM TRIS-HCL pH 8,8
SDS	0,10%	SDS	0,10%
TEMED	0,26%	TEMED	0,20%
APS	0,08%	APS	0,05%
Deionat	abhängig vom Gel	Deionat	abhängig vom Gel
Acrylamid	abhängig vom Gel	Acrylamid	abhängig vom Gel

Sowohl bei der Elektrophorese als auch bei beim Proteintransfer (3.7.5) wurden die jeweiligen Kammern mit den Gelen und Pufferlösung gefüllt, um eine optimale elektrische Leitbarkeit zu gewährleisten. Die unterschiedlichen Anforderungen an die Pufferlösungen spiegeln sich in deren abweichender Zusammensetzung und Eigenschaften wider:

Elektrophorese-Puffer		Blotting-Puffer	
TRIS – Base	25 mM	TRIS – Base	25 mM
Glycin	200 mM	Glycin	200 mM
SDS	3,5 mM		
in Deionat		in Deionat	

3.7.5 Proteintransfer

Der Transfer der Proteine von den Gelen auf Nitrozellulose-Membranen erfolgte in einem Tank-Blot-System. Dabei wurden Gel und Membran zwischen Filterpapier und Polster fixiert und in Blottingkammern eingebracht. Die negativ geladenen Proteine konnten durch einen Strom von 100 mV Spannung und 400 mA Stärke auf Membranen übertragen werden. Die Transferdauer betrug 50 - 80 Minuten und richtete sich nach dem Gel sowie der Größe der zu detektierenden Proteine. Zur Kontrolle des korrekten Transfers erfolgte stets eine Beurteilung durch das Färben der Proteine auf den Membranen durch Ponceau-Lösung.

3.7.6 Applikation von Primär- und Sekundärantikörpern

Die proteinbeladenen Membranen wurden zunächst für eine Stunde mit 5 % Magermilchpulver oder 5 % Albumin inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Die Inkubation mit den spezifischen Erstantikörpern erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers über Nacht bei 4 °C. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran für 90 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert.

3.7.7 Detektion der Proteine mittels ChemiDoc™

Die Proteine wurden mittels Chemilumineszenz in einer ChemiDoc™ quantifiziert, indem zunächst die Membranen für eine Minute bei Raumtemperatur mit einem kommerziellen Kit aus Peroxid und einem Lumineszenzverstärker inkubiert wurden. Dabei wurde das chemische Substrat entsprechend der Menge des Sekundärantikörpers enzymatisch umgesetzt und erzeugte Chemilumineszenz. Diese konnte anhand des Kamerasystems der ChemiDoc™ auf der Membran lokalisiert, quantitativ erfasst und digital dokumentiert werden. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit dem Programm QuantityOne™ (siehe **Abbildungen 11** und **12**, S. 44 und 47).

3.7.8 Densitometrische Auswertung der Proteine mittels ImageLab™-Software

Die Analyse der digitalen Aufnahmen der Proteinregulation wurde mit dem Computerprogramm ImageLab™ durchgeführt (siehe **Abschnitt 4.6**, S. 43). Die Analyse erfolgte, nachdem die Proteinexpression hypothermer und normothermer Kardiomyoblasten in ein direktes Verhältnis gesetzt wurde:

$$x - \text{fache Veränderung} = \frac{\text{Densitometrie } 34^{\circ} \text{ C}}{\text{Densitometrie } 37^{\circ} \text{ C}}$$

3.8 Statistische Auswertung

Zur statistischen Analyse quantitativer Untersuchungen wurden jeweils die Ergebnisse von mindestens drei Versuchen herangezogen. Die statistische Auswertung wurde mit dem Computerprogramm Graph Pad Prism durchgeführt. Die Auswertung der Signifikanz erfolgte beim Vergleich zweier Proben mit einem einseitigen Student-t-Test für nicht gepaarte Stichproben. Bei der Analyse von mehr als zwei Proben wurde eine einseitige Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur für multiples Testen verwendet. Als statistisch signifikant wurden p-Werte kleiner 0,05 = *, kleiner 0,01 = ** und kleiner 0,001 = *** eingestuft.

4 Ergebnisse

4.1 Wirkung milder Hypothermie auf die Zellvitalität

Zur Untersuchung der Wirkung milder Hypothermie (34°C) auf die Vitalität nicht vorbehandelter H9c2-Zellen wurden diese für 24 Stunden bei 34°C inkubiert. Dabei wurde stets eine Kontrolle bei 37°C mitgeführt. Nach sechs und 24 Stunden erfolgte die Bestimmung der Zellvitalität beider Gruppen mit der Trypanblaufärbung (siehe **Abschnitt 3.6**) am Phasenkontrastmikroskop.

Wie die Übersicht in **Tabelle 1** zeigt, lag die Zellvitalität unter 34°C Hypothermie nach sechs Stunden leicht über der normothermen Kontrolle. Nach 24 Stunden Hypothermie lag die Zahl vitaler Zellen leicht unter der der normothermen Kontrollen. Zu den untersuchten Zeitpunkten gab es keinen signifikanten Unterschied der Zellvitalität zwischen Hypothermie (34°C) und Normothermie (37°C).

Tabelle 1: Zellvitalität unter Normothermie (37°C) und Hypothermie (34°C).

Zellüberleben bei Inkubation mit Normalmedium (mock) unter 37°C und 34°C nach sechs und 24 Stunden. Zu keinem der beobachteten Zeitpunkte wurde ein signifikanter Unterschied in der Zahl vitaler H9c2-Zellen beobachtet. mock/37°C zum jeweiligen Zeitpunkt = 100%.

Behandlung / Zeit	6h	24h
mock + 37°C	100	100
mock + 34°C	105 (± 4)	93 (± 9)
p [absolut]	0,1567	0,0984

4.2 Wirkung der CoCl₂-Behandlung auf die Morphologie und Zellvitalität

Für die Untersuchung der Wirkung der CoCl₂-Behandlung auf die Morphologie und Zellvitalität von H9c2-Zellen wurden diese für eine Stunde mit unterschiedlichen Konzentrationen von CoCl₂ inkubiert (siehe **Abschnitt 3.6.2**, S. 29). 24 Stunden nach der CoCl₂-Behandlung wurden die Proben in der Phasenkontrastmikroskopie auf den morphologischen Schaden und quantitativ mittels Trypanblaufärbung auf die Zellvitalität untersucht. Mit steigender CoCl₂-Konzentration konnte die Zunahme struktureller Schäden festgestellt werden. Dabei wurden eine Verdichtung und Abrundung der Zellen sowie

der Auflösung des Zellverbands beobachtet. Durch diese Veränderungen präsentierte sich der Zellrasen bei zunehmender Stärke der CoCl_2 -Behandlung ausgedünnter (siehe **Abbildung 7**, S. 38). Die Konfluenz des Zellrasens war in den Gruppen 50 mM und 200 mM aufgehoben. Die verbliebenen Zellen zeigten ein unregelmäßigeres Erscheinungsbild als die Myozyten-typische Spiralforn der mock-behandelten Kontrollen (0mM). Das Zellüberleben 24 Stunden nach einstündiger CoCl_2 -Behandlung und anschließender normothermer Behandlung wird durch **Abbildung 6** illustriert. Die Zellvitalität nahm mit zunehmender Konzentration des CoCl_2 ab. Alle untersuchten Konzentrationen an CoCl_2 wiesen eine signifikant niedrigere Zahl überlebender Zellen auf als mock-behandelte Kontrollen.

Die Arbeitskonzentration für die weiteren Versuche musste eine starke Zellschädigung sowie eine ausreichende Zahl überlebender Zellen für den Beobachtungszeitraum gewährleisten. Aufgrund der morphologischen Veränderungen (siehe **Abbildung 7**) und der beobachteten Zellvitalität (siehe **Abbildung 6**) wurde die Arbeitskonzentration von CoCl_2 gemäß den oben angeführten Anforderungen auf 30 mM festgelegt. Eine weiterführende Auseinandersetzung diesbezüglich erfolgt in der Diskussion (siehe **Abschnitt 5.2**, S. 53).

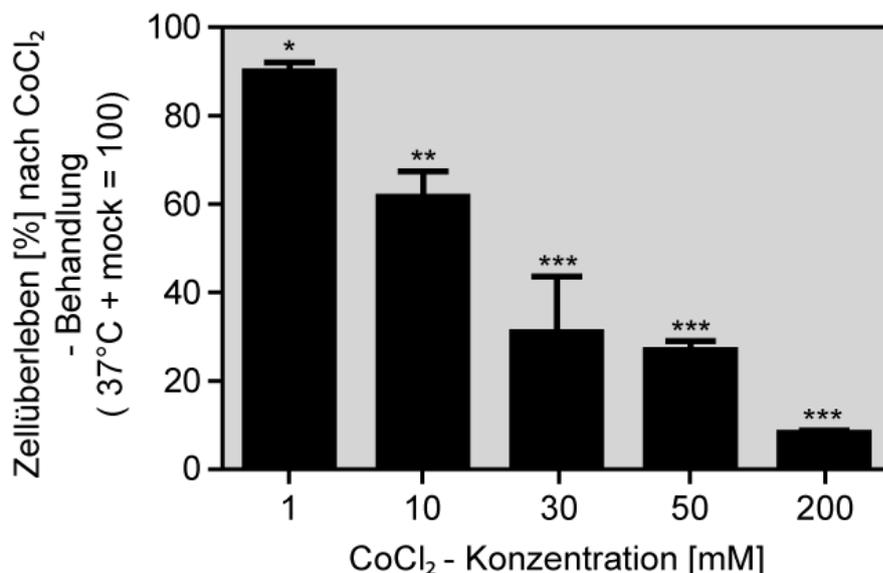


Abbildung 6: Einfluss unterschiedlicher CoCl_2 -Konzentrationen auf das Überleben von H9c2-Zellen

Zellvitalität von H9c2-Zellen 24 Stunden nach der Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von CoCl_2 [% \pm SD]. Alle Proben bei 37°C inkubiert. 0 mM = mock-Behandlung = 100%; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

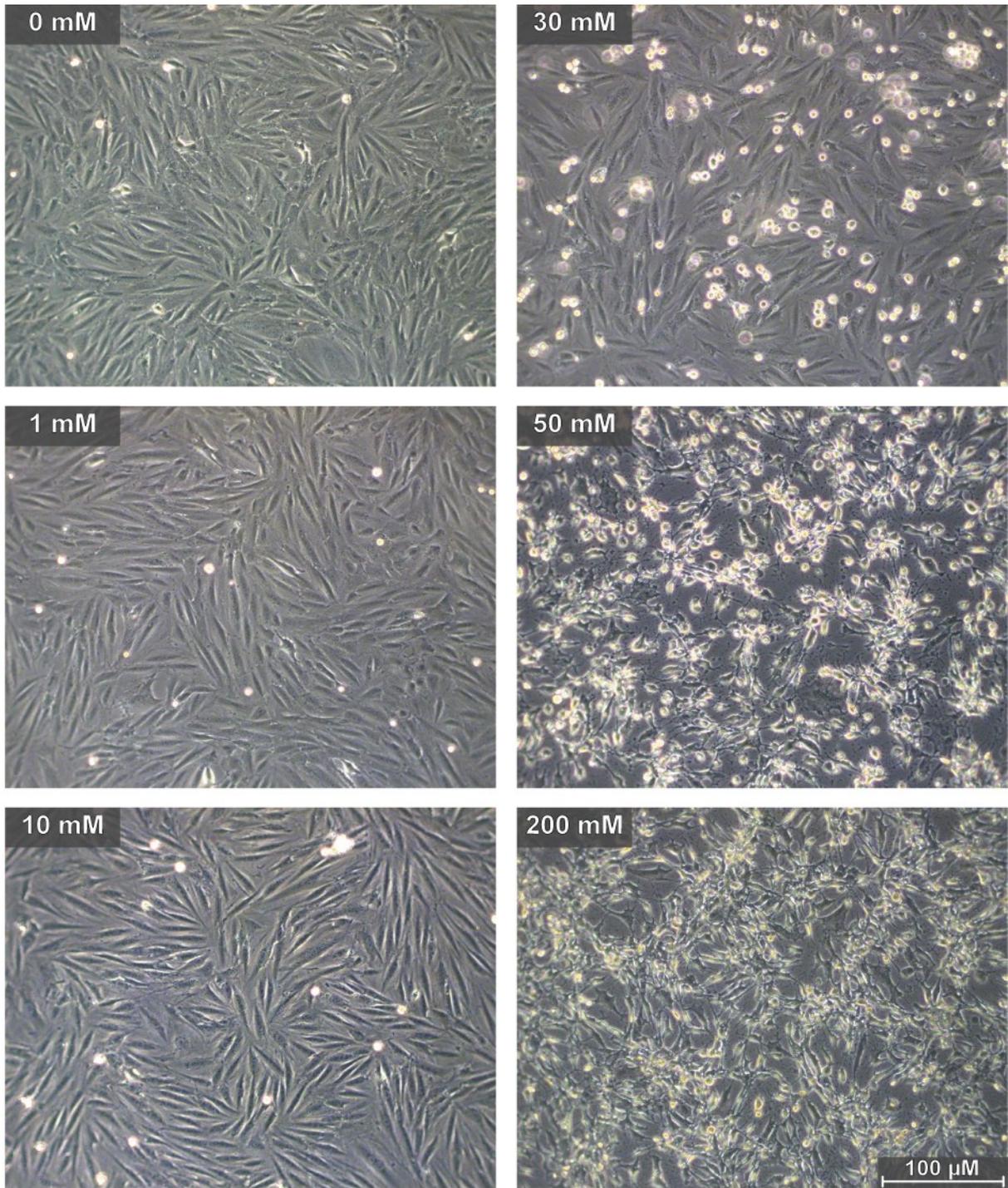


Abbildung 7: H9c2-Zellen nach einer CoCl_2 -Behandlung.

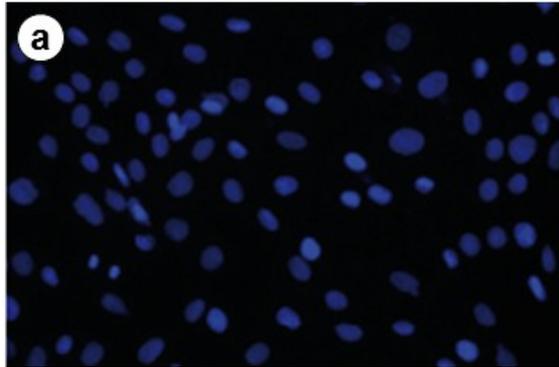
Morphologische Untersuchungen am Phasenkontrastmikroskop. H9c2-Zellen 24 Stunden nach einer CoCl_2 -Behandlung unterschiedlicher Konzentration. 100-fache Vergrößerung.

4.3 Zellschaden in einer Propidiumjodidfärbung

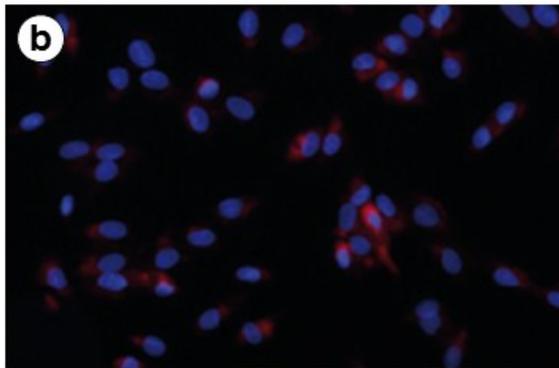
Anhand weiterer Methoden wurden zelluläre Strukturveränderungen sowie einige Stoffwechsel- und Signalwege genauer charakterisiert, die für den eingangs beobachteten Zellschaden und die morphologischen Veränderungen ursächlich sein konnten. Dabei wurde untersucht, welche Auswirkungen die beobachtete Anpassung für physiologische und pathophysiologische Abläufe der Zelle hat. Die niedrigere Zellzahl CoCl_2 -behandelter Proben gegenüber der mock-Behandlung konnte auf eine verminderte Proliferation der Zelllinie oder Zelluntergang hinweisen.

Zur Differenzierung wurden H9c2-Zellen auf einen Zellschaden, indem eine immunzytochemische Färbung mit Propidiumjodid durchgeführt wurde. Da dieser Farbstoff nicht in der Lage ist intakte Membranen zu durchdringen, reichert er sich lediglich in geschädigten Zellen an. 24 Stunden nach einer CoCl_2 -Behandlung gemäß dem Zeit-Temperatur-Protokoll wurden H9c2-Zellen mit PI auf einen Zellschaden untersucht (siehe **Abbildung 8**). Sowohl normotherme als auch hypotherme Proben zeigten 24 Stunden nach einer CoCl_2 -Behandlung eine niedrigere Dichte von Zellkernen auf als die mock-behandelten Kontrollen. In mock-behandelten Kontrollen wurde Fluoreszenz im PI-Spektrum auf niedrigem Niveau beobachtet (siehe **Abbildung 8 a**). Nach einer CoCl_2 -Behandlung war diese Fluoreszenz sowohl in normothermen als auch in hypothermen Kontrollen erkennbar erhöht (siehe **Abbildung 8 b+c**). Im direkten Vergleich gekühlter und normothermer Zellen wiesen beide Gruppen eine ähnliche Zelldichte auf. Unter Normothermie wurde ein stärkeres Fluoreszenzsignal im PI-Spektrum beobachtet.

Mock + 37°C



CoCl₂ + 37°C



CoCl₂ + 34°C

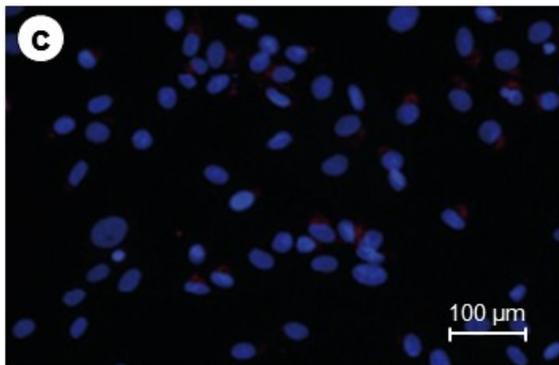


Abbildung 8: Untersuchung des Zellschadens anhand der Membranpermeabilität

Immunzytologische Färbung von H9c2-Zellen mit Propidiumjodid (PI). H9c2-Zellen 24 Stunden nach mock- oder CoCl₂ [30mM]-Behandlung. Rot: Propidiumjodid. Blau: DAPI, DNS/RNS. a: Beispiel mock-behandelter Zellen mit anschließender Inkubation unter 37°C. Gutes Signal der DAPI-Färbung zur Markierung der DNS. Keine spezifische Aktivität im Fluoreszenzspektrum von PI. b: Beispiel von CoCl₂-behandelten H9c2-Zellen nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C. Gutes Signal der DAPI-Färbung. Im Vergleich zu a ist anhand der DAPI-Färbung eine geringere Dichte der Zellkerne zu beobachten. Spezifische Färbung unterschiedlicher Stärke im PI-Spektrum (rot). Diese erstreckt sich sowohl über die Zellkerne als auch das umliegende Zytoplasma von > 60% der H9c2-Zellen. c: Beispiel von CoCl₂-behandelten H9c2-Zellen nach 24-stündiger Inkubation bei 34°C. Gutes Signal der DAPI-Färbung. Im Vergleich zu a ist anhand der DAPI-Färbung eine der Zellkerne zu beobachten. Diese liegt vergleichsweise höher als in b. Spezifische Färbung unterschiedlicher Stärke im PI-Spektrum (rot). Die Stärke des Signals und das Ausmaß der PI-Färbung ist vergleichsweise niedriger als in b. Diese erstreckt sich sowohl über die Zellkerne als auch das umliegende Zytoplasma von > 40% der H9c2-Zellen.

Die Zelldichte CoCl₂-behandelter Zellen lag zum Zeitpunkt 15 Minuten nach der CoCl₂-Behandlung leicht unter der mock-behandelten Kontrollgruppe (37°C). Letztere zeigte im Spektrum von HIF-1α eine Fluoreszenz auf sehr niedrigem Niveau und mit diffusem Ausbreitungsmuster im gesamten Zytosol (siehe **Abbildung 9 a+b**). 15 Minuten nach Beendigung der CoCl₂-Behandlung wurde in den Proben eine deutliche Stabilisierung des Proteins sowie eine peri- und endonukleäre Anreicherung zu beobachten (siehe **Abbildung 9 c+d**).

4.5 Zellüberleben nach einer CoCl₂-Behandlung unter Normo- und Hypothermie

Nach Etablierung des *in vitro*-Modells konnte die quantitative Auswirkung der milden Hypothermie auf das Überleben von H9c2-Zellen nach einer CoCl₂-Behandlung untersucht werden. Dazu wurde nach Durchführung des Zeit-Temperatur-Protokolls die Zellzahl von normothermen (CoCl₂ + 37°C) und hypothermen (CoCl₂ + 34°C) Proben mittels der Trypanblaufärbung mit mock-behandelten Kontrollen (Normalmedium, mock + 37°C) verglichen (siehe **Abbildung 10**).

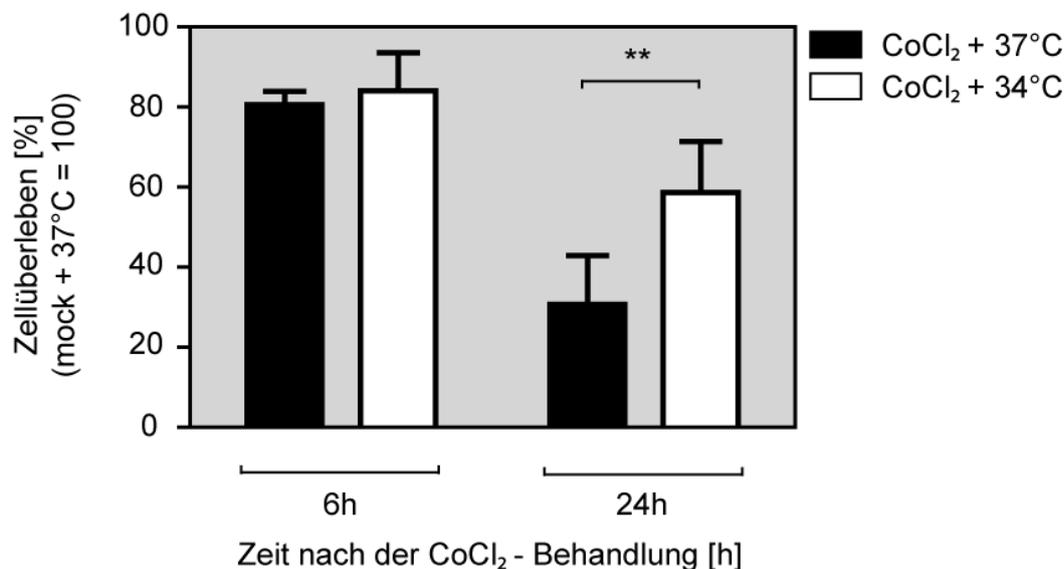


Abbildung 10: Zellüberleben nach CoCl₂ unter Normo- und Hypothermie.

Quantitative Auswertung des Zellüberlebens mit Hilfe der Trypanblaufärbung. Relatives Zellüberleben zu den Zeitpunkten sechs und 24 Stunden nach der CoCl₂-Behandlung [% ± SD]. Die Inkubation ist unter Normothermie (schwarz) und Hypothermie (weiß) erfolgt. Die Zellzahl in mock-behandelten Kontrollen (mock + 37°C) wurde als 100% definiert. Nach 6 Stunden ist sowohl unter Normothermie als auch unter Hypothermie ein deutlicher Zellschaden zu beobachten. 24 Stunden nach der CoCl₂-Behandlung ist die Zahl überlebender Zellen in hypothermen Proben höher als in normothermen Proben. p** < 0,01.

Sechs Stunden nach CoCl_2 -Behandlung war in normothermen und hypothermen Zellen eine ähnliche Vitalität zu beobachten. Beide Proben CoCl_2 -behandelter H9c2-Zellen wiesen nach sechs Stunden bei anschließender normothermer Behandlung ein Überleben von ca. 80% auf. 24 Stunden nach der CoCl_2 -Behandlung lag der Anteil lebender H9c2-Zellen unter Hypothermie signifikant höher als unter Normothermie.

4.6 Regulation Apoptose-assoziiierter Proteine

4.6.1 Bax und Bcl-2

Die Bcl-2-Proteinfamilie ist an der Regulation der intrinsischen Apoptose beteiligt. Der Einfluss der CoCl_2 -Behandlung und Hypothermie auf diese Proteine sollte stellvertretend anhand zweier wichtiger Antagonisten, dem pro-apoptotischen Bax und dem anti-apoptotischen Bcl-2, untersucht werden. Sie sind mit der Permeabilität der äußeren mitochondrialen Membran und der Regulation der intrinsischen Apoptose assoziiert (siehe **Abschnitt 1.5**, S. 7).

Die quantitative Untersuchung erfolgte proteinbiochemisch mittels des Western-Blot-Verfahrens und einer densitometrischen Analyse. Zu den Zeitpunkten sechs und 24 Stunden CoCl_2 -Behandlung wurden die Bax- und Bcl-2-Regulation verglichen. **Abbildung 11** zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse und illustriert ein stärkeres Signal für das Protein Bax in den CoCl_2 -behandelten Proben auf als in den Kontrollen. Im Vergleich von Hypothermie und Normothermie nach einer CoCl_2 -Behandlung wurde für beide untersuchte Zeitpunkte in den normothermen H9c2-Zellen ein stärkeres Signal für das Protein Bax gemessen als unter Hypothermie.

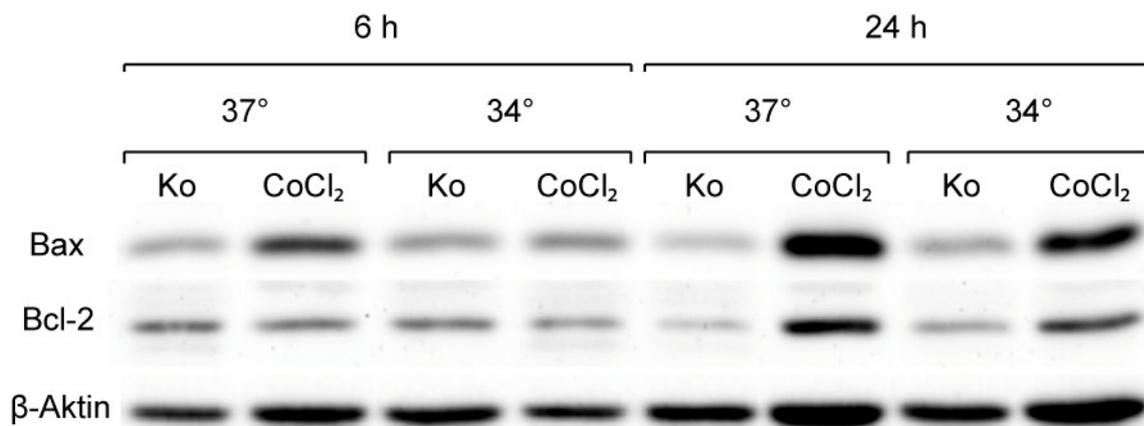


Abbildung 11: Regulation der Proteine Bax und Bcl-2.

Western-Blot-Analyse sechs und 24 Stunden nach der Behandlung mit CoCl₂. Neben Bax und Bcl-2 wurde β-Aktin als Ladekontrolle und Standardisierung der Proteinmengen untersucht. In allen CoCl₂-behandelten Proben wurde ein stärkeres Bax-Signal als in den mock-behandelten Kontrollen beobachtet. Dabei erscheinen im direkten Vergleich die Signale der normothermen Gruppen stärker als die der hypothermen Gruppen. Bei Bcl-2 ist in allen Proben nach sechs Stunden eine ähnliche Signalstärke zu beobachten. In CoCl₂-behandelten Proben ist nach 24 Stunden ein stärkeres Bcl-2-Signal als in den Kontrollen des Zeitpunktes sechs Stunden und allen Proben nachzuweisen gewesen. Die Signale der beiden Kontrollen nach 24 Stunden sind schwächer als in allen anderen Proben ausgeprägt. Aktin zeigt unterschiedliche Signalstärken in den jeweiligen Proben. Die Proteinmenge wurde für die quantitative Auswertung anhand des Aktinsignals standardisiert, um durch vergleichbare Proteinmengen präzisere Ergebnisse zu erhalten. Die Darstellung der Proteinmenge ist durch Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper und Chemilumineszenz erfolgt. Ko = Kontrolle, CoCl₂ = Behandlung mit 30 mM.

Tabelle 2: Densitometrische Analyse des Proteins Bax aus dem Western-Blot in Abbildung 11.

Quantitativer Vergleich der Bax-Regulation in H9c2-Zellen unter normothermer und hypothermer Behandlung nach einer CoCl₂-Behandlung. Die Standardisierung der untersuchten Proteinproben erfolgte anhand der Aktin-Ladekontrolle. Auswertung als direktes Verhältnis von CoCl₂+37°C und CoCl₂+34°C [± SD]. CoCl₂+37°C zum jeweiligen Zeitpunkt = 1,0. Unter Hypothermie wurde 24 Stunden nach der CoCl₂-Behandlung eine niedrigere Bax-Expression beobachtet. Zum Zeitpunkt sechs Stunden zeigte sich kein Unterschied. p** < 0,01.

Behandlung / Zeit	6 Stunden	24 Stunden
CoCl ₂ + 37°C	1,00	1,00
CoCl ₂ + 34°C	0,60 (± 0,25)	0,64 (± 0,17) **
Signifikanzwert p	0,0512	0,0039

In **Tabelle 2** wurden die Bax-Expression hypothermer und normothermer Proben in ein direktes Verhältnis gesetzt. Nach sechs Stunden zeigten die gekühlten Proben eine leichte Verminderung von Bax. Nach 24 Stunden hingegen wurde in gekühlten H9c2-Zellen eine signifikante Reduktion des Proteins Bax nachgewiesen.

Die Analyse der Signalintensität für das Protein Bcl-2 in **Abbildung 11** ergab sechs Stunden nach Behandlung mit CoCl₂ keine Unterschiede zwischen normothermer und hypothermer Behandlung. Zum Zeitpunkt 24 Stunden nach CoCl₂-Behandlung wurde in hypothermen Zellen eine Reduktion in der Expression des Proteins Bcl-2 beobachtet (siehe **Tabelle 3**).

Um eine höhere Aussagekraft zur Permeabilität der mitochondrialen Membran und Regulation der Apoptose zu erreichen, wurde das Verhältnis der beiden untersuchten antagonistischen Bcl-2-Proteine gebildet (Apoptose-Index Bax / Bcl2). Zu den Zeitpunkten sechs und 24 Stunden war unter Hypothermie der Apoptose-Index zugunsten des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 verschoben (siehe **Tabelle 4**). Nach 24 Stunden bestand ein signifikanter Unterschied.

Tabelle 3: Densitometrische Analyse des Proteins Bcl-2 aus dem Western-Blot in Abbildung 11.

Quantitativer Vergleich der Bcl-2-Regulation in H9c2-Zellen unter normothermer und hypothermer Behandlung nach einer CoCl₂-Behandlung. Die Standardisierung der untersuchten Proteinproben erfolgte anhand der Aktin-Ladekontrolle. Auswertung als direktes Verhältnis von CoCl₂+37°C und CoCl₂+34°C [± SD]. CoCl₂+37°C zum jeweiligen Zeitpunkt = 1,0. Unter Hypothermie wurde 24 Stunden nach der CoCl₂-Behandlung eine niedrigere Bcl-2-Expression beobachtet. Zum Zeitpunkt sechs Stunden zeigte sich kein Unterschied. p** < 0,01.

Behandlung / Zeit	6h	24h
CoCl ₂ + Normothermie (37°C)	1,00	1,00
CoCl ₂ + Hypothermie (34°C)	1,03 (± 0,10)	0,75 (± 0,19) **
Signifikanzwert p	0,5387	0,0243

Tabelle 4: Vergleich des Apoptose-Index' (Bax/Bcl-2).

CoCl₂ + 37°C zum jeweiligen Zeitpunkt = 1,0. Sechs Stunden nach der simulierten Hypoxie wurde der Trend eines niedrigeren Apoptose-Index' unter Hypothermie beobachtet [± SD]. 24 Stunden nach einer CoCl₂-Behandlung wurde unter Kühlung eine deutliche Senkung des Apoptose-Index' nachgewiesen. p** < 0,01.

Apoptose-Index Bax / Bcl-2		
Behandlung / Zeit	6h	24h
CoCl ₂ + Normothermie (37°C)	1,00	1,00
CoCl ₂ + Hypothermie (34°C)	0,59 (± 0,27)	0,85 (± 0,07) **
Signifikanzwert p	0,0582	0,0032

4.6.2 Caspase 3

Für die Charakterisierung des Einflusses der Hypothermie auf intrazelluläre Signalwege der Apoptose ist die Untersuchung des Schlüsselenzyms Caspase 3 von herausragender Bedeutung. Der Grad der Aktivierung spiegelt sich im Mengenverhältnis der Caspase 3 zur Vorstufe Pro-Caspase 3 wider (siehe **Abschnitt 1.5.2**, S. 12). Diese Aktivierung wurde für Zeitpunkte sechs Stunden und 24 Stunden nach CoCl₂-Behandlung auf Basis der Proteinexpression (siehe **Abbildung 12**, S. 47) densitometrisch ermittelt (siehe **Tabelle 5**).

Das Signal für gespaltene - und dadurch aktivierte – Caspase 3 konnte nur in den CoCl₂-behandelten Proben beobachtet werden. Weder in normothermen noch in hypothermen Kontrollen wurde ein relevantes Signal für das aktivierte Protein Caspase 3 nachgewiesen.

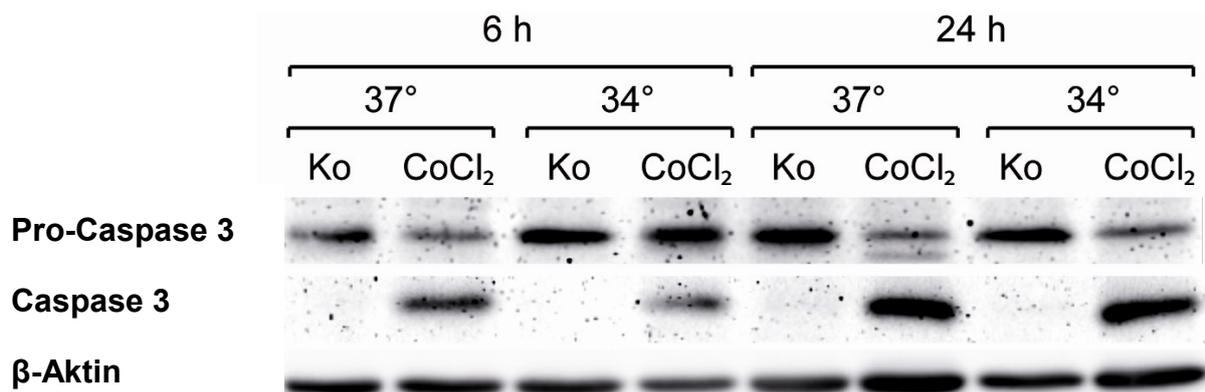


Abbildung 12: Aktivitätsgrad der Effektor-Caspase 3.

Western-Blot-Analyse sechs und 24 Stunden nach der Behandlung mit CoCl_2 . Caspase 3 entsteht durch limitierte Proteolyse aus dem Zymogen Pro-Caspase 3. Neben Caspase 3 und Pro-Caspase 3 wurde β -Aktin als Ladekontrolle untersucht. Das Verhältnis von Caspase 3 und Pro-Caspase 3 spiegelt den Grad der Aktivierung wider. Ein hoher Aktivierungsindex Caspase 3/ Pro-Caspase 3 belegt eine vermehrte Aktivierung des Schlüsselproteins der intrinsischen Apoptose. Die Vorstufe Pro-Caspase 3 wurde in allen Proben nachgewiesen. Das stärkste Signal wurde in den Proben und für $\text{CoCl}_2+34^\circ\text{C}/6\text{h}$ gesehen. Ein spezifisches Signal für Caspase 3 konnte nur in den CoCl_2 -behandelten H9c2Zellen beobachtet werden. Nach sechs Stunden Kühlung zeigen die H9c2-Zellen eine größere Menge an Pro-Caspase 3 und eine geringere Menge an Caspase 3 als normotherme Zellen nach einer CoCl_2 -Behandlung. Nach 24 Stunden nimmt der beobachtete Unterschied ab, ist jedoch noch gegeben. Eine Normierung der Proteinmengen für die quantitative Analyse war hier nicht notwendig, da der Aktivitätsindex Caspase 3/Pro-Caspase 3 probenintern gebildet wurde. Die Darstellung der Proteinmenge erfolgte durch Peroxidasegekoppelte Sekundäntikörper und Chemilumineszenz. Ko = Kontrolle, CoCl_2 = Behandlung mit 30 mM.

Tabelle 5: Bestimmung der Caspase 3-Aktivierung durch Bildung der Ratio Caspase 3/ Pro-Caspase 3.

Densitometrische Analyse des Western-Blots aus Abbildung 12. Direkter Vergleich normothermer und hypothermer Inkubation nach einer CoCl_2 -Behandlung. $\text{CoCl}_2 + 37^\circ\text{C}$ zum jeweiligen Zeitpunkt = 1,0 [\pm SD]. Unter Hypothermie wurde sowohl sechs als auch 24 Stunden nach der CoCl_2 -Behandlung eine niedrigere Caspase 3-Aktivierung beobachtet. Der Unterschied zum Zeitpunkt sechs Stunden ist größer als nach 24 Stunden gewesen.

Caspase 3 – Aktivierung (Caspase-3 / Pro-Caspase-3)		
Behandlung / Zeit	6h	24h
CoCl_2 + Normothermie (37°C)	1,00	1,00
CoCl_2 + Hypothermie (34°C)	0,23 (\pm 0,10) ***	0,61 (\pm 0,15) **
Signifikanzwert p	0,0005	0,0016

Tabelle 5 zeigt den Aktivierungsgrad des Proteins Caspase 3 unter Hypothermie und Normothermie nach einer CoCl_2 -Behandlung. Sowohl nach sechsständiger als auch nach 24-stündiger Kühlung auf 34°C wurde im Vergleich zur Normothermie signifikant gesenkte Caspase 3-Aktivität beobachtet, wobei der Unterschied zum Zeitpunkt sechs Stunden größer war.

4.7 Ausführung der Apoptose durch die Effektor-Caspasen

Die Aktivität der Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 wurde anhand der proteolytischen Spaltung des Caspasesubstrates Cytokeratin 18 in einer immunocytochemischen Färbung untersucht. Dazu wurde die Ausführung der Apoptose unmittelbar nach der CoCl_2 -Behandlung, sowie 24 und 48 Stunden danach immunzytologisch beobachtet, indem das gespaltene Caspase-Substrat Cytokeratin 18 (M30 CytoDEATH), das Zytoskelett (f-Aktin) und die Zellkerne spezifisch markiert und am Fluoreszenzmikroskop dargestellt wurden (siehe **Abschnitt 3.5.3**, S. 27).

Die angefertigten immunocytochemischen Färbungen der H9c2-Zellen zeigten die für diese Zelllinie typischen unregelmäßig gefächerten Aktinfilamente (siehe **Abbildung 13 a-f**). Die Zellkerne, welche zuvor durch DAPI markiert worden waren, lagen zentral und waren überwiegend rund geformt.

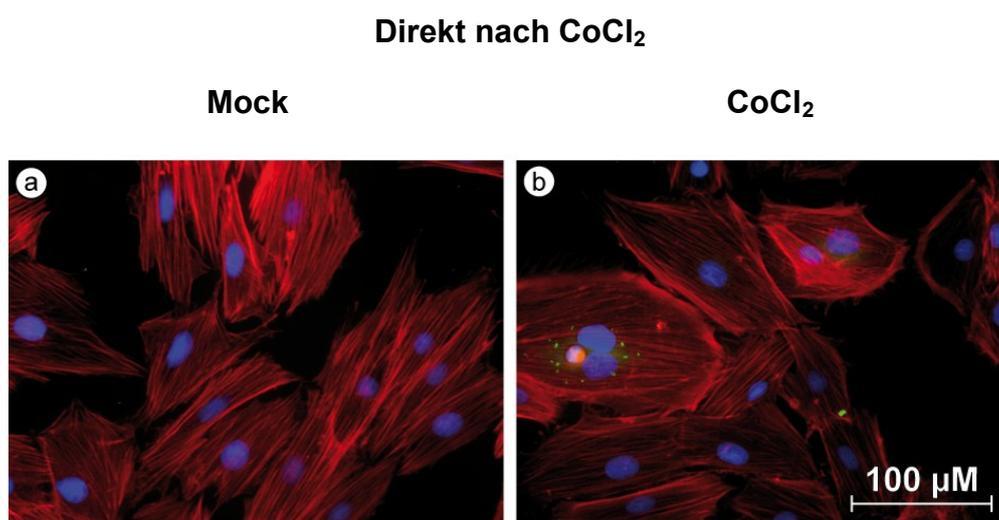


Abbildung 13 a–b: Exekution der Apoptose (siehe Abbildung 13 c–f)

48 Stunden nach CoCl_2

CoCl_2 + 37°C

CoCl_2 + 34°C

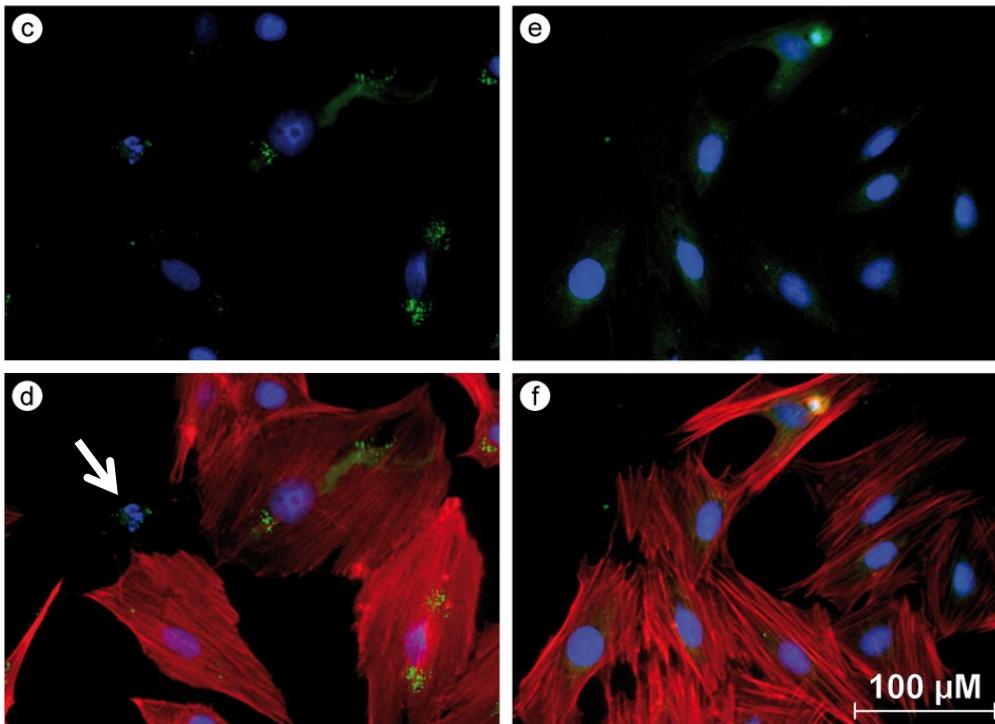


Abbildung 13 c-f: Exekution der Apoptose.

Färbung des gespaltenen Caspase-Substrates Cytokeratin 18 mit dem Antikörper M30 CytoDEATH direkt (a + b) und 48 Stunden (c – f) nach der CoCl_2 -Behandlung. DNS: DAPI, blau. Aktinfilamente des Zytoskelettes: f-Aktin, rot. Gespaltenes Zytokeratin 18: M30 CytoDEATH, grün. a) Beispiel mock-behandelter H9c2-Zellen. Die Zellen haben vornehmlich eine längliche Kontur und liegen dicht beieinander. Es ist keine spezifische Färbung gespaltenen Zytokeratins 18 nachweisbar. b) Beispiel von H9c2 Zellen unmittelbar nach einer CoCl_2 -Behandlung. Die Zellen wirken flächiger als in a. In der Zelldichte sind keine großen Unterschiede zu beobachten. Vereinzelt ist Fluoreszenz im Spektrum von M30 CytoDEATH nachzuweisen. Der Großteil der Zellen ist frei von gespaltenem Zytokeratin 18. c+d) Beispiel normotherm inkubierter H9c2-Zellen (37°C) 24 Stunden nach einer CoCl_2 -Behandlung. Die vorherrschende Zellform wirkt verplumpt und die Zelldichte ist herabgesetzt. In zahlreichen Zellen ist eine spezifische Fluoreszenz im Spektrum von M30 CytoDEATH nachzuweisen. Das M30 CytoDEATH ist vornehmlich zentral in der Längsachse der Zellen nachzuweisen. Oft sind in Kernnähe zwei einander gegenüberliegende Pole mit einer hohen Signalstärke des M30 CytoDEATH darzustellen. Es zeigt sich ein Integritätsverlust unterschiedlicher Ausprägungsgrade. Im Bildausschnitt ist ein Rudiment einer Zelle aus einem Nucleus ohne Zellkörper zu erkennen (Pfeil). e+f) Beispiel gekühlter Zellen (34°C) 24 Stunden nach einer CoCl_2 -Behandlung. Die Zelldichte liegt im Vergleich zu c/d höher. Die Zellen unterscheiden sich in ihrer Form sowohl von mock-behandelten Kontrollen (a) als auch von normotherm behandelten Zellen (c/d). Sie wirken sehr gedungen und von der Kontur her deutlich scharfkantiger. Auch hier wurde eine spezifische Färbung des gespaltenen Zytokeratin 18 nachgewiesen. In fast allen Zellen war ein diffuses Signal im Fluoreszenzspektrum des M30 CytoDEATH nachzuweisen. Dieses befand sich perinukleär in Längsachse der H9c2-Zellen. a, b, d, f: DAPI, Aktin, M30 CytoDEATH. c, e: DAPI, M30 CytoDEATH.

Unmittelbar nach der Schädigung erschienen die Zellkörper der CoCl_2 -behandelten H9c2-Zellen flächiger und runder als die mock-behandelten Kontrollen (siehe **Abbildung 13 a+b**). Letztere stellten sich gedrungener und mit eher kantigen Zellgrenzen dar. In einigen H9c2-Zellen wies die Färbung für gespaltenes Cytokeratin 18 (ZK 18) unmittelbar nach der Behandlung mit CoCl_2 eine spezifische Fluoreszenz auf (siehe **Abbildung 13 b**). In den mock-behandelten Kontrollen hingegen wurde kein relevantes Signal für gespaltenes ZK 18 beobachtet (siehe **Abbildung 13 b**).

48 Stunden nach der Behandlung mit CoCl_2 waren deutliche Unterschiede zwischen der normothermen und der hypothermen Gruppe festzustellen: Die Zellkörper der gekühlten Proben erschienen gedrungener, das Kern-Plasma-Verhältnis war zugunsten des Kerns verschoben und die Zelldichte lag höher. In den hypothermen H9c2-Zellen stagnierte das Ausmaß der ZK-18-Spaltung auf dem Niveau von 24 Stunden. Die Fluoreszenz war diffus und schwach über den gesamten Zellkörper nachzuweisen (siehe **Abbildung 13 e+f**). Die normothermen H9c2-Zellen präsentierten sich weiterhin mit flächigen, runden Zellkörpern und unverändertem Kern-Plasma-Verhältnis (siehe **Abbildung 13 c+d**). Hier wurden Zellrudimente aus Kernen ohne Zellkörper beobachtet (siehe **Abbildung 13 c, Pfeil**) und ausgedehnte Lücken im Zellverband festgestellt. Des Weiteren wurde eine Akkumulation von gespaltenem ZK-18 perinukleär beobachtet.

4.8 Einfluss eines β -Agonisten (Isoprenalin) auf H9c2-Zellen nach einer CoCl_2 -Behandlung

In Anlehnung an den Einsatz von Katecholaminen im Rahmen von Reanimationsmaßnahmen wurde deren Einfluss auf das Zellüberleben von Kardiomyoblasten nach hypoxischem Schaden anhand von Isoprenalin untersucht (siehe **Abschnitt 1.6.1**, S. 13). In Vorversuchen wurde die Zytotoxizität des unspezifischen β -Agonisten Isoprenalin auf H9c2-Zellen charakterisiert. Die Arbeitskonzentration wurde aufgrund der bisherigen Datenlage^{101, 102} und den Ergebnissen der erwähnten Vorversuche auf $10\mu\text{M}$ festgelegt (siehe **Abschnitte 1.6.1** und **3.6.4**, S. 13 und 30).

Die Zahl überlebender Zellen 24 Stunden nach CoCl_2 -Behandlung ist sowohl nach sechs als auch nach 24 Stunden in den Proben mit ISO und ohne ISO gleich (siehe **Abbildung 14**). Unterschiede wurden für $\text{CoCl}_2+37^\circ\text{C}$ ohne ISO zu $\text{CoCl}_2+34^\circ\text{C}$ ohne ISO und $\text{CoCl}_2+37^\circ\text{C}$ mit ISO beobachtet.

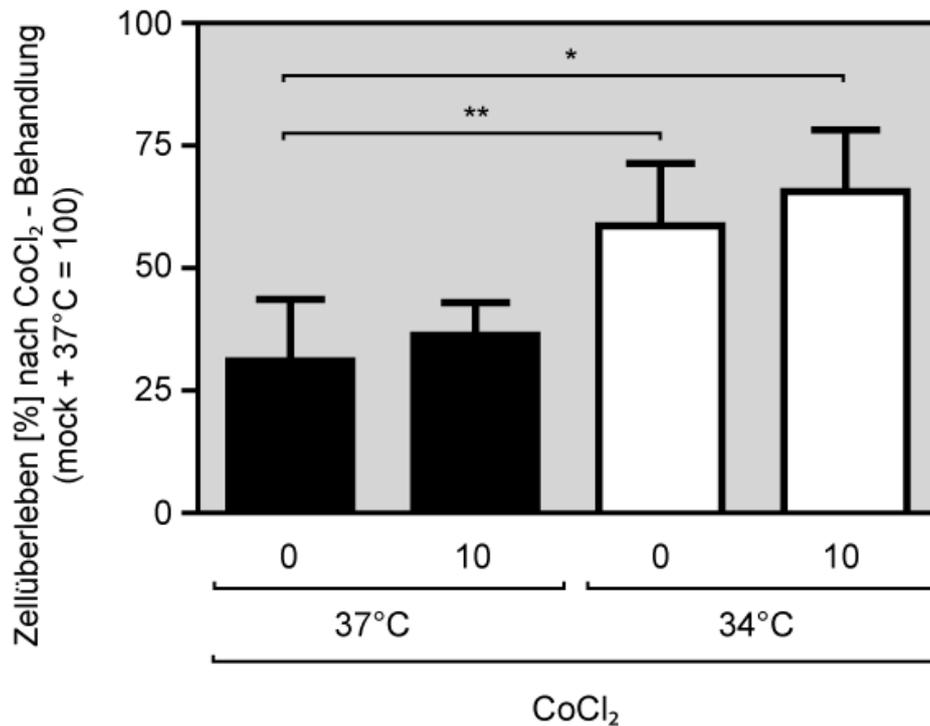


Abbildung 14: Einfluss der additiven Isoprenalin-Applikation auf das Überleben von H9c2-Zellen.

Zellüberleben von H9c2-Zellen nach einer CoCl_2 -Behandlung mit anschließender Inkubation für 24 Stunden mit Isoprenalin unter Hypothermie und Normothermie. Alle gezeigten Proben wurden mit CoCl_2 behandelt. x-Achse: Isoprenalin-Konzentration in μM . y-Achse: Zellüberleben in $\% \pm \text{SD}$. mock+37° = 100%. Kontrolle = mock+37°C-ISO = 100% [$\pm\text{SD}$]. Es gibt innerhalb einer Temperaturgruppe keinen signifikanten Unterschied durch die Inkubation mit Isoprenalin. Beide Proben hypothermer H9c2-Zellen weisen eine signifikant höhere Zellzahl auf als 37°C-ISO. Zu 37°C+ISO gibt es keinen signifikanten Unterschied. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.9 Einfluss von Propofol auf H9c2-Zellen nach einer CoCl_2 -Behandlung

Die klinische Hypothermie-Behandlung von erfolgreich reanimierten Patienten nach einem Herz-Kreislaufstillstand erfolgt in Sedierung und Relaxation. Daher wurde auch die Wirkung von Propofol auf das Apoptoseverhalten von CoCl_2 -behandelten H9c2-Zellen untersucht (siehe **Abschnitte 1.6.2** und **3.6.4**, S. 14 und 30).

Für keine Konzentration von Propofol wurde ein signifikanter Unterschied der Zellvitalität gegenüber mock-behandelten H9c2-Zellen beobachtet (siehe **Abbildung 15**). Sowohl unter Normothermie als auch unter Hypothermie lag die Zahl überlebender Zellen mit 500 μM Propofol unter den Proben mit 100 μM . Die Zahl überlebender Zellen lag den hypothermen Proben über fast allen normothermen Proben.

Einzig die normothermen Proben mit 100 μM wiesen keinen signifikanten Unterschied zu den hypothermen Proben auf.

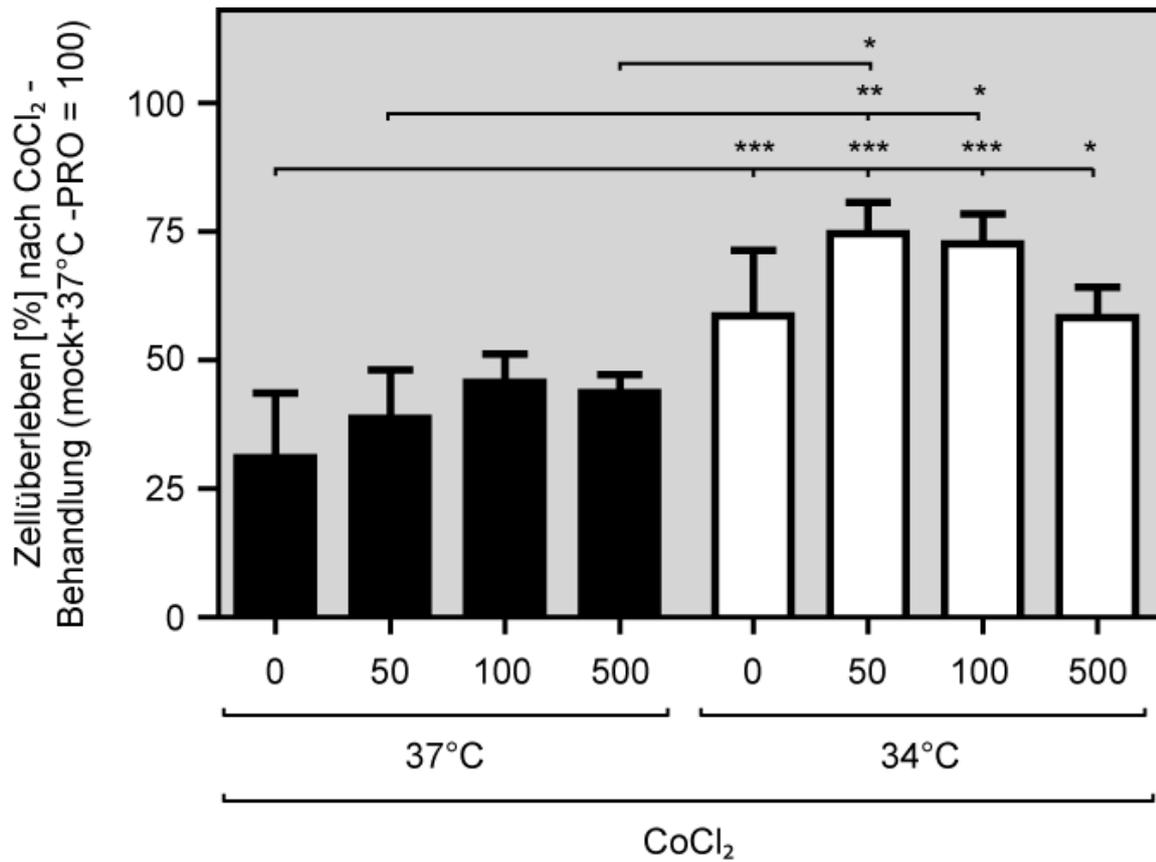


Abbildung 15: Einfluss der additiven Propofol-Applikation auf das Überleben von H9c2-Zellen.

Zellüberleben von H9c2-Zellen nach einer CoCl_2 -Behandlung mit anschließender Inkubation für 24 Stunden mit Propofol unter Hypothermie und Normothermie. x-Achse: Propofol Konzentration in μM . y-Achse: Zellüberleben in % \pm SD. mock+37°C -PRO = 100%. Alle illustrierten Proben wurden mit CoCl_2 behandelt. Es gab innerhalb der Temperaturgruppen keinen signifikanten Unterschied durch eine Inkubation mit Propofol. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Kontrolle = mock+37°C-ISO = 100%

5 Diskussion

5.1 Kardioprotektion nach Hypoxie

Hypothermie ist eine vielseitig einsetzbare Methode in der traditionellen und aktuellen Medizin. So findet sie unterschiedliche medizinische Anwendungsbereiche: im herzchirurgischen Bypassverfahren²⁵, nach Asphyxie im Neugeborenenalter²⁴ und nach erfolgreicher kardiopulmonaler Reanimation^{12, 24, 25}. Der Einsatz der therapeutischen Hypothermie erfolgt in diesen Fällen primär zu Neuroprotektion^{11, 12}. Allerdings könnten auch andere Hypoxie anfällige Organe von der systemischen Applikation einer Hypothermie profitieren. Im klinischen Management reanimierter Patienten gilt es neurologische Schäden und eine Kreislaufinstabilität zu vermeiden¹²⁸. Kardioprotektion könnte nach erfolgreicher Reanimation einen Beitrag leisten die Mortalität der Patienten entscheidend zu senken, indem der Myokardschaden verringert und dadurch der Kreislauf stabilisiert wird. Die unzureichende Studienlage erfordert eine weitergehende Untersuchung der Möglichkeiten zur Kardioprotektion. Das Myokard wird durch eine Hypoxie zweizeitig geschädigt. Dies geschieht zum einen während der Hypoxie und zum anderen nach Reoxygenierung. Die Homöostase der Zelle wird durch eine insuffiziente Atmungskette und anfallende Sauerstoffradikale gestört^{129, 130}. Abhängig von der Stärke des hypoxischen Reizes und der zellulären Konstitution überlebt die Zelle oder erleidet den Zelltod.

Anhand des eigens für diese Studie konzipierten *in vitro*-Modells wurde untersucht, ob eine milde Hypothermie (34°C) nach imitierter Hypoxie kardioprotektiv wirken könnte. Mittels Kardiomyoblasten (H9c2-Zellen) wurde gemäß einem Zeit-Temperatur-Protokolls die hypoxische Schädigung des Myokards und die darauffolgende therapeutische Hypothermie simuliert. Anschließend erfolgten Untersuchungen des Zellschadens, der Zellvitalität und des Apoptoseverhaltens. Zusätzlich wurde der mögliche Einfluss des Katecholamins Isoprenalin und des Sedativums Propofol auf das Überleben geschädigter und H9c2-Zellen analysiert.

5.2 Zellüberleben im *in vitro*-Modell

Das *in vitro*-Modell muss die Hypoxie des Myokards und Hypothermie in Anlehnung an die klinische Fragestellung simulieren können. Dabei wurde mit Kobaltchlorid (CoCl₂)

ein etablierter Imitator der Hypoxie für *in vivo*- und *in vitro*-Modelle eingesetzt^{36-39, 42, 45, 46}. Es bestehen jedoch mehrere wesentliche Unterschiede des im Rahmen dieser Arbeit erstmalig vorgestellten Hypoxiemodells zu vorhergehenden Studien mit CoCl₂. Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit impliziert einen kurzen und zeitlich begrenzten hypoxischen Reiz sowie eine anschließende therapeutische Hypothermie. So belief sich die Behandlung vergleichsweise bei Vengellar et al. Fibroblasten auf 48 Stunden mit 100 µM CoCl₂, während sie in dem vorgestellten Modell lediglich eine Stunde betrug³⁷. Nach Versuchen zur Charakterisierung einer einstündigen CoCl₂-Behandlung wurde eine Arbeitskonzentration von 30 mM ausgewählt, die sowohl einen beträchtlichen Zellschaden hervorruft als auch nach 24 Stunden eine ausreichende Menge an überlebenden Zellen gewährleistet (siehe **Abschnitt 4.2**, S. 36). Daher unterscheidet sich das vorgestellte Hypoxiemodell von der beschriebenen Anwendung des CoCl₂ sowohl in der vergleichsweise kurzen Behandlungsdauer als auch hohen Konzentration^{37, 38, 50, 119}. Darüber hinaus verknüpft es erstmalig die CoCl₂-Behandlung mit einer therapeutischen Hypothermie. Aufgrund dieser Unterschiede musste zunächst untersucht werden, ob das CoCl₂ trotz abweichenden Konditionen auch in dem hier entwickelten Modell tatsächlich Hypoxie ähnliche Prozesse simuliert.

Die morphologischen Untersuchungen und quantitative Bestimmung der vitalen Zellen zeigten 24 Stunden nach der Behandlung mit zunehmender CoCl₂-Konzentration eine geringere Zahl vitaler H9c2-Zellen (siehe **Abschnitt 4.2**, S. 36). Es galt die Ursache für diese Beobachtung zu eruieren, da für H9c2-Zellen als Kardiomyoblasten auch die Proliferationseigenschaften berücksichtigt werden müssen^{28, 29}. Deswegen erfolgte eine Differenzierung zwischen Zellschaden und einer verminderten Proliferation. In der Propidiumjodidfärbung und auch in der Untersuchung intrazellulärer Signalwege wurde ein Zellschaden nach der CoCl₂-Behandlung und eine Aktivierung der intrinsischen Apoptose beobachtet (siehe **Abschnitte 4.3, 4.6** und **4.7**, S. 39, 43 und 48).

Hypoxie, ob in physikalischer oder chemisch induzierter Form, konnte eine mögliche Ursache für den beobachteten Schaden der H9c2-Zellen sein. Um den Charakter des Zellschadens im Rahmen des *in vitro*-Modells zu untersuchen, wurde daher ein Hypoxie spezifisches Protein betrachtet (siehe **Abschnitt 4.4**, S. 41). Der Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1) ist einer von mehreren wichtigen Proteinen, die durch eine mangelnde Oxygenierung die Signalwege und den Stoffwechsel der Zelle maßgeblich beeinflussen⁴⁴ (siehe **Abschnitt 1.4.1**, S. 5). Der Transkriptionsfaktor HIF-1 akkumuliert unter

Hypoxie und wird bei Reoxygenierung wieder abgebaut¹³¹. In der immunocytochemischen Färbung von H9c2-Zellen konnte 15 Minuten nach Beendigung der einstündigen CoCl₂-Behandlung die Stabilisierung von HIF-1 α , einem Bestandteil des Dimers HIF-1 nachgewiesen werden (siehe **Abschnitt 4.4**, S. 41). Die mit Immunfluoreszenz spezifisch gefärbten HIF-1 α -Moleküle stabilisierten im gesamten Zytosol und akkumulierten vor allem in Kernnähe. Die Färbung mock-behandelter Zellen (Normalmedium) zeigte hingegen keine spezifische Färbung. Der Nachweis einer erhöhten Konzentration des Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1) in CoCl₂-behandelten Zellen lässt auf die Induktion Hypoxie typischer intrazellulärer Signalwege schließen und deckt sich mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen^{37, 38, 50, 119, 131}. Somit ist CoCl₂ auch mit einer Konzentration von 30 mM als Imitator der Hypoxie im *in vitro*-Modell suffizient. Die mit CoCl₂ imitierte Hypoxie führte zur Vitalitätsabnahme und zum Zelltod der H9c2-Zellen. Dieses Ergebnis deckt sich mit der vorausgehenden Datenlage^{36, 116, 117}.

Diese Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist Effekte der Hypothermie und ausgewählter Medikamente auf Hypoxie geschädigte Kardiomyoblasten anhand des neu entwickelten *in vitro*-Modells zu untersuchen.

5.2.1 Zellüberleben nach Behandlung mit CoCl₂ und milder Hypothermie

Die Ergebnisse oben angeführter, bisheriger Untersuchungen können um neue Beobachtungen zum Einfluss der therapeutischen Hypothermie auf das Überleben von H9c2-Zellen nach einer Hypoxie erweitert werden. Das Ausmaß des beobachteten Schadens war in H9c2-Zellen sowohl unter Hypothermie als auch unter Normothermie über den gesamten Beobachtungszeitraum fortschreitend. Während sich dies mit der vorhandenen Datenlage noch deckt, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit darüber hinaus in den therapeutisch gekühlten H9c2-Zellen 24 Stunden nach CoCl₂-Behandlung eine signifikant höhere Zahl vitaler Zellen beobachtet werden. Lin et al. hatten einer höheren Zellvitalität durch den prophylaktischen Einsatz von Hypothermie während einer ischämischen Schädigung von H9c2-Zellen beobachtet¹³². Huang et al hatten in einem Modell mit H9c2-Zellen oxidativen Stress simuliert und konnten durch vorherigen Beginn einer Kühlung auf 31°C ebenfalls einen protektiven Effekt für prophylaktische Hypothermie beobachten¹³³. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie belegen jedoch, dass Hypothermie trotz Anwendungsbeginn nach der Hypoxie eine effiziente

Methode ist, um die Vitalität von Kardiomyoblasten zu erhöhen. Mochizuki et al. hatten berichtet, dass im Tiermodell einer linksventrikulären Ischämie eine therapeutische Hypothermie von 34°C das Infarktareal von 54,2% auf 23,5% reduziert¹³⁴. Im *in vitro*-Modell der vorliegenden Arbeit konnte allerdings sechs Stunden nach CoCl₂-Behandlung kein statistisch signifikanter Unterschied in der Zellzahl normothermer und hypothermer H9c2-Zellen festgestellt werden. Dies lässt vermuten, dass der zelluläre Mechanismus der hypothermen Kardioprotektion länger als sechs Stunden benötigt, um einen signifikanten Effekt auf die Vitalität zu entwickeln. Die Möglichkeit einer solchen dynamischen Entwicklung der Kardioprotektion erfordert eine Charakterisierung in weiteren Untersuchungen.

5.2.2 Einfluss von Propofol und Isoprenalin auf das Zellüberleben

Ein weiteres Ziel der Studie war die Untersuchung des Einflusses zweier Wirkstoffgruppen auf Hypoxie geschädigte H9c2-Zellen, die im Rahmen einer intensivmedizinischen Behandlung zum Einsatz kommen.

Im Rahmen der therapeutischen Hypothermie wird eine Sedierung und Relaxation der Patienten aufrechterhalten, um ein Muskelzittern zu verhindern^{11, 12}. Nach Midazolam ist Propofol das am häufigsten eingesetzte Sedativum in deutschen Intensivpflegeeinrichtungen¹⁰⁷. In Tier- und *in vitro*-Modellen wurde unter oxidativem Stress eine protektive Wirkung Propofols auf das Myokard beschrieben^{111-113, 135}. Hierbei soll insbesondere die verstärkte Expression von Bcl-2 eine wichtige Rolle spielen^{113, 135}. Der Effekt einer simultanen Anwendung von Propofol und Hypothermie auf Hypoxie geschädigte H9c2-Zellen wurde anhand des vorliegenden Zeit-Temperatur-Protokolls untersucht. Die Behandlung der H9c2-Zellen mit 30 mM CoCl₂ und eine anschließende Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Propofol (50 µM, 100 µM, 500 µM) führten zu unerwarteten Ergebnissen. Gemäß der Datenlage war zu erwarten, dass zumindest eine Propofol-Probe nach einer Hypoxie durch den beigesezten Wirkstoff eine höhere Zellviitalität aufweist als mock-behandelte Kontrollen (Normalmedium).

Interessanterweise zeigte die Inkubation mit Propofol im vorliegenden *in vitro*-Modell für keine der untersuchten Konzentrationen und Temperaturgruppen einen signifikanten Effekt auf die Zellzahl (siehe **Abschnitt 4.9**, S. 51). Diese Beobachtung weicht daher von den vorher angeführten Ergebnissen ab^{111-113, 135}. Tendenziell lag die Zahl vitaler

Zellen sowohl unter Normothermie als auch unter Hypothermie für alle untersuchten Konzentrationen höher als unter mock-Inkubation. Am deutlichsten beobachtete man diesen Trend unter Normothermie mit 50 μM Propofol und unter Hypothermie mit 100 μM Propofol. Durch die Inkubation normothermer H9c2-Zellen mit Propofol aller Konzentrationen wurde der signifikante Unterschied zu hypothermen H9c2-Zellen aufgehoben. Die Zellvitalität von H9c2-Zellen mit 500 μM Propofol lag in der Tendenz niedriger als mit 50 μM oder 100 μM . Unter Hypothermie ist diese Beobachtung deutlicher ausgeprägt gewesen als unter Normothermie. Das Zellüberleben in der Gruppe hypothermer Zellen mit 500 μM ist soweit gesunken, dass ähnlich der alleinigen Hypothermie-Monotherapie kein Unterschied zu den normothermen Gruppen mit Propofol besteht. Es sollte graduiert im Bereich von 50 μM und 100 μM nach einem möglichen protektiven Effektmaximum des Propofol geforscht werden. Die Beobachtung einer sinkenden Zellzahl in hoher Konzentration des Propofols kann auch für die Untersuchung möglicher zytotoxischer Mechanismen von Interesse sein.

Die Gabe von Katecholaminen ist in den Leitlinien für erweiterte lebensrettende Maßnahmen festgehalten und hat sich in der Stabilisierung der Hämodynamik bewährt⁹⁹. Jedoch zeigen bisherige Studien kontroverse Ergebnisse zur Wirkung von Katecholaminen auf die Zellvitalität: Einige Untersuchungen haben für steigende Konzentrationen mehrerer Katecholamine zytotoxische Effekte gezeigt^{101, 102}. Andere Studien hingegen haben eine zytoprotektive Wirkung durch die Aktivierung adrenerger Rezeptoren belegt^{103, 105}. Eine mögliche Erklärung der gegensätzlichen Ergebnisse bieten die Beobachtungen von Zaugg et al¹⁰². Diese legen nahe, dass eine zytotoxische Wirkung am ehesten durch die Aktivierung von β_1 -Adrenozeptoren vermittelt wird und β_2 -Adrenozeptoren in dieser Hinsicht eine untergeordnete Rolle spielen: Die Katecholaminwirkung sei daher abhängig vom Typ der aktivierten Adrenozeptoren. H9c2-Zellen verfügen sowohl über β_1 - als auch β_2 -Adrenozeptoren¹³⁶.

Im vorliegenden *in vitro*-Modell wurde die Wirkung des unselektiven β -Agonisten Isoprenalin auf das Überleben Hypoxie geschädigter H9c2-Zellen untersucht. Vorversuche zeigten eine Erhöhung der Zellaktivität mit steigender Konzentration des Isoprenalins. Aufgrund der Ergebnisse und der vorbeschriebenen Anwendung im Rahmen von *in vitro*-Modellen^{103, 105, 137} wurden 10 μM als Arbeitskonzentration des Isoprenalins ausgewählt. Mit 10 μM wurde der höchstmögliche Wirkungsspiegel ausgewählt, der keine signifikante Auswirkung auf die Zellaktivität hatte. Im vorliegenden *in vitro*-Modell zeigte

die Inkubation mit 10 µM Isoprenalin überraschend keinen signifikanten Effekt auf das Überleben CoCl₂-behandelter gegenüber mock-behandelten Proben der gleichen Temperatur (siehe **Abschnitt 4.8**, S. 50). Weder wurde ein zytotoxischer noch ein protektiver Effekt beobachtet. In der statistischen Analyse gleicht die zusätzliche Inkubation mit Isoprenalin den signifikanten Unterschied zwischen Hypoxie behandelten hypothermen und normothermen Zellen aus.

5.3 Apoptose nach einer simulierten Hypoxie

5.3.1 Wirkung der milden Hypothermie auf Bcl-2-Proteine

Die Bcl-2 Proteinfamilie spielt eine herausragende regulatorische Rolle für die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran und die intrinsische Apoptose^{63, 65, 66}. Bcl-2 und Bcl-2 associated protein (Bax) sind antagonistisch wirkende Mitglieder dieser Proteinfamilie (siehe **Abschnitt 1.5.1**, S. 9). Im vorliegenden *in vitro*-Modell konnte unter Hypothermie eine niedrigere Expression des pro-apoptotischen Bax beobachtet werden. Die Regulation des pro-apoptotischen Proteins Bax hat nach sechs Stunden unter Hypothermie einen Trend zur Reduktion und nach vierundzwanzig Stunden eine signifikante Verminderung gezeigt (siehe **Abschnitt 4.6.1**, S. 43). Die Ergebnisse zeigen trotz hoher Standardabweichung der einzelnen Proben, dass die Hypothermie durchaus früh die Regulation des pro-apoptotischen Proteins Bax zu beeinflussen vermag. Die Arbeitsgruppe für Grundlagenforschung in der Kinderkardiologie hatte gezeigt, dass oxidativer Stress während einer Phase tiefer Hypothermie (20°C), der sogenannten prophylaktischen Hypothermie, weniger Apoptose auslöst als unter Normothermie¹³⁸. Allerdings unterscheidet sich die milde Hypothermie (34°C) des vorliegenden *in vitro*-Modells schon per se von der tiefen Hypothermie der erwähnten Untersuchungen (20°C).

Daher liegt eine neue Erkenntnis der vorliegenden Arbeit hinsichtlich des Proteins Bax darin, dass bereits eine Kühlung von H9c2-Zellen um 3°C die Bax-Expression im Sinne einer anti-apoptotischen Wirkung effektiv senkt. Darüber hinaus ist eine weitere neue Feststellung, dass auch die therapeutische Hypothermie in H9c2-Zellen nach einer Hypoxie die Regulation des Bax deutlich senkt.

Bcl-2 wirkt als Antagonist von Bax, indem es die Wirkung pro-apoptotischer BH3-Proteine inhibiert und die Oligomerisierung von Bax an der mitochondrialen Membran direkt hemmen kann^{66, 87}. Nach simulierter Hypoxie hat sich die Expression von Bcl-2 sechs Stunden nach simulierter Hypoxie unter Normothermie und Hypothermie nicht unterschieden. Nach vierundzwanzig Stunden war jedoch die Expression von Bcl-2 unter Hypothermie signifikant niedriger (siehe **Abschnitt 4.6.1**, S. 43).

Diese Beobachtung weicht von der bisherigen Datenlage ab, die eine stärkere Expression von Bcl-2 in Hypothermie behandelten Zellen zeigte¹³⁸. Allerdings unterscheidet sich das erwähnte *in vitro*-Modell durch den Einsatz einer prophylaktischen Hypothermie, bei der die Zellen erst in der Kühlungsphase einer Noxe ausgesetzt wurden. Die erhöhte Expression des Bcl-2 wurde nach der Wiedererwärmung zuvor gekühlter Zellen gemessen. Ein weiterer Unterschied neben der zeitlichen Anwendung ist die Tiefe der Hypothermie. Die Abweichung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und der vorbeschriebenen Studie in der Bcl-2-Regulation ist daher am ehesten auf einen der beiden angeführten Faktoren zurückzuführen. Beide Möglichkeiten wären für weitergehende Untersuchungen von Interesse. Zum einen könnte eine unterschiedliche Graduierung der Hypothermie dasselbe Protein in unterschiedliche Richtungen regulieren, zum anderen könnten prophylaktische und therapeutische Hypothermie unterschiedliche zelluläre Mechanismen beeinflussen, die dennoch jeweils einen protektiven Effekt entwickeln.

Die Regulation einzelner Proteine der Bcl-2-Familie verfügt nur über eine geringe Aussagekraft zur Freisetzung von Cytochrom C und dem Fortgang der intrinsischen Apoptose, da diese im Zusammenspiel antagonistischer Bcl-2-Proteine reguliert werden. Das Verhältnis der Aktivität aller Bcl-2 Proteine besitzt daher eine größere Aussagekraft als einzelne Bestandteile des Systems. Aufgrund der inzwischen bekannten weiten Verzweigung der teilhabenden Proteine, wurde bereits in anderen Studien stellvertretend das Verhältnis der antagonistischen Hauptakteure wie Bax und Bcl-2 untersucht⁹³. Die Ratio Bax / Bcl-2 kann zwar nicht uneingeschränkt den weiteren Ablauf der intrinsischen Apoptose wiedergeben, aber dennoch als Apoptoseindikator fungieren.

Im vorliegenden *in vitro*-Modell sinkt unter Hypothermie die Expression des pro-apoptotischen Bax verhältnismäßig schneller und stärker als die des anti-apoptotischen Bcl-2. Die Expression des Bcl-2 ist nach sechs Stunden bei normothermen und hypothermen Zellen ähnlich. Da die beobachtete Senkung nach vierundzwanzig Stunden

unter Hypothermie in ihrem Umfang kleiner ist als die des Bax, ist die Ratio Bax / Bcl-2 ist unter Hypothermie zugunsten von Bcl-2 verschoben. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die anti-apoptotische Wirkung der Hypothermie auf die untersuchten Bcl-2 Proteine insgesamt überwiegt.

5.3.2 Wirkung der milden Hypothermie auf die Caspase 3

Die Caspase 3 nimmt sowohl für die intrinsische als auch für die extrinsische Apoptose eine Schlüsselfunktion ein, indem sie weitere sogenannte exekutive Caspasen (Caspase 6 und 7) aktiviert⁶⁹. Die Regulation der Caspase 3 bietet daher einen Einblick in die Apoptoseaktivität einer Zelle (siehe **Abschnitt 1.5.2**, S. 12).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sowohl sechs als auch vierundzwanzig Stunden nach simulierter Hypoxie unter Hypothermie eine signifikant niedrigere Caspase 3-Aktivität als in normothermen Kontrollen vorliegt (siehe **Abschnitt 4.6.2**, S. 46). Außerdem weisen sie darauf hin, dass Hypothermie per se keinen Reiz für eine Apoptose darstellt. Die Aktivität der exekutiven Caspasen konnte durch die immunzytochemische Untersuchung gespaltenen Keratins 18 qualitativ nachgewiesen werden, wobei unter Normothermie eine größere Menge von Spaltprodukten beobachtet wurde als unter Hypothermie. Die proteolytische Spaltung des Caspasesubstrates hat sich durch die Hypothermie im zeitlichen Auftreten verzögert und im Ausmaß vermindert gezeigt. Die quantitative Untersuchung der Caspase 3-Aktivität in H9c2-Zellen hat unter Hypothermie eine signifikante Reduktion sechs und 24 Stunden nach simulierter Hypoxie aufgewiesen.

Interessanterweise ist der beobachtete Unterschied in der Caspase 3-Aktivität nach sechs Stunden größer als nach vierundzwanzig Stunden gewesen. Dies kann gemeinsam mit der erhöhten Zellvitalität (siehe **Abschnitt 4.5**, S. 42) darauf hinweisen, dass die therapeutische Hypothermie sehr früh nach dem Schaden die Regulation der Apoptose im Sinne einer Zellprotektion beeinflusst, wobei dieser Effekt im Verlauf abnimmt.

So ergibt sich das Bild eines Zeitfensters in der Applikation der therapeutischen Hypothermie nach hypoxischer Schädigung, das sowohl auf das *in vitro*-Modell als auch auf klinische Beobachtungen beim Einsatz der therapeutischen Hypothermie zutrifft^{139, 140}. Sowohl *in-vivo* als auch *in vitro* hat die frühzeitige Kühlung einen erheblichen Einfluss auf

das Ausmaß der Protektion. Die Analogie der klinischen Beobachtungen und des untersuchten zellulären Mechanismus' legen weitere Zusammenhänge in der Anwendung therapeutischer Hypothermie nahe, die untersucht werden müssen. Es gibt bisher keine evidenzbasierten Empfehlungen zum Einsatz der Hypothermie im Sinne der Kardioprotektion¹⁴¹. Allein eine Subgruppe von Patienten mit AMI, die frühzeitig eine Körperkern-temperatur von 35,8°C erreicht hatte, zeigten ein vermindertes Infarktareal¹⁴¹.

Die herausragende Rolle der Zeit für die protektive Wirkung der therapeutischen Hypothermie macht die Optimierung von klinischen Kühlungsprotokollen zu einem Hauptanliegen künftiger Forschungen. Dadurch könnten neue Einsatzgebiete der Hypothermie zur Kardioprotektion erschlossen werden.

6. Schlussfolgerung

In der vorliegenden laborexperimentellen Promotionsarbeit wurde anhand eines *in vitro*-Modells von Kardiomyoblasten (H9c2-Zellen) die Wirkung von simulierter Hypoxie und milder Hypothermie auf die Zellvitalität und intrazellulären Signalwege der Apoptose untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss eines β -Agonisten (Isoprenalin) und von Propofol auf die Zellvitalität analysiert.

Das *in vitro*-Modell von Kardiomyoblasten ist gut geeignet, um unbekannte Aspekte der Hypothermie zu untersuchen. Anhand des vorliegenden Zellkulturmodells können grundlegende zelluläre Mechanismen der therapeutischen Hypothermie erforscht werden. Solche Modelle dienen dem besseren Verständnis klinischer Beobachtungen und ermöglichen damit die Weiterentwicklung der Therapiemöglichkeiten. Jedoch kann ein Modell nicht die komplexe Physiologie und Pathophysiologie eines vollständigen Organismus widerspiegeln. Des Weiteren kann ein Hypoxie-Imitator wie CoCl_2 nicht das vollständige Wirkungsspektrum einer Hypoxie darbieten.

Die Anwendung milder Hypothermie zeigte in der vorliegenden Arbeit sowohl in der Regulation als auch in der Exekution der intrinsischen Apoptose einen anti-apoptotischen Effekt. Dieser spiegelt sich in einer erhöhten Zellvitalität gegenüber normothermen Zellen wider. Wichtig für den beobachteten protektiven Effekt ist der frühzeitige Beginn der Hypothermie, da vor allem in den frühen Proben eine anti-apoptotische Regulation der Proteine beobachtet wurde. Interessanterweise zeigt die zusätzliche Gabe von Propofol oder Isoprenalin unter Hypothermie in diesem Modell keine Wirkung signifikanten Ausmaßes auf die Zellvitalität.

7. Ausblick

Mit dem Verständnis grundlegender Aspekte zellulärer Mechanismen können Studien in Tiermodellen und klinische Studien sinnvoll vorangetrieben werden. Nur auf diesem Weg ist die eine ethisch vertretbare Entwicklung neuer Konzepte zum Einsatz der Hypothermie in der Therapie des hypoxischen Myokards zu ermöglichen. Daher bieten die erhobenen Ergebnisse und daraus resultierenden Erkenntnisse eine gute Basis für weitergehende Untersuchungen.

Klinisch ist neben der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Vitalität auch die Funktion des Myokards für die Hämodynamik von Bedeutung. So könnte die Untersuchung des zellulären Gehaltes an Calcium und ATP Hinweise auf den funktionellen Einfluss der Hypothermie auf Herzmuskelzellen liefern. Ein myokardiales *in vitro*-Modell einer kontrahierenden Zelllinie würde eine Untersuchung des chronotropen, inotropen und lusitropen Einflusses der Hypothermie auf geschädigte Myokardzellen ermöglichen.

Die Aktivität von p53 unter Hypothermie und die Wechselwirkung mit HIF-1 α sind weitere interessante Aspekte. Des Weiteren könnten die Signalwege der regulierten Proteine weiter charakterisiert werden. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse böten die Möglichkeit neue pharmakologische Interventionsstrategien zu erarbeiten. Die Entwicklung eines pharmakologischen Imitators der Hypothermie könnte deren Anwendung auch in Versorgungseinheiten ermöglichen, denen die Ausrüstung zur Durchführung und Überwachung einer physikalischen Hypothermie fehlt.

Basierend auf den vorgestellten Ergebnissen wurden bereits weitere Untersuchungen initiiert. Das Zeit-Temperatur-Protokoll wurde inzwischen an neue klinische Leitlinien in der Anwendung der Hypothermie adaptiert. Die beobachteten Effekte der Hypothermie auf hypoxisch geschädigte Zellen werden nun in einer simulierten Ischämie untersucht. Diese beinhaltet neben einer physikalischen Hypoxie auch die Behandlung mit Mangelmedium. Die Wiedererwärmung gilt in der Anwendung von Hypothermie als kritische Phase. Daher wird im Rahmen weiterer Untersuchungen nun untersucht, inwiefern die kardioprotektiven Effekte therapeutischer Hypothermie durch unterschiedliche Modi der Wiedererwärmung zu beeinflussen sind.

8. Zusammenfassung

Die vorliegende laborexperimentelle Promotionsarbeit wurde im Zeitraum vom 1.01.2010 bis zum 30.04.2011 im Forschungslabor der Abteilung für angeborene Herzfehler und Kinderkardiologie des Deutschen Herzzentrums unter der Leitung von Frau PD Dr. Katharina R.L. Schmitt durchgeführt.

Die therapeutische Hypothermie zur Neuroprotektion ist inzwischen ein etablierter Bestandteil der Therapieleitlinien nach Asphyxie des reifen Neugeborenen und nach erfolgreicher Reanimation Erwachsener bei einem Herzkreislaufstillstand aufgrund ventrikulärer Tachykardien^{23, 24}. Die zellulären Mechanismen, die durch eine Hypoxie im zentralen Nervensystem beeinflusst werden, weisen Ähnlichkeiten mit den pathologischen Mechanismen im hypoxischen Myokard auf¹⁵. Hypoxische Episoden des Myokards treten im Rahmen eines akuten Koronarsyndroms oder eines Herzkreislaufstillstandes auf. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss milder Hypothermie (34°C) auf das Myokard nach einer simulierten Hypoxie untersucht. Darüber hinaus erfolgte die Betrachtung einer zusätzlichen Behandlung mit dem Katecholamin Isoprenalin und dem Sedativum Propofol auf das Zellüberleben nach Hypoxie.

Eigens für diese Untersuchungen wurde ein *in vitro*-Modell von Kardiomyoblasten (H9c2-Zellen) entwickelt, welches eine Hypoxie des Myokards mit anschließender therapeutischer Hypothermie simuliert. Die H9c2-Zellen wurden für eine Stunde mit dem Hypoxie-Imitator CoCl₂ [30µM] behandelt und anschließend für 24 Stunden bei 34°C inkubiert. Zusätzlich wurden nach der simulierten Hypoxie einige H9c2-Zellen mit Isoprenalin oder Propofol behandelt. Es erfolgte eine Analyse des Schadens, der Zellvitalität und intrazellulärer Signalwege zu mehreren Zeitpunkten bis zu 48 Stunden nach der simulierten Hypoxie.

H9c2-Zellen weisen unter Hypothermie nach einer simulierten Hypoxie eine höhere Zellvitalität auf als mit normothermer Behandlung. Die zusätzliche Gabe von Propofol oder Isoprenalin zeigten in den untersuchten Dosen und Temperaturen keinen Effekt auf das Zellüberleben. Die selektive Untersuchung von Proteinen belegte eine Regulation der intrinsischen Apoptose durch Hypothermie: Das Verhältnis der antagonistischen Proteine Bax (pro-apoptotisch) und Bcl-2 (anti-apoptotisch) wurde durch die Behandlung mit Hypothermie zugunsten von Bcl-2 verändert. Die Aktivität der Caspase 3, eines Schlüsselproteins der Apoptose, wurde durch die therapeutische Hypothermie reduziert.

Der beobachtete Effekt auf die Caspase 3-Aktivität war in der frühen Phase nach simulierter Hypoxie stärker und nahm im Verlauf ab. Unter Hypothermie wurden Spaltprodukte eines zytoskelettalen Caspase-Substrates (Cytokeratin 18) zeitlich verzögert und in geringerem Ausmaß beobachtet.

Die Ergebnisse dieser Forschungsarbeit zeigen, dass die frühzeitige Applikation milder Hypothermie (34°C) den Myokardschaden nach Hypoxie vermindern kann. Die kardioprotektive Wirkung ist auf eine Regulation der Apoptose in der Frühphase nach der Hypoxie zurückzuführen. Isoprenalin und Propofol zeigen im vorliegenden *in vitro*-Modell keinen Einfluss auf das Zellüberleben.

9. Abstract

Therapeutic hypothermia is an established method for treatment of newborn infants after perinatal asphyxia and resuscitation of adults from cardiac arrest following ventricular fibrillation. The pathogenic cellular mechanisms of hypoxic insult to the central nervous system and myocardium are similar. Myocardial hypoxia occurs in the context of acute coronary syndrome or cardiac arrest. This study analyzes the effect of mild hypothermia (34°C) on myocardium after a hypoxic episode *in vitro*. Furthermore, the effect of isoprenaline or propofol in conjunction with mild hypothermia following hypoxia was investigated.

An ad hoc *in vitro* model consisting of the H9c2 rat cardiomyoblast cell line was developed to investigate myocardial hypoxia and subsequent application of hypothermia. H9c2 cells were incubated with hypoxic mimetic agent CoCl₂ [30 mM] at 37 °C for an hour followed by cooling to 34 °C for an additional 24 hours. Furthermore, a second sample group is treated with isoprenaline or propofol following induced hypoxia. Cell damage, viability, and intracellular signals in comparison to normothermic controls are investigated.

Following simulated hypoxia, a significantly higher cell viability was shown in hypothermic groups as compared to normothermic controls. Treatment with isoprenaline or propofol showed no significant additional cardioprotective effect at the dosage analyzed. In fact, the addition of either drug further minimized the difference in viability between normothermic and hypothermic groups.

In a study of the intrinsic apoptotic pathway, several proteins were verified to be regulated by hypothermia. The proportion of anti-apoptotic Bcl-2 to pro-apoptotic Bax changes in favor of increasing Bcl-2 in the hypothermic treated H9c2 cells. In addition, the level of activity for Caspase 3, a key protein for apoptosis, is reduced under hypothermia. This effect was observed to a greater extent at the earlier time points following hypoxia and decreased throughout the duration of the experiment. Finally, fission products of the cytoskeletal caspase substrate, keratine 18, were seen with a delay and to a lesser extent in hypothermia treated cells.

The results of this study demonstrate the cardioprotective effect of mild hypothermia (34°C), if applied immediately following hypoxic insult. This influence is mainly due to a

reduction in apoptotic activity at the early stages of cell damage. The additional application of Isoprenaline and Propofol showed no effect on the cell viability.

Whether the observed effect can be used in a clinical setting in order to reduce the overall mortality after resuscitation has to be investigated in further studies.

Literaturverzeichnis

1. Atwood C, Eisenberg MS, Herlitz J, Rea TD. Incidence of EMS-treated out-of-hospital cardiac arrest in Europe. *Resuscitation*. 2005;67(1):75-80.
2. Grasner J-T, Wnent J, Seewald S, Meybohm P, Fischer M, Paffrath T, Wafaisade A, Bein B, Lefering R, German Resuscitation Registry Working Group TRotGS-fts. Cardiopulmonary resuscitation traumatic cardiac arrest - there are survivors. An analysis of two national emergency registries. *Critical Care*. 15(6):R276.
3. Atkins DL, Everson-Stewart S, Sears GK, Daya M, Osmond MH, Warden CR, Berg RA, Investigators tROC. Epidemiology and Outcomes From Out-of-Hospital Cardiac Arrest in Children. *Circulation*. 2009;119(11):1484-1491.
4. Nolan JP, Neumar RW, Adrie C, Aibiki M, Berg RA, Bottiger BW, Callaway C, Clark RS, Geocadin RG, Jauch EC, Kern KB, Laurent I, Longstreth WT, Merchant RM, Morley P, Morrison LJ, Nadkarni V, Peberdy MA, Rivers EP, Rodriguez-Nunez A, Sellke FW, Spaulding C, Sunde K, Hoek TV. Post-cardiac arrest syndrome: epidemiology, pathophysiology, treatment, and prognostication. A Scientific Statement from the International Liaison Committee on Resuscitation; the American Heart Association Emergency Cardiovascular Care Committee; the Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; the Council on Cardiopulmonary, Perioperative, and Critical Care; the Council on Clinical Cardiology; the Council on Stroke. *Resuscitation*. 2008;79(3):350-379.
5. Stefanon I, dos Santos L, Baldo MP. Remodeling in the ischemic heart: the stepwise progression for heart. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 44:890-898.
6. Xu T, Tang W, Ristagno G, Wang H, Sun S, Weil MH. Postresuscitation myocardial diastolic dysfunction following prolonged ventricular fibrillation and cardiopulmonary resuscitation. *Crit Care Med*. 2008;36(1):188-192.
7. Polderman KH. Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia. *Crit Care Med*. 2009;37(7 Suppl):S186-202.
8. Bes S, Roussel P, Laubriet A, Vandroux D, Tissier C, Rochette L, Athias P. Influence of deep hypothermia on the tolerance of the isolated cardiomyocyte to ischemia-reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33(11):1973-1988.
9. A. Diestel CD, F. Berger, K.R.L. Schmitt. Hypothermia protects cardiomyocytes from H₂O₂ induced apoptosis. *International Journal of cardiology* 2010.
10. 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):1101-1120.
11. 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):557-563.
12. HACA. Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest. *N Engl J Med*. 2002;346(8):549-556.

13. Biarent D, Bingham R, Richmond S, Maconochie I, Wyllie J, Simpson S, Nunez AR, Zideman D. European Resuscitation Council guidelines for resuscitation 2005. Section 6. Paediatric life support. *Resuscitation*. 2005;67 Suppl 1:S97-133.
14. 2005 American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Circulation*. 2005;112(24 Suppl):IV1-203.
15. Parham W, Edelstein K, Unger B, Mooney M. Therapeutic hypothermia for acute myocardial infarction: past, present, and future. *Crit Care Med*. 2009;37(7 Suppl):S234-237.
16. Hamamoto H, Leshnowar BG, Parish LM, Sakamoto H, Kanemoto S, Hinmon R, Miyamoto S, Gorman Iii JH, Gorman RC. Regional Heterogeneity of Myocardial Reperfusion Injury: Effect of Mild Hypothermia. *The Annals of Thoracic Surgery*. 2009;87(1):164-171.
17. Kelly FE, Nolan JP. The effects of mild induced hypothermia on the myocardium: a systematic review. *Anaesthesia*.65(5):505-515.
18. Götberg M, van der Pals J, Olivecrona GK, Götberg M, Koul S, Erlinge D. Mild hypothermia reduces acute mortality and improves hemodynamic outcome in a cardiogenic shock pig model. *Resuscitation*.81(9):1190-1196.
19. Fink EL, Clark RS, Kochanek PM, Bell MJ, Watson RS. A tertiary care center's experience with therapeutic hypothermia after pediatric cardiac arrest*. *Pediatr Crit Care Med*. 2010;11(1):66-74.
20. Hsu CY, Huang CH, Chang WT, Chen HW, Cheng HJ, Tsai MS, Wang TD, Yen ZS, Lee CC, Chen SC, Chen WJ. Cardioprotective effect of therapeutic hypothermia for postresuscitation myocardial dysfunction. *Shock*. 2009;32(2):210-216.
21. Jacobshagen C, Pelster T, Pax A, Horn W, Schmidt-Schweda S, Unsold BW, Seidler T, Wagner S, Hasenfuss G, Maier LS. Effects of mild hypothermia on hemodynamics in cardiac arrest survivors and isolated failing human myocardium. *Clin Res Cardiol*.
22. Depenbusch-Landgraber G. Perioperative Temperaturregulation bei Kindern. *intensiv*. 2009;17(03):122-132.
23. Nolan JP, Deakin CD, Soar J, Bottiger BW, Smith G. European Resuscitation Council guidelines for resuscitation 2005. Section 4. Adult advanced life support. *Resuscitation*. 2005;67 Suppl 1:S39-86.
24. Azzopardi DV, Strohm B, Edwards AD, Dyet L, Halliday HL, Juszczak E, Kapellou O, Levene M, Marlow N, Porter E, Thoresen M, Whitelaw A, Brocklehurst P. Moderate Hypothermia to Treat Perinatal Asphyxial Encephalopathy. *New England Journal of Medicine*. 2009;361(14):1349-1358.
25. Shen I, Giacomuzzi C, Ungerleider RM. Current strategies for optimizing the use of cardiopulmonary bypass in neonates and infants. *Ann Thorac Surg*. 2003;75(2):S729-734.
26. Li LR, You C, Chaudhary B. Intraoperative mild hypothermia for postoperative neurological deficits in intracranial aneurysm patients. *Cochrane Database Syst Rev*.2:CD008445.

27. Hale SL, Kloner RA. Mild hypothermia as a cardioprotective approach for acute myocardial infarction: laboratory to clinical application. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.*16(2):131-139.
28. Kimes BW, Brandt BL. Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Exp Cell Res.* 1976;98(2):367-381.
29. Hescheler J, Meyer R, Plant S, Krautwurst D, Rosenthal W, Schultz G. Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart. *Circ Res.* 1991;69(6):1476-1486.
30. Tan X, Wang DB, Lu X, Wei H, Zhu R, Zhu SS, Jiang H, Yang ZJ. Doxorubicin induces apoptosis in H9c2 cardiomyocytes: role of overexpressed eukaryotic translation initiation factor 5A. *Biol Pharm Bull.*33(10):1666-1672.
31. Yang Z, Yang C, Xiao L, Liao X, Lan A, Wang X, Guo R, Chen P, Hu C, Feng J. Novel insights into the role of HSP90 in cytoprotection of H2S against chemical hypoxia-induced injury in H9c2 cardiac myocytes. *Int J Mol Med.*28(3):397-403.
32. Yaglom JA, Ekhterae D, Gabai VL, Sherman MY. Regulation of necrosis of H9c2 myogenic cells upon transient energy deprivation. Rapid deenergization of mitochondria precedes necrosis and is controlled by reactive oxygen species, stress kinase JNK, HSP72 and ARC. *J Biol Chem.* 2003;278(50):50483-50496.
33. Acosta D, Li CP. Injury to primary cultures of rat heart endothelial cells by hypoxia and glucose deprivation. *In Vitro.* 1979;15(11):929-934.
34. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med.* 1985;312(3):159-163.
35. Saikumar P, Dong Z, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Mechanisms of cell death in hypoxia/reoxygenation injury. *Oncogene.* 1998;17(25):3341-3349.
36. Chun YS, Hyun JY, Kwak YG, Kim IS, Kim CH, Choi E, Kim MS, Park JW. Hypoxic activation of the atrial natriuretic peptide gene promoter through direct and indirect actions of hypoxia-inducible factor-1. *Biochem J.* 2003;370(Pt 1):149-157.
37. Vengellur A, LaPres JJ. The Role of Hypoxia Inducible Factor 1 α in Cobalt Chloride Induced Cell Death in Mouse Embryonic Fibroblasts. *Toxicological Sciences.* 2004;82(2):638-646.
38. Ho VT, Bunn HF. Effects of Transition Metals on the Expression of the Erythropoietin Gene: Further Evidence That the Oxygen Sensor Is a Heme Protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1996;223(1):175-180.
39. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(12):5510-5514.
40. Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(20):11715-11720.
41. Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW, Roe R, Semenza GL. Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 α . Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J Biol Chem.* 1997;272(31):19253-19260.

42. An WG, Kanekal M, Simon MC, Maltepe E, Blagosklonny MV, Neckers LM. Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1alpha. *Nature*. 1998;392(6674):405-408.
43. Schmid T, Zhou J, Brune B. HIF-1 and p53: communication of transcription factors under hypoxia. *J Cell Mol Med*. 2004;8(4):423-431.
44. Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med*. 2004;36(1):1-12.
45. Ji Q, Yang L, Zhou J, Lin R, Zhang J, Lin Q, Wang W, Zhang K. Protective effects of paeoniflorin against cobalt chloride-induced apoptosis of endothelial cells via HIF-1alpha pathway. *Toxicol In Vitro*.26(3):455-461.
46. Merelli A, Caltana L, Girimonti P, Ramos AJ, Lazarowski A, Brusco A. Recovery of motor spontaneous activity after intranasal delivery of human recombinant erythropoietin in a focal brain hypoxia model induced by CoCl₂ in rats. *Neurotox Res*.20(2):182-192.
47. Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med*. 2002;8(4 Suppl):S62-67.
48. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(10):721-732.
49. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshert E. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*. 1998;394(6692):485-490.
50. Stenger C, Naves T, Verdier M, Ratinaud MH. The cell death response to the ROS inducer, cobalt chloride, in neuroblastoma cell lines according to p53 status. *Int J Oncol*.39(3):601-609.
51. Chipuk JE, Green DR. Cytoplasmic p53: bax and forward. *Cell Cycle*. 2004;3(4):429-431.
52. Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*. 2004;303(5660):1010-1014.
53. Halterman MW, Miller CC, Federoff HJ. Hypoxia-inducible factor-1alpha mediates hypoxia-induced delayed neuronal death that involves p53. *J Neurosci*. 1999;19(16):6818-6824.
54. Halterman MW, Federoff HJ. HIF-1alpha and p53 promote hypoxia-induced delayed neuronal death in models of CNS ischemia. *Exp Neurol*. 1999;159(1):65-72.
55. Kaluzova M, Kaluz S, Lerman MI, Stanbridge EJ. DNA damage is a prerequisite for p53-mediated proteasomal degradation of HIF-1alpha in hypoxic cells and downregulation of the hypoxia marker carbonic anhydrase IX. *Mol Cell Biol*. 2004;24(13):5757-5766.
56. Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*. 1997;387(6630):296-299.

57. Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*. 1997;387(6630):299-303.
58. Alarcon R, Koumenis C, Geyer RK, Maki CG, Giaccia AJ. Hypoxia induces p53 accumulation through MDM2 down-regulation and inhibition of E6-mediated degradation. *Cancer Res*. 1999;59(24):6046-6051.
59. Koumenis C, Alarcon R, Hammond E, Sutphin P, Hoffman W, Murphy M, Derr J, Taya Y, Lowe SW, Kastan M, Giaccia A. Regulation of p53 by hypoxia: dissociation of transcriptional repression and apoptosis from p53-dependent transactivation. *Mol Cell Biol*. 2001;21(4):1297-1310.
60. Zhu Y, Mao XO, Sun Y, Xia Z, Greenberg DA. p38 Mitogen-activated protein kinase mediates hypoxic regulation of Mdm2 and p53 in neurons. *J Biol Chem*. 2002;277(25):22909-22914.
61. Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res*. 1998;82(11):1111-1129.
62. Harrington HA, Ho KL, Ghosh S, Tung KC. Construction and analysis of a modular model of caspase activation in apoptosis. *Theor Biol Med Model*. 2008;5:26.
63. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*. 2007;87(1):99-163.
64. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 11(9):621-632.
65. Vaux DL. Apoptogenic factors released from mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 1813(4):546-550.
66. Brunelle JK, Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci*. 2009;122(Pt 4):437-441.
67. Galluzzi L, Kroemer G. Mitochondrial apoptosis without VDAC. *Nat Cell Biol*. 2007;9(5):487-489.
68. Srinivasula SM, Hegde R, Saleh A, Datta P, Shiozaki E, Chai J, Lee RA, Robbins PD, Fernandes-Alnemri T, Shi Y, Alnemri ES. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature*. 2001;410(6824):112-116.
69. Dispersyn GD, Borgers M. Apoptosis in the heart: about programmed cell death and survival. *News Physiol Sci*. 2001;16:41-47.
70. Kantari C, Walczak H. Caspase-8 and Bid: Caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1813(4):558-563.
71. Malhotra R, Brosius FC, 3rd. Glucose uptake and glycolysis reduce hypoxia-induced apoptosis in cultured neonatal rat cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 1999;274(18):12567-12575.
72. Ekhterae D, Lin Z, Lundberg MS, Crow MT, Brosius FC, 3rd, Nunez G. ARC inhibits cytochrome c release from mitochondria and protects against hypoxia-induced apoptosis in heart-derived H9c2 cells. *Circ Res*. 1999;85(12):e70-77.

73. de Moissac D, Gurevich RM, Zheng H, Singal PK, Kirshenbaum LA. Caspase activation and mitochondrial cytochrome C release during hypoxia-mediated apoptosis of adult ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32(1):53-63.
74. Hirota H, Chen J, Betz UA, Rajewsky K, Gu Y, Ross J, Jr., Muller W, Chien KR. Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress. *Cell.* 1999;97(2):189-198.
75. Schinzel A, Kaufmann T, Borner C. Bcl-2 family members: integrators of survival and death signals in physiology and pathology [corrected]. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1644(2-3):95-105.
76. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(1):47-59.
77. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science.* 2001;292(5517):727-730.
78. Martinou JC, Youle RJ. Mitochondria in apoptosis: bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev Cell.* 21(1):92-101.
79. Kvansakul M, Yang H, Fairlie WD, Czabotar PE, Fischer SF, Perugini MA, Huang DC, Colman PM. Vaccinia virus anti-apoptotic F1L is a novel Bcl-2-like domain-swapped dimer that binds a highly selective subset of BH3-containing death ligands. *Cell Death Differ.* 2008;15(10):1564-1571.
80. Giam M, Huang DC, Bouillet P. BH3-only proteins and their roles in programmed cell death. *Oncogene.* 2008;27 Suppl 1:S128-136.
81. Edlich F, Banerjee S, Suzuki M, Cleland MM, Arnoult D, Wang C, Neutzner A, Tjandra N, Youle RJ. Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell.* 145(1):104-116.
82. Fung C, Evans E, Shin D, Shin BC, Zhao Y, Sankar R, Chaudhuri G, Devaskar SU. Hypoxic-ischemic brain injury exacerbates neuronal apoptosis and precipitates spontaneous seizures in glucose transporter isoform 3 heterozygous null mice. *J Neurosci Res.* 88(15):3386-3398.
83. Saikumar P, Dong Z, Patel Y, Hall K, Hopper U, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Role of hypoxia-induced Bax translocation and cytochrome c release in re-oxygenation injury. *Oncogene.* 1998;17(26):3401-3415.
84. Ren D, Tu HC, Kim H, Wang GX, Bean GR, Takeuchi O, Jeffers JR, Zambetti GP, Hsieh JJ, Cheng EH. BID, BIM, and PUMA are essential for activation of the BAX- and BAK-dependent cell death program. *Science.* 330(6009):1390-1393.
85. Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol.* 2000;20(3):929-935.
86. Schlesinger PH, Gross A, Yin XM, Yamamoto K, Saito M, Waksman G, Korsmeyer SJ. Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(21):11357-11362.

87. Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(8):3668-3672.
88. Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, Bernasconi L, Bernard A, Mermoud JJ, Mazzei G, Maundrell K, Gambale F, Sadoul R, Martinou JC. Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science*. 1997;277(5324):370-372.
89. Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, Colman PM, Day CL, Adams JM, Huang DC. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell*. 2005;17(3):393-403.
90. Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR, Newmeyer DD. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell*. 2005;17(4):525-535.
91. Sattler M, Liang H, Nettlesheim D, Meadows RP, Harlan JE, Eberstadt M, Yoon HS, Shuker SB, Chang BS, Minn AJ, Thompson CB, Fesik SW. Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science*. 1997;275(5302):983-986.
92. Shen J, Qiu X, Jiang B, Zhang D, Xin W, Fung PC, Zhao B. Nitric oxide and oxygen radicals induced apoptosis via bcl-2 and p53 pathway in hypoxia-reoxygenated cardiomyocytes. *Sci China C Life Sci*. 2003;46(1):28-39.
93. Misao J, Hayakawa Y, Ohno M, Kato S, Fujiwara T, Fujiwara H. Expression of bcl-2 protein, an inhibitor of apoptosis, and Bax, an accelerator of apoptosis, in ventricular myocytes of human hearts with myocardial infarction. *Circulation*. 1996;94(7):1506-1512.
94. Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*. 27(48):6194-6206.
95. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26(4):239-257.
96. Porter AG, Janicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*. 1999;6(2):99-104.
97. Stennicke HR, Salvesen GS. Biochemical characteristics of caspases-3, -6, -7, and -8. *J Biol Chem*. 1997;272(41):25719-25723.
98. Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest*. 2005;115(10):2665-2672.
99. Jefferies JL, Hoffman TM, Nelson DP. Heart failure treatment in the intensive care unit in children. *Heart Fail Clin*. 6(4):531-558, ix-x.
100. Löffler G, Petrides PE, Löffler P. *Biochemie und Pathobiochemie : mit 218 Tabellen ; [mit Poster]*. 7., völlig neu bearb. Aufl. ed. Berlin [u.a.]: Springer; 2003.
101. Communal C, Colucci WS, Singh K. p38 mitogen-activated protein kinase pathway protects adult rat ventricular myocytes against beta -adrenergic receptor-stimulated apoptosis. Evidence for Gi-dependent activation. *J Biol Chem*. 2000;275(25):19395-19400.

102. Zaugg M, Xu W, Lucchinetti E, Shafiq SA, Jamali NZ, Siddiqui MA. Beta-adrenergic receptor subtypes differentially affect apoptosis in adult rat ventricular myocytes. *Circulation*. 2000;102(3):344-350.
103. Chesley A, Lundberg MS, Asai T, Xiao RP, Ohtani S, Lakatta EG, Crow MT. The beta(2)-adrenergic receptor delivers an antiapoptotic signal to cardiac myocytes through G(i)-dependent coupling to phosphatidylinositol 3'-kinase. *Circ Res*. 2000;87(12):1172-1179.
104. Wu CF, Bishopric NH, Pratt RE. Atrial natriuretic peptide induces apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 1997;272(23):14860-14866.
105. Shneyvays V, Jacobson KA, Li AH, Nawrath H, Zinman T, Isaac A, Shainberg A. Induction of apoptosis in rat cardiocytes by A3 adenosine receptor activation and its suppression by isoproterenol. *Exp Cell Res*. 2000;257(1):111-126.
106. Larsen R. *Anästhesie und Intensivmedizin in Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie*. 7., aktualisierte und überarb. Aufl. ed. Heidelberg: Springer Medizin; 2009.
107. Soliman HM, Melot C, Vincent JL. Sedative and analgesic practice in the intensive care unit: the results of a European survey. *Br J Anaesth*. 2001;87(2):186-192.
108. Kretz F-J, Schäffer J, Kretz S. *Anästhesie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie : mit 96 Tabellen ; [jetzt neu mit Fallquiz]*. 5., korrigierte und neu bearb. Aufl. ed. Heidelberg: Springer Medizin; 2008.
109. Propofol 1%. *Rote Liste*. 2012.
110. Devlin JW, Roberts RJ. Pharmacology of commonly used analgesics and sedatives in the ICU: benzodiazepines, propofol, and opioids. *Anesthesiol Clin*. 29(4):567-585.
111. Kokita N, Hara A. Propofol attenuates hydrogen peroxide-induced mechanical and metabolic derangements in the isolated rat heart. *Anesthesiology*. 1996;84(1):117-127.
112. Xia Z, Godin DV, Chang TK, Ansley DM. Dose-dependent protection of cardiac function by propofol during ischemia and early reperfusion in rats: effects on 15-F2t-isoprostane formation. *Can J Physiol Pharmacol*. 2003;81(1):14-21.
113. Wang B, Shrivah J, Luo H, Raedschelders K, Chen DD, Ansley DM. Propofol protects against hydrogen peroxide-induced injury in cardiac H9c2 cells via Akt activation and Bcl-2 up-regulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;389(1):105-111.
114. Wang W, Watanabe M, Nakamura T, Kudo Y, Ochi R. Properties and expression of Ca²⁺-activated K⁺ channels in H9c2 cells derived from rat ventricle. *Am J Physiol*. 1999;276(5 Pt 2):H1559-1566.
115. Tsiani E, Bogdanovic E, Sorisky A, Nagy L, Fantus IG. Tyrosine phosphatase inhibitors, vanadate and pervanadate, stimulate glucose transport and GLUT translocation in muscle cells by a mechanism independent of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C. *Diabetes*. 1998;47(11):1676-1686.
116. Shu B, Yang WW, Yang HT. Expression pattern of E2F6 in physical and chemical hypoxia-induced apoptosis. *Sheng Li Xue Bao*. 2008;60(1):1-10.

117. Wei SS, Liao XX, Yang CT, Lin JY, Yang ZL, Lan AP, Huang X, Wang LC, Chen PX, Feng JQ. [Reactive oxygen species scavenger protects cardiac cells against injuries induced by chemical hypoxia]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2009;29(10):1977-1981.
118. Kakinuma Y, Miyauchi T, Yuki K, Murakoshi N, Goto K, Yamaguchi I. Mitochondrial dysfunction of cardiomyocytes causing impairment of cellular energy metabolism induces apoptosis, and concomitant increase in cardiac endothelin-1 expression. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2000;36(5 Suppl 1):S201-204.
119. Chun YS, Kim MS, Park JW. Oxygen-dependent and -independent regulation of HIF-1alpha. *J Korean Med Sci*. 2002;17(5):581-588.
120. Asikainen TM, Ahmad A, Schneider BK, Ho WB, Arend M, Brenner M, Gunzler V, White CW. Stimulation of HIF-1alpha, HIF-2alpha, and VEGF by prolyl 4-hydroxylase inhibition in human lung endothelial and epithelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2005;38(8):1002-1013.
121. Ten VS, Pinsky DJ. Endothelial response to hypoxia: physiologic adaptation and pathologic dysfunction. *Current Opinion in Critical Care*. 2002;8(3):242-250.
122. Jung JY, Kim WJ. Involvement of mitochondrial- and Fas-mediated dual mechanism in CoCl₂-induced apoptosis of rat PC12 cells. *Neurosci Lett*. 2004;371(2-3):85-90.
123. Hudson B, Upholt WB, Devanny J, Vinograd J. The use of an ethidium analogue in the dye-buoyant density procedure for the isolation of closed circular DNA: the variation of the superhelix density of mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1969;62(3):813-820.
124. Miao R, Han Y, An L, Yang J, Wang Q. Seleno-podophyllotoxin derivatives induce hepatoma SMMC-7721 cell apoptosis through Bax pathway. *Cell Biol Int*. 2008;32(2):217-223.
125. Macklin C MM. A study of brain repair in the rat by the use of trypan blue: With special reference to the vital staining of the macrophages. *Archives of Neurology And Psychiatry*. 1920;3(4):353-NP.
126. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*. 1985;150(1):76-85.
127. Schagger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*. 1987;166(2):368-379.
128. Nolan JP, Soar J, Wenzel V, Paal P. Cardiopulmonary resuscitation and management of cardiac arrest. *Nat Rev Cardiol*. 2012;advance online publication.
129. Granger DN, Rutili G, McCord JM. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology*. 1981;81(1):22-29.
130. Ferreira R, Llesuy S, Milei J, Scordo D, Hourquebie H, Molteni L, de Palma C, Boveris A. Assessment of myocardial oxidative stress in patients after myocardial revascularization. *Am Heart J*. 1988;115(2):307-312.
131. Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*. 1995;270(3):1230-1237.

132. Lin CH, Wu WS, Lin MT, Liu WP, Hsu RB, Chang CP. Attenuating ischemia-induced H9c2 myoblasts apoptosis by therapeutic hypothermia. *Am J Med Sci*.339(3):258-265.
133. Huang CH, Chen HW, Tsai MS, Hsu CY, Peng RH, Wang TD, Chang WT, Chen WJ. Antiapoptotic cardioprotective effect of hypothermia treatment against oxidative stress injuries. *Acad Emerg Med*. 2009;16(9):872-880.
134. Mochizuki T, Yu S, Katoh T, Aoki K, Sato S. Cardioprotective effect of therapeutic hypothermia at 34 degrees C against ischaemia/reperfusion injury mediated by PI3K and nitric oxide in a rat isolated heart model. *Resuscitation*.83(2):238-242.
135. Huang Z, Zhong X, Irwin MG, Ji S, Wong GT, Liu Y, Xia ZY, Finegan BA, Xia Z. Synergy of isoflurane preconditioning and propofol postconditioning reduces myocardial reperfusion injury in patients. *Clin Sci (Lond)*.121(2):57-69.
136. Dangel V, Giray J, Ratge D, Wisser H. Regulation of beta-adrenoceptor density and mRNA levels in the rat heart cell-line H9c2. *Biochem J*. 1996;317 (Pt 3):925-931.
137. Yano N, Suzuki D, Endoh M, Tseng A, Stabila JP, McGonnigal BG, Zhao TC, Padbury JF, Tseng YT. Beta-adrenergic receptor mediated protection against doxorubicin-induced apoptosis in cardiomyocytes: the impact of high ambient glucose. *Endocrinology*. 2008;149(12):6449-6461.
138. Diestel A, Drescher C, Miera O, Berger F, Schmitt KR. Hypothermia protects H9c2 cardiomyocytes from H2O2 induced apoptosis. *Cryobiology*.62(1):53-61.
139. Weinrauch V, Safar P, Tisherman S, Kuboyama K, Radovsky A. Beneficial effect of mild hypothermia and detrimental effect of deep hypothermia after cardiac arrest in dogs. *Stroke*. 1992;23(10):1454-1462.
140. Kuboyama K, Safar P, Radovsky A, Tisherman SA, Stezoski SW, Alexander H. Delay in cooling negates the beneficial effect of mild resuscitative cerebral hypothermia after cardiac arrest in dogs: a prospective, randomized study. *Crit Care Med*. 1993;21(9):1348-1358.
141. Holzer M, Behringer W. Therapeutic hypothermia after cardiac arrest and myocardial infarction. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2008;22(4):711-728.

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Originalarbeiten als Erstautor:

1. **P. Soltani**, S. Wollersheim, G. Tong, F. Berger, K.R.L. Schmitt. Cardioprotection after hypoxia: Is hypothermia cool enough as a subsequent treatment? European Journal of Cardio-Thoracic Surgery: Manuscript admitted to review-process (Stand 15.05.2013).

Vortragspräsentationen mit Abstract-Veröffentlichung

1. Wollersheim S, Drescher C, **Soltani P**, Berger F, Schmitt KRL.
Deep hypothermia leads to cellular stress and endothelial dysfunction in a cellculture coculture model of endothelial cells and macrophages.
42. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie, 2010, Okt 2-5.
In: Abstractband zur 42 Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie. Weimar: 2010; 12.
2. Krauss A, Wollersheim S, **Soltani P**, Tong G, Berger F, Schmitt KRL.
Hypothermia suppresses inflammation via NFkB and pSTAT3 signalling pathway in stimulated microglial cells.
45th Annual Meeting of the Association for European Pediatric Cardiology, AEPC with joint Sessions with the Japanese Society of Pediatric Cardiology and Cardiac Surgery.
Malaga, Spain, 18.-21.5.2011.
Cardiology in the Young 2011; 21(Suppl 1): S5-6.

Posterpräsentationen mit Abstract-Veröffentlichung

1. Drescher C, Wollersheim S, **Soltani P**, Berger F, Schmitt KRL.
Cardioplegia reduces hypothermia-induced cardioprotective mechanisms.
37th Annual Congress of the European Society for Artificial Organs (ESAO).
Skopje, Macedonia, 8.-11.9.2010.
International Journal of Artificial Organs 2010; 33(7): 454.
2. Drescher C, Wollersheim S, **Soltani P**, Berger F, Schmitt KRL.
How does hypothermia protect cardiomyocytes during cardioplegic ischemia?
37th Annual Congress of the European Society for Artificial Organs (ESAO).
Skopje, Macedonia, 8.-11.9.2010.
International Journal of Artificial Organs 2010; 33(7): 427.

3. **Soltani P**, Berger F, Drescher C, Wollersheim S, Schmitt K.
Is mild hypothermia (34°C) cool enough to protect cardiomyocytes from ischemic injury?
37th Annual Congress of the European Society for Artificial Organs (ESAO).
Skopje, Macedonia, 8.-11.9.2010.
International Journal of Artificial Organs 2010; 33(7): 453.

4. Wollersheim S, Drescher C, **Soltani P**, Berger F, Schmitt KRL.
Deep hypothermia leads to cellular stress and endothelial dysfunction in a coculture model of endothelial cells and macrophages.
37th Annual Congress of the European Society for Artificial Organs (ESAO).
Skopje, Macedonia, 8.-11.9.2010.
International Journal of Artificial Organs 2010; 33(7): 427.

5. **Soltani P**, Wollersheim S, Krauss A, Tong G, Berger F, Schmitt KRL.
Is mild hypothermia cool enough to protect cardiac cells after hypoxia? How does propofol affect this effect?
45th Annual Meeting of the Association for European Paediatric Cardiology, AEPC with joint Sessions with the Japanese Society of Pediatric Cardiology and Cardiac Surgery.
Malaga, Spain, 18.-21.5.2011.
Cardiology in the Young 2011; 21(Suppl 1): S71.

Erklärung

Ich, Poya Soltani, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Der Einfluss milder Hypothermie auf das Überleben von
H9c2-Kardiomyoblasten nach CoCl_2 -induzierter HIF-Akkumulation“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 20.05.2013

Datum

Poya Soltani

Danksagung

Zum Ende dieser Forschungsarbeit möchte ich den Menschen meinen Dank aussprechen, die durch ihre Unterstützung einen wesentlichen Beitrag dazu geleistet haben, dass ich sie nicht nur beginnen, sondern auch beenden konnte.

Zuvorderst danke ich meiner Doktormutter Frau PD Dr. med. Katharina R. L. Schmitt für die Überlassung des interessanten Themas und ihre fachliche Betreuung. Sie verstand es nicht nur in der Planung sowie fortwährenden Entwicklung des Projektes stets vorzügliche Impulse zu setzen, sondern zeichnete sich darüber hinaus durch ein unglaubliches Engagement für ihre Mitarbeiter aus.

Herrn Prof. Dr. med. Felix Berger danke ich für seine stete Unterstützung unserer Arbeit in der Forschung und die wohlwollende Förderung meiner klinischen Ausbildung.

Darüber hinaus gilt mein Dank dem gesamten Team unseres Labors. Besonders hervorheben möchte ich Frau Dr. med. Sonja Wollersheim, Anke Jurisch, Lea-Heleen Huijzing und Herrn Dr. Giang Tong für die ergiebigen Diskussionen um Planung, Methodik und Auswertungsmöglichkeiten. Annemarie Krauß danke ich für die professionelle Motivationsarbeit in den nicht seltenen ertragsarmen Episoden des laborexperimentellen Forschens.

Meinen Freunden Konstanze und André Reisberg sowie Theres Schaub gilt meine Verbundenheit, da sie mich immer zur Fertigstellung der Arbeit anspornten und mich gleichzeitig des Lebens außerhalb der Forschung erinnerten.

Mein besonderer Dank jedoch gilt meiner Familie angesichts der Liebe und Unterstützung, die mir entgegengebracht wurden und werden. Erst sie hat mir die schulische Ausbildung, den akademischen Abschluss und nicht zuletzt diese Forschungsarbeit ermöglicht.