

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

DISSERTATION

*Einfluss von tiefer Hypothermie und Kardioplegie auf das  
Apoptose-Verhalten von H9c2-Kardiomyozyten nach  
oxidativem Stress*

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Cornelia Drescher

aus Berlin

Gutachter/in:     1. Priv.-Doz. Dr. med. K. Schmitt  
                          2. Prof. Dr. med. B. Stiller  
                          3. Priv.-Doz. Dr. med. O. Kretschmar

**Datum der Promotion: 03.06.2012**

**Inhaltsverzeichnis**

**Abkürzungsverzeichnis ..... IV**

**Abbildungsverzeichnis ..... VI**

**1 Einleitung .....1**

1.1 Definition Hypothermie..... 1

1.2 Klinische Anwendungsgebiete der therapeutischen Hypothermie ..... 1

1.3 Klinischer Hintergrund: Kardiopulmonaler Bypass.....2

1.4 Schädigungsmechanismen während des kardiopulmonalen Bypasses..... 4

1.5 Oxidativer Stress.....4

1.6 Apoptose: Der programmierte Zelltod und seine Signalkaskaden ..... 5

1.6.1 Extrinsischer Weg: Todesrezeptor und Fas-Ligand.....6

1.6.2 Intrinsischer Weg: Mitochondrium und Cytochrom C.....7

1.6.3 Caspase-unabhängige Apoptose: Apoptose-induzierender Faktor .....8

1.7 Regulatoren der Apoptose ..... 9

1.7.1 Bcl-2 und Bax .....9

1.7.2 MAP-Kinasen.....9

1.7.3 Akt - das Survivalprotein..... 10

1.7.4 Hämoxygenase-1 ..... 10

1.8 Zielsetzung ..... 12

**2 Materialien.....13**

2.1 Geräte..... 13

2.2 Chemikalien ..... 13

2.3 Zellkulturmaterialien..... 15

2.4 Antikörper ..... 16

2.5 Sonstige Materialien ..... 16

**3 Methoden .....17**

3.1 Zellkultur ..... 17

3.2 Zelldifferenzierung ..... 17

3.3 Das dynamisches Zeit-Temperatur-Protokoll..... 17

3.4 Trypanblau-Färbung zur Zellzählung ..... 19

3.5 Zytotoxizitätsmessung: LDH-Ausschüttung ..... 19

3.6 MTT: Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase ..... 20

3.7	Bestimmung des ATP-Gehaltes mittels CellTiter Glo <sup>®</sup> .....	21
3.8	Bestimmung freier Sauerstoffradikale mittels CM-H <sub>2</sub> DCFDA.....	21
3.9	Phasenkontrastmikroskopie .....	22
3.10	Immunhistochemische Färbungen mit anti-H2AX/DAPI, M30 CytoDEATH, F-Actin/Phalloidin .....	22
3.11	Untersuchung der intrazellulären Signalwege mittels Western Blot Technik .....	23
3.11.1	Gewinnung der Proteine .....	23
3.11.2	Aufreinigung der Proteine.....	23
3.11.3	Bestimmung der Proteinkonzentrationen mit der BCA-Methode .....	24
3.11.4	Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	24
3.11.5	Transfer der Proteine mit der Tankblotting-Methode .....	24
3.11.6	Detektion der Proteine.....	25
3.11.7	Densitometrische Analyse .....	26
3.12	Statistische Analyse.....	26
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>27</b>
4.1	Zellvitalität.....	27
4.1.1	Einfluss unterschiedlicher H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Konzentrationen auf die Zellvitalität .....	27
4.1.2	Einfluss der Kardioplegielösung auf die Zellvitalität.....	28
4.1.3	Einfluss der Hypothermie auf die Zellvitalität.....	29
4.2	ROS-Konzentration nach H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Stimulation und der Einfluss der Hypothermie ..	30
4.3	Morphologische Veränderungen 24 Stunden nach H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Stimulation .....	31
4.4	Einfluss der Hypothermie auf die mitochondriale Funktion .....	32
4.4.1	Einfluss der Hypothermie auf die Aktivität der mitochondrialen Reduktase nach oxidativem Stress .....	32
4.4.2	Einfluss von Hypothermie und Kardioplegielösung auf den ATP-Gehalt nach oxidativem Stress .....	33
4.5	Einfluss der Hypothermie auf das Apoptose-Verhalten von H9c2-Zellen.....	34
4.5.1	Veränderung der Expression von Bcl-2 und Bax durch Hypothermie.....	34
4.5.2	Einfluss der Hypothermie auf die Aktivierung der Caspase-9.....	35
4.5.3	Einfluss der Hypothermie auf die Aktivierung der Caspase-3.....	36
4.5.4	Einfluss von Hypothermie und Kardioplegielösung auf die AIF-Freisetzung ..	38
4.6	Einfluss von Hypothermie auf DNA-Schäden nach oxidativem Stress .....	39
4.6.1	Veränderung der H2AX-Phosphorylierung nach oxidativem Stress .....	39

4.6.2	Einfluss der Hypothermie auf die Phosphorylierung von p53 und PARP-1 ...	41
4.7	Regulationsmechanismen der H9c2-Zellen nach oxidativem Stress .....	42
4.7.1	Einfluss der Hypothermie auf die ERK-Aktivierung nach oxidativem Stress und Gabe von Kardioplegielösung.....	42
4.7.2	Einfluss von Hypothermie und Kardioplegielösung auf die Akt- Phosphorylierung.....	43
4.7.3	Einfluss der Hypothermie auf die H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induzierte Aktivierung der Hämoxygenase-1 .....	44
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>45</b>
5.1	Etablierung und Anwendung des Zellkulturmodells mit oxidativem Stress .....	45
5.2	Einfluss der Hypothermie auf die Zellvitalität .....	46
5.3	Einfluss der Hypothermie auf den Apoptoseprozess von H9c2-Zellen .....	47
5.3.1	Regulationsmechanismen der H9c2-Zellen nach oxidativem Stress .....	48
5.4	Einfluss von Hypothermie auf die DNA-Schädigung .....	52
5.5	Einfluss der Kardioplegielösung auf die Zellvitalität .....	53
<b>6</b>	<b>Schlussfolgerung .....</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>57</b>
<b>9</b>	<b>Abstract.....</b>	<b>59</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>60</b>
	<b>Publikationsliste .....</b>	<b>72</b>
	<b>Erklärung.....</b>	<b>74</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>75</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

ADP	Adenosindiphosphat
AHF	angeborener Herzfehler
AIF	Apoptose-induzierender Faktor
Akt	Serin/Threonin Protein-Kinase
ANOVA	analysis of variance/Varianzanalyse
Apaf-1	apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP/dATP	Adenosintriphosphat/Desoxyadenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	bovine serum albumine/Rinderserumalbumin
CAD	Caspase-aktivierte DNase
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CARD	Caspase-Rekrutierungs-Domäne
CM-H <sub>2</sub> DCFDA	5-(6)-Chlormethyl-2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetat
CPB	cardiopulmonary bypass/kardiopulmonaler Bypass
CPG/cpg	Kardioplegielösung
CREB	cAMP response element-binding protein
DAPI	4', 6-Diamidino-2-Phenylindol
DHCA	deep hypothermic cardiac arrest/ tiefer hypothermer Herzkreislaufstillstand
DIABLO	direct IAP binding protein of low Pi
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
dyn/dynamisch	Kühlung und Wiedererwärmung
ECL	enhanced Chemiluminescence
EDTA/EGTA	Ethylendiamintetraacetat/Ethylenglycoltetraacetat
ERK	extrazelluläre signalregulierende Kinase
FCS	fetal calf serum, fetales Kälberserum
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure

HLM	Herz-Lungen-Maschine
HO-1	Hämoxygenase-1, Hsp 32
HRP	horseradish peroxidase
IAP	inhibitor of apoptosis proteins
ICAD	Inhibitor der Caspase-aktivierten DNase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	kilo-Base
kDa	kilo-Dalton
LDH	Laktat-Dehydrogenase
MAPK	Mitogen-aktivierende Proteinkinasen
MOMP	major outer membrane proteine
MPT	mitochondrialer Permeabilitätsübergang
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
NO	Stickstoffmonoxid
p	phosphoryliert
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	Poly (ADP-Ribose) Polymerase
PBS	Phosphate Buffered Saline/phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PDK-1	3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat
PKB	Proteinkinase B
PMSF	Phenylmethylsulphonyl Fluoride
ROS	reactive oxygen species/reaktive Sauerstoffspezies
RSK	ribosomale S6 Kinase
SDS	sodium dodecyl sulphate/Natriumdodecylsulfat
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
Smac	mitochondrial activator of cell death
STAT1/3	signal transducer and activator of transcription 1/3
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
TRIS-Acetat	Tri-Hydroxymethyl-Aminomethan-Acetat

**Abbildungsverzeichnis**

**Abbildung 1:** Apoptose-Schema nach oxidativem Stress. .... 11

**Abbildung 2:** Detailliertes Zeit-Temperatur-Protokoll ..... 18

**Abbildung 3:** Konzentrationsabhängige Zytotoxizität von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ..... 27

**Abbildung 4:** Zellvitalität von H9c2-Zellen nach Kardioplegieadministration ..... 28

**Abbildung 5:** Einfluss der Hypothermie auf die Zellvitalität. .... 29

**Abbildung 6:** Intrazelluläre ROS-Konzentration. .... 30

**Abbildung 7:** Phasenkontrast-Mikroskopie der H9c2-Zellen. .... 31

**Abbildung 8:** Mitochondriale Aktivität nach Kühlung und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung. .... 32

**Abbildung 9:** Einfluss von Hypothermie und Kardioplegielösung auf den ATP-Gehalt von H9c2-Zellen nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung. .... 33

**Abbildung 10:** Expression anti- und pro-apoptotischer Signalmoleküle. .... 34

**Abbildung 11:** Analyse der Caspase-9-Aktivierung nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung und Kardioplegieadministration..... 35

**Abbildung 12:** M30 CytoDEATH-Färbung nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung. .... 36

**Abbildung 13:** Untersuchung der Caspase-3-Spaltung nach oxidativem Stress und Administration der Kardioplegielösung ..... 37

**Abbildung 14:** Untersuchung der AIF-Expression nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung und Administration der Kardioplegielösung. .... 38

**Abbildung 15:** Veränderungen der frühen H2AX-Phosphorylierung nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung und Administration der Kardioplegielösung..... 39

**Abbildung 16:** Analyse der anhaltenden H2AX-Phosphorylierung..... 40

**Abbildung 17:** Immunhistochemische Färbung von γH2AX..... 40

**Abbildung 18:** Phosphorylierung von p53 und Spaltung der PARP-1..... 41

**Abbildung 19:** ERK 1/2 Expression direkt nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung und Zugabe der Kardioplegielösung. .... 42

**Abbildung 20:** Akt-Phosphorylierung nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung und Administration der Kardioplegielösung. .... 43

**Abbildung 21:** Expression der Hämoxxygenase-1 nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung ..... 44



## **1 Einleitung**

### **1.1 Definition Hypothermie**

Hypothermie ist definiert als Senkung der Körpertemperatur unter 36,5°C [1] und wird der Temperatur entsprechend weiter klassifiziert in: [2]

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

Man unterscheidet zwischen akzidenteller und therapeutischer Hypothermie. Hauptursachen für akzidentelle Hypothermie in Mitteleuropa sind Alkohol- und Drogenmissbrauch, psychiatrische Erkrankungen, Ertrinkungsunfälle, Lawinenunglücke und schwere Traumata. Die therapeutische Hypothermie wird in verschiedenen Bereichen der Medizin zur Organprotektion eingesetzt. Die durch Hypothermie induzierten zellulären Mechanismen sind Bestandteil aktueller Forschung.

### **1.2 Klinische Anwendungsgebiete der therapeutischen Hypothermie**

Seit den 60iger Jahren des letzten Jahrhunderts wird therapeutische Hypothermie in verschiedenen Bereichen als bedeutendes Verfahren zur Organprotektion genutzt. Therapeutische Hypothermie hat inzwischen einen festen Platz in den Therapieleitlinien mehrerer Fachrichtungen gefunden. Unter anderem konnte der Nutzen einer Hypothermiebehandlung nach einer Reanimation außerhalb des Krankenhauses, bei Herzstillstand [3, 4] und bei Kammerflimmern oder ventrikulären Tachykardien als Initial-Rhythmus [3, 5-7] nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte milde Hypothermie auch nach ischämischen Schlaganfällen [8-11] sowie nach perinataler Asphyxie [12] gute Erfolge. Der Nutzen von milder Hypothermie in der Therapie des Schädel-Hirn-Traumas [13, 14], der Hirnblutung [15, 16] und bei erhöhtem Hirndruck [17-19] ist nicht eindeutig geklärt, bei intrakraniellen Aneurysmata konnten sogar negative Effekte gezeigt werden [20].

### 1.3 Klinischer Hintergrund: Kardiopulmonaler Bypass

In Deutschland kommt ca. jedes hundertste Neugeborene mit einem angeborenem Herzfehler (AHF) auf die Welt [21]. Weltweit sind pro Jahr vier bis acht Neugeborene von 1000 Lebendgeburten betroffen [22, 23]. Bei einem Teil dieser Herzfehler sind operative Korrekturen unter Zuhilfenahme der Herz-Lungen-Maschine (HLM) in der Neonatalperiode oder im Säuglings- und Kleinkindalter notwendig, um eine kurative oder palliative Therapie des Herzfehlers zu erreichen, bevor sich die Kreislaufverhältnisse des Patienten irreversibel angepasst haben.

In den letzten Jahren rückte dank des Fortschrittes in der Diagnostik des AHF sowie der Weiterentwicklung der operativen Therapie die Steigerung der Lebensqualität immer weiter in den Fokus. Dabei konnte die Mortalität durch den diagnostischen, interventionellen und technischen Fortschritt signifikant gesenkt werden.

Durch die Verwendung der HLM kommt es jedoch aufgrund der großen Fremdoberfläche (Schläuche, Reservoir der Maschine) vor allem bei Neugeborenen und Säuglingen zu einer systemischen Entzündungsreaktion. In deren Rahmen besteht postoperativ die Gefahr eines Kapillar-Leck-Syndroms und einer vermehrten Blutungsneigung aufgrund von Thrombozytendysfunktion und Verbrauchskoagulopathie [24]. Zusätzlich bringt die Operationstechnik die Gefahr der Minderperfusion wichtiger Organsysteme und eine daraus resultierende Ischämie mit sich. Dadurch und durch die systemische Entzündungsreaktion wird die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) begünstigt. Somit sind peri-, intra- und postoperative organprotektive Strategien sehr wichtig.

Intraoperativ gibt es verschiedene Ansätze zur Verringerung der Organ- und vor allem der Hirnschädigung durch Ischämie oder oxidativen Stress. Es werden Steroide zur Reduktion der systemischen Inflammation in das Flüssigkeitsreservoir der HLM gegeben [25, 26] sowie Aprotinin zur Reduktion des Blutverlustes und zur Reduktion der Inflammation [27]. Eine Verkürzung der Zeit an der HLM und eine Maschine mit einem kleineren Reservoir, einer kleineren Pumpe und einem kürzeren Schlauchsystem, die extra für Neugeborene und Säuglinge angefertigt wurde, reduziert die Gesamtfremdoberfläche und zeigte positive Effekte [28].

Für Korrekturoperationen in der Neonatalperiode wie der *Arterial-switch*-Operation sowie der Korrektur einer totalen Lungenvenenfehlmündung, ist die Technik des tief hypothermen Kreislaufstillstands (DHCA) früher die Methode der Wahl gewesen [29].

Die Patienten wurden zügig auf eine Körpertemperatur von 18-20°C gekühlt, dann erfolgte die Abschaltung der HLM. Durch die Verminderung der Körpertemperatur wird die Stoffwechselrate reduziert. Im Vergleich zum Sauerstoffverbrauch bei 37°C erzielt die Senkung der Temperatur auf 15°C eine Verringerung des O<sub>2</sub>-Verbrauchs um 90 % [30, 31]. Dadurch wird eine gesteigerte Ischämietoleranz unreifer Organsysteme erreicht und ein größtmöglicher Schutz des Gehirns erzielt [32]. Um eine schädigende Hirnischämie so gering wie möglich zu halten, wurde die Zeit des DHCA auf 45-60 Minuten begrenzt [33].

Im Myokard hemmt die Kühlung durch die Senkung der Stoffwechselaktivität den Abbau der energiereichen Phosphate in den Kardiomyozyten, ohne einen Herzstillstand zu induzieren. Die Verminderung der elektrischen Leitfähigkeit kann eine Anhäufung von intrazellulärem Natrium und Calcium bewirken und somit die Entstehung eines Myokardödems mit Zunahme der myokardialen Wandspannung begünstigen.

Seit dem Beginn der Herzchirurgie in den 1950er Jahren wurden verschiedene Techniken genutzt, um das Herz intraoperativ vor der globalen Ischämie zu schützen und ein stillstehendes, relaxiertes blutloses Operationsfeld für den Operateur zu gewährleisten. Die beiden wichtigen Methoden zur Kardioprotektion sind hierbei die therapeutische Hypothermie sowie die Administration von Kardioplegielösung. Die Kardioplegielösung (meist kaliumreich, Magnesium- oder Lidocain/Procain-haltig) führt zu einer sofortigen Unterbrechung der elektrischen Erregungsleitung und der mechanischen Herzaktion [34, 35]. Durch den eintretenden Herzstillstand wird die Entleerung myokardialer Energiespeicher verhindert. Zudem gleichen die in der Kardioplegielösung enthaltenen Puffersubstanzen die anaerobe Azidose im Herzmuskel aus.

**Tabelle 1: Strategien zur intraoperativen Organprotektion**

<b>Organsystem</b>	<b>potentielle Schädigung</b>	<b>Maßnahme</b>
Gehirn	Ischämie durch Minderperfusion	Hypothermie pH-Wert-Regulation Perfusionsdruck > 50 mm Hg
Myokard	Hypoxie, Ischämie Herzrhythmusstörungen	Hypothermie Kardioplegielösung
Endothelium / Blut	systemische Entzündung, Ödembildung Aktivierung der Gerinnung	Methylprednisolongabe Aprotiningabe
Niere	Hypoperfusion	pH-Wert-Regulation adäquate Volumensubstitution

#### **1.4 Schädigungsmechanismen während des kardiopulmonalen Bypasses**

Der intraoperativ induzierte Herzkreislaufstillstand führt durch die Unterbrechung der Perfusion des Herzens innerhalb kurzer Zeit zu einem Sauerstoffmangel im Myokard. Dies bewirkt innerhalb weniger Minuten einen nahezu vollständigen Abbau von ATP und einen Anstieg von Hypoxanthin. Zusätzlich können ATP-abhängige Ionenporter das Membranpotential nicht mehr aufrechterhalten, es kommt zum Kaliumausstrom ins Interstitium und zum Calciumeinstrom in das Zytoplasma. Dies und der Anstieg von Hypoxanthin führen zu einer Umwandlung des Enzyms Xanthindehydrogenase zu Xanthinoxidase, welches das Hypoxanthin zu Xanthin oxidiert [36]. Bei dieser Umwandlung entstehen freie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie zum Beispiel Superoxidanion ( $O_2^-$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) oder Hydroxyl-Radikale ( $OH^\cdot$ ). Bei der Wiederherstellung der Myokardperfusion kommt es zu einer Hyperoxie durch den Wiederanstieg des Sauerstoffpartialdruckes im Blut. Dies führt ebenfalls zu einer massiven Bildung von ROS und es kommt zum Reperfusionsschaden. ROS reagieren intrazellulär z.B. mit Lipiden, wodurch wiederum neue Radikale entstehen. Die freien Sauerstoffradikale interagieren unter anderem mit der mitochondrialen Membran, wodurch es zur Störung des Energiestoffwechsels kommen kann. Unspezifische Oxidationsvorgänge führen weiterhin zu DNA-, Protein- und Membranschäden. Diese resultieren in einer Störung der Membranintegrität der Zelle und einem Calciumeinstrom in die Zelle [37]. Die Ischämie während des Kreislaufstillstandes und die durch die Reperfusion gebildeten Superoxidanionen führen zusätzlich zu einer vermehrten Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen der betroffenen Gefäße und lösen dadurch eine Leukozytenmigration ins bereits geschädigte Gewebe aus. Die durch die Leukozyten (neutrophile Granulozyten) gebildeten ROS fördern ebenfalls die Zellschädigung [38]. Hauptsächliche Schädigungsmechanismen des Herzens während des kardiopulmonalen Bypasses sind somit die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies und die Schädigung der Zellen durch Ischämie und Reperfusion. Beide Mechanismen sind potente Induktoren der Apoptose.

#### **1.5 Oxidativer Stress**

Unter physiologischen Bedingungen sind reaktive Sauerstoffspezies wichtige Signalmoleküle und Regulatoren des Zellzyklus, der Genexpression und der

Proteinkinaseaktivität. Sie entstehen vor allem beim Elektronentransfer im Mitochondrium während der Atmungskette und im Zellstoffwechsel. Aufgrund der potentiell schädigenden Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies besitzen Zellen physiologische antioxidative Schutzmechanismen. Enzyme wie Superoxiddismutase, Katalase und Glutathionperoxidase sowie nicht-enzymatische Antioxidantien wie  $\alpha$ -Tocopherol,  $\beta$ -Carotin und Ascorbinsäure regulieren unter physiologischen Bedingungen den Abbau von freien Sauerstoffradikalen [39]. Die übermäßige Entstehung von ROS wie z.B. bei einem Reperfusionsschaden kann durch diesen Enzymapparat nicht mehr auf physiologische Konzentrationen reduziert werden. Diesen Zustand bezeichnet man als oxidativen Stress [37]. Er spielt in der Pathophysiologie und Progression vieler Erkrankungen eine wichtige Rolle, wie zum Beispiel während der Tumorentstehung [40] und -progression [41-43], bei neurodegenerativen Erkrankungen [44, 45], beim Krankheitsbild des Diabetes mellitus [46, 47], beim septischen Schock [48], bei der arteriellen Hypertonie, bei der Entstehung von Arteriosklerose [49, 50], beim Reperfusionsschaden nach Herzinfarkt [51], nach einem Apoplex [52], bei der Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie [53] und ebenso bei Alterungsprozessen [54].

### **1.6 Apoptose: Der programmierte Zelltod und seine Signalkaskaden**

Den programmierten Zelltod bezeichnet man als Apoptose. Die Apoptose spielt bei vielen Prozessen im Körper eine wichtige Rolle. Unter anderem ist der kontrollierte Zelltod bei der Embryonalentwicklung zur Formgebung (Deletion überflüssiger Strukturen) zu finden, zur Kontrolle immunologischer Selektions- und Reaktionsvorgänge notwendig und an der Identifikation und Elimination infizierter und abnormer Zellen beteiligt [55, 56].

Pathophysiologisch kommt der Apoptose bei der Tumorentstehung aufgrund der nicht mehr funktionierenden Signalkaskaden eine bedeutende Rolle zu. Bei der Entwicklung kardiovaskulärer (Herzinfarkt, dilatative Kardiomyopathie [57]), neurodegenerativer (Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson [58]) und autoimmun vermittelter Erkrankungen sind ebenfalls Apoptosevorgänge maßgeblich beteiligt.

Die Apoptose ist ein Energie verbrauchender, aktiver Prozess [59], der ohne Entzündungsreaktion abläuft [60]. Typische morphologische Veränderungen einer apoptotischen Zelle sind Schrumpfen, Abrunden und Ablösen von der extrazellulären Matrix. Zusätzlich wird das Zytoskelett abgebaut, die Plasmamembran wird ausgestülpt,

es kommt zur Chromatinkondensation und zur Zellkernfragmentierung. Endonukleasen bewirken zusätzlich eine DNA-Fragmentierung [61-63]. Die anschließend entstehenden Apoptosekörperchen werden dann von Makrophagen phagozytiert [64].

**Tabelle 2: Morphologische und biochemische Merkmale der Apoptose in der Übersicht**

Morphologische Merkmale	Biochemische Merkmale
<ul style="list-style-type: none"> <li>• einzelne Zellen</li> <li>• Blasenbildung (Membran-Blebbing) mit erhaltener Membranintegrität</li> <li>• Schrumpfen der Zelle</li> <li>• Bildung von Apoptosekörperchen und deren Phagozytose</li> <li>• keine Entzündungszeichen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• physiologisches Signal</li> <li>• geordneter Ablauf</li> <li>• neue Proteinbiosynthese erforderlich</li> <li>• DNA-Fragmentierung</li> <li>• ATP-Verbrauch</li> <li>• Anstieg intrazellulärer Calciumkonzentrationen</li> </ul>

Die Apoptose lässt sich in eine Initiierungsphase und eine Exekutionsphase mit einem sequenziellen Caspase-vermittelten Abbau und der Aktivierung von Schlüsselproteinen unterteilen. Caspasen sind Cystein-Aspartat-Proteasen und spielen eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung von Apoptose, Nekrose und Inflammation. Die Apoptose-Caspasen lassen sich in Initiatorcaspasen (Caspase-2, -8, -9 und -10) und Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7) unterteilen. Durch pro-apoptotische Stimuli oder andere Caspasen erfolgt nach der proteolytischen Entfernung der Prodomäne die Aktivierung der Procaspasen im Sinne einer Kaskadenaktivierung.

Als Endstrecke bauen Effektorcaspasen wie Caspase-3, -6 und -7 und weitere Endonukleasen mehrere Schlüsselproteine der Zelle ab und induzieren so den programmierten Zelltod. Diese Endstrecke der Signalkaskade wird durch zwei wesentliche Signalwege aktiviert, einerseits über Fas-Rezeptoren, sogenannte „Todesrezeptoren“ und andererseits durch die direkte Schädigung der Mitochondrienmembran.

### 1.6.1 Extrinsischer Weg: Todesrezeptor und Fas-Ligand

Der Fas-(APO-1/CD95) und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Rezeptor sind als Mitglieder der TNF/nerve growth factor Rezeptor-Superfamilie an diversen Formen des physiologischen und pathophysiologischen Zelltodes beteiligt. Der Fas- und TNF-Rezeptor sind homologe Proteine und haben beide „Todesdomänen“ in ihrem zytoplasmatischen Anteil. Diese Domänen sind in der Lage, den Zelltod durch Interaktion mit intrazellulären Proteinen einzuleiten. Durch die Interaktion wird zunächst

Caspase-8 aktiviert, die wiederum Caspase-3 aktiviert. Dies führt letztlich zum Abbau essentieller Proteine und zur Aktivierung von Caspase-aktivierten DNasen (CAD), wodurch eine DNA-Spaltung induziert wird [65]. Sowohl in Zellen des Immunsystems als auch in einer Vielzahl ausdifferenzierter Gewebe wird der Fas-Rezeptor exprimiert. Die spezifischen Fas-Liganden werden dabei hauptsächlich in immunkompetenten Geweben und den Zellen des Immunsystems exprimiert.

### **1.6.2 Intrinsischer Weg: Mitochondrium und Cytochrom C**

Der intrinsische Weg der Apoptose wird maßgeblich mitochondrial reguliert. Eine Schädigung der Mitochondrienmembran z.B. durch ROS, Chemotherapeutika oder UV-Strahlen führt zur Freisetzung von Cytochrom C und anderen pro-apoptotischen Faktoren wie Smac/DIABLO aus den Mitochondrien in das Zytoplasma [66].

Außerdem kann der Transkriptionsfaktor p53, ein Tumorsuppressor und Zellzyklusregulator, der bei DNA-Schäden aktiviert wird, durch eine Aktivierung der Expression von Bax und Bad, zwei pro-apoptotisch wirkende Mitglieder der Bcl-2 Familie, ebenfalls zur Freisetzung von Cytochrom C aus dem Intermembranraum des Mitochondriums führen [67].

Durch die Bindung des frei gewordenen Cytochrom C und von dATP (Desoxyadenosintriphosphat) an den apoptotischen Protease-Aktivierungsfaktor-1 (Apaf-1) kommt es zu einer Konformationsänderung des Proteins. Dadurch wird die Proteinbindungsdomäne CARD (Caspase-Rekrutierungs-Domäne) von Apaf-1 zugänglich, so dass die CARD der Procaspase-9 daran binden kann. Durch die Bildung dieses Heterodimers wird Caspase-9 autolytisch aktiviert. Der entstandene Komplex wird Apoptosom genannt und stellt die aktive Form der Caspase-9 dar. Ebenso wie Caspase-8 initiiert die aktive Caspase-9 die Caspase-Kaskade. Eine Signalverstärkung der Caspase-Kaskade durch wird durch Caspase-7 gewährleistet, welche nicht nur Substrate spaltet, die an apoptotischen Prozessen beteiligt sind, sondern auch selbst Caspase-9 aktiviert. Zusätzlich haben die einzelnen Caspasen noch die Möglichkeit, intrazelluläre Proteine, die antiapoptotisch aktiv sind, zu spalten oder weitere pro-apoptotisch wirksame Proteine zu aktivieren. So spaltet die aktivierte Caspase-8 Bid zu tBid, welches dann an die Mitochondrienmembran transloziert und dort die Freisetzung von Cytochrom C und somit wieder die Aktivierung des mitochondrialen Apoptoseweges bewirkt. Aktivierte Caspase-9 kann selbst sowohl Procaspase-3 als auch Procaspase-7 spalten. Die dadurch aktivierte Caspase-3 initiiert die Spaltung

diverser intrazellulärer Proteine und es kommt zu charakteristischen Veränderungen, die unausweichlich in der Zerstörung der Zelle enden [68].

Eines dieser Proteine ist das Enzym PARP (Poly (ADP-Ribose) Polymerase), welches in DNA-Reparaturmechanismen involviert ist und dabei ATP verbraucht. Das Enzym PARP wird durch z.B. ROS-induzierte DNA-Doppelstrangbrüche als Reparaturmechanismus aktiviert und induziert seinerseits DNA-Reparaturenzyme [68]. Eine übermäßige Aktivierung bei schwerwiegenden Schäden kann allerdings z.B. über p53 zur Freisetzung von AIF aus dem Mitochondrium und somit zur Einleitung oder auch Potenzierung apoptotischer Prozesse führen.

Des Weiteren werden das Protein Lamin A, ein filamentöses Protein, welches an der Bildung der stabilen Struktur unter der Kernmembran beteiligt ist und die Chromatinstruktur stützt, sowie das Protein Fodrin und Bcl-2 gespalten. Die Zerstörung der Lamine führt unter anderem zur Kondensation des Chromatins und zum Integritätsverlust der Zellkernmembran. Die Spaltung der Fodrine kann zur Bildung von Apoptosekörperchen führen [68].

Zusätzlich kommt es durch Caspase-3 zur Abspaltung des Inhibitors ICAD (Inhibitory of Caspase Activated Desoxyribonuclease) von der Endonuklease CAD. CAD verursacht eine charakteristische DNA-Fragmentierung in Bruchstücke von 200 Basenpaaren [69]. Ebenfalls entstehende DNA-Doppelstrangbrüche - entweder durch ROS oder durch die initiierte Apoptose induziert- führen innerhalb kürzester Zeit zu einer Phosphorylierung des Histons H2AX am Serin 139 [70]. Diese Phosphorylierung dient DNA-Reparaturenzymen wie der PARP-1 als Marker und Bindungsstelle. H2AX ist ein Mitglied der H2A Histon-Familie, zu der insgesamt drei Subfamilien gehören: H2A1, H2A2, H2AZ und H2AX. Histone dienen in eukaryotischen Zellen der kondensierten Verpackung der DNA [71].

### **1.6.3 Caspase-unabhängige Apoptose: Apoptose-induzierender Faktor**

Die Synthese des Vorläuferproteins des Apoptose-induzierenden Faktors (AIF) findet im Zytoplasma statt. Von dort erfolgt der Transport in die Mitochondrien, genauer in den Intermembranraum der Mitochondrien. AIF ist dort an der Elektronentransferkette beteiligt. Bei einer Apoptoseinduktion bewirkt bereits die Freisetzung von AIF über spezifische Kanäle einen Abfall des mitochondrialen Membranpotentials. Zusätzlich transloziert AIF zum Zellkern und bewirkt dort auf bisher noch unbekannt Weise eine Chromatin-Kondensation und eine DNA-Fragmentierung in 50 kb-Einheiten [72]. Einmal



im Zytosol, bewirkt AIF durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus eine verstärkte Freisetzung von AIF aus den Mitochondrien [73].

## **1.7 Regulatoren der Apoptose**

### **1.7.1 Bcl-2 und Bax**

Verschiedene intrazelluläre Proteine tragen zur Regulation der Apoptose auf mitochondrialer Ebene bei. Diese Proteine gehören vornehmlich zur Bcl-2-Familie, die sowohl anti-apoptotische Mitglieder - u. a. Bcl-2, Bcl-XL und Mcl-1 - als auch pro-apoptotische Mitglieder - u. a. Bax, Bak, Bad, Bim und Bid - umfasst. Diese Proteine sind vor allem rund um das Mitochondrium aktiv und modulieren durch reziproke Interaktionen die pro- und anti-apoptotische Balance und somit die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran. Die Inaktivierung der Proteine erfolgt durch die Bindung an bzw. Phosphorylierung durch einen Gegenspieler. Kommt es durch die pro-apoptotisch aktiven Proteine Bax, Bad etc. zur Permeabilisierung der Mitochondrienmembran, werden spezifische Kanäle (MOMP - major outer membrane protein) in der äußeren Mitochondrienmembran gebildet. Zusätzlich ist aber eine Öffnung von Permeabilitätsporen an der inneren Membran (MPT: mitochondrialer Permeabilitätsübergang) wichtig, damit es zur nachfolgenden Zerstörung der äußeren Membran kommen kann. Durch die Permeabilisierung kommt es zur Freisetzung von Cytochrom C und anderen pro-apoptotischen Signalmolekülen und zur Initiierung der Apoptosekaskade. Die mitochondriale Membrandepolarisation und damit auch Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung und Gewinnung energiereicher Phosphate führt schließlich zur ATP-Depletion und somit ebenfalls zum programmierten Zelltod [74].

### **1.7.2 MAP-Kinasen**

Die extrazelluläre signal-regulierte Kinase ERK1/2 (p42/p44 MAPK) gehört zur Familie der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK), das heißt sie werden durch verschiedene Zytokine, Wachstumsfaktoren oder durch Zellstress - inklusive ROS - aktiviert. Weitere Mitglieder sind die c-Jun N-terminale Kinase (JNK 1/2/3) und die p38 Kinase (p38  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ). Die genannten Enzyme und deren intrazelluläre Signalwege beeinflussen und steuern sich gegenseitig und sind voneinander abhängig. Sie werden durch eine sequentielle Phosphorylierungskaskade aktiviert, die Signale von der

Zellmembran zum Zellkern weitertransportiert und verstärkt. In Abhängigkeit von der Dauer, dem Ausmaß und der subzellulären Position der ERK-Aktivierung steuert ERK verschiedene zelluläre Mechanismen, u.a. Proliferation, Migration, Zelldifferenzierung und Apoptose [75, 76]. Die Aktivierung von ERK über Ras und Raf führt zur Inhibierung von Bim und über p90 RSK durch Phosphorylierung zur Inaktivierung von Bad und wirkt somit anti-apoptotisch. Über p90 RSK kommt es zur Translokation von CREB, STAT1 und STAT3 in den Zellkern, was eine vermehrte Expression von Bcl-2 und Bcl-xL zur Folge hat. Gleichzeitig wird das Protein FoxO1 gehemmt. Es ist im Zellkern für die Expressionsregulation von Fas und Bim verantwortlich.

### 1.7.3 Akt - das Survivalprotein

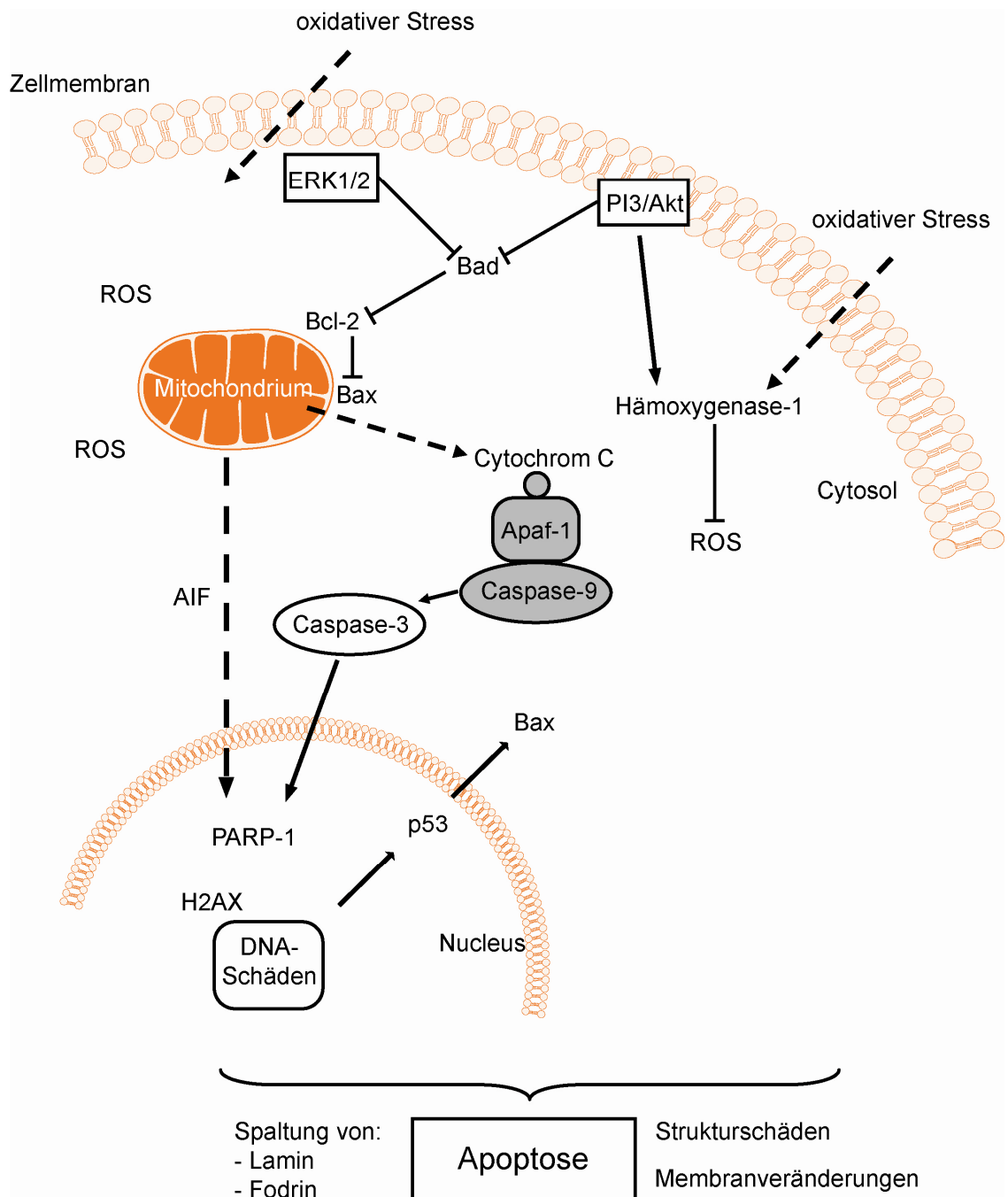
Die Proteinkinase B (PKB) - oder auch Akt - ist eine Serin/Threoninkinase und spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von Zellüberleben und Apoptose. Akt wird über den PI3-Kinaseweg durch Insulin, verschiedene Wachstums- und Survivalfaktoren und oxidativen Stress aktiviert. Die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) phosphoryliert membrangebundenes Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>), dabei entsteht Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP<sub>3</sub>). Akt wird an PIP<sub>3</sub> gebunden und kann nun durch PDK-1 (3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1) phosphoryliert und aktiviert werden [77, 78]. Die Funktion als Survivalprotein übt Akt aus, indem die Apoptoseinitiierung durch Phosphorylierung und Inaktivierung verschiedener Zielproteine, u.a. Bad, Forkhead Transkriptionsfaktoren, c-Raf und Caspase-9 gehemmt wird. Außerdem hemmt Akt über MDM2 den Tumorsuppressor p53, wodurch dieses Protein keine Hemmung von Bcl-2 induzieren kann [79, 80].

### 1.7.4 Hämoxygenase-1

Die Hämoxygenase-Familie, bestehend aus den drei Isoformen induzierbare Hämoxygenase-1 (HO-1, auch Hsp 32 genannt) und den konstitutiv exprimierten Hämoxygenasen -2 und -3, oxidieren Hämoglobin zu Biliverdin, Kohlenmonoxid und freiem Eisen. In einem zweiten Schritt wird Biliverdin zu Bilirubin reduziert. Sowohl Bilirubin als auch Biliverdin sind potente Antioxidantien, die ROS binden und neutralisieren können [81].

Zwischen dem Akt-Signalweg und dem Aktivierungsweg der Hämoxygenase-1 besteht eine Verbindung [82]. Akt ist in der Lage, die Aktivität von Hsp 32 zu regulieren [83, 84]. Außerdem sind Hämoxygenase-1 und die Biliverdinreduktase in der Lage, direkt die

Akt-Aktivität durch eine Phosphorylierung von p85 und/oder Akt selbst zu erhöhen, wodurch nachfolgend proapoptotische Proteine wie Bad und GSK-3 $\beta$  gehemmt werden und die mitochondriale Funktion aufrechterhalten werden kann. Somit wird durch eine Aktivierung der Hämoxxygenase-1 die Aktivierung des mitochondrial vermittelten Apoptoseweges gehemmt [85].



**Abbildung 1:** Vereinfachte Darstellung der mitochondrial vermittelten Apoptose als Reaktion auf oxidativen Stress. Oxidativer Stress führt intrazellulär zur Aktivierung zytotoxischer und zytoprotektiver Signalkaskaden. AIF = Apoptose-induzierender Faktor, ROS = reaktive Sauerstoffspezies, Apaf-1 = Apoptose-aktivierender Faktor 1.

## 1.8 Zielsetzung

Die Anwendung der therapeutischen Hypothermie ist eine etablierte Standardmethode zur Zell- und Organprotektion während kardiochirurgischer Eingriffe im Neonatal- und Säuglingsalter unter Verwendung der Herz-Lungen-Maschine. Hypothermie reduziert den Zellmetabolismus und erhöht die Ischämietoleranz. Der Einfluss der Hypothermie auf funktionelle, immunhistochemische und biochemische Charakteristika der Zelle ist bis dato nicht vollständig verstanden und wichtiger Bestandteil aktueller *in vitro* und *in vivo* Forschung. Um ein besseres Verständnis der intrazellulären Mechanismen zu erhalten und mögliche Optimierungen der Strategien zur Organprotektion zu entwickeln, ist die Übertragung der klinischen Gegebenheiten auf ein vereinfachtes *in vitro* Modellsystem ein anerkanntes Mittel. Deshalb war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, den Einfluss von tiefer Hypothermie auf die Funktion und das durch oxidativen Stress induzierte Apoptoseverhalten von H9c2-Kardiomyozyten zu untersuchen. Zusätzlich sollte untersucht werden, welche Effekte die im Deutschen Herzzentrum Berlin verwendete Kardioplegielösung unter Kühlungsbedingungen auf Kardiomyozyten hat. Zu diesem Zweck wurde ein *in vitro* Zellkulturmodell mit einem speziellen Kühlungs- und Wiedererwärmungsprotokoll entwickelt, das den realen Bedingungen in der Kinderherzchirurgie nachempfunden ist.

Mit Hilfe des Zellkulturmodells sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Sind tiefe Hypothermie und Wiedererwärmung kardioprotektiv?
  - 1.1 Kommt es zu Veränderungen morphologischer, immunhistochemischer und funktioneller Charakteristika von H9c2-Kardiomyozyten durch oxidativen Stress und Hypothermie?
  - 1.2 Welche intrazellulären Signalwege werden durch oxidativen Stress und tiefe Hypothermie aktiviert?
2. Welchen Einfluss hat tiefe Hypothermie während oxidativem Stress auf das Apoptose-Verhalten der H9c2-Zellen?
3. Welche Veränderungen induziert die zusätzliche Gabe von kardioplegischer Lösung auf Kardiomyozyten während oxidativem Stress?

## 2 Materialien

### 2.1 Geräte

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Bio-Fuge (Zentrifuge)	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Blotting-Kammer	Bio-Rad, München, Deutschland
Brutschrank (37°C)	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Elektrophorese-Kammer	Bio-Rad, München, Deutschland
ELISA-Platten-Reader	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Entwicklungsmaschine	Protec, Oberstenfeld, Deutschland
Fluoreszenz/Absorptions-Reader	BMG Labtech GmbH, Offenburg, Germany
Fluoreszenz-Mikroskop	Zeiss/Axio, Göttingen, Deutschland
Kühlbrutschrank (20°C - 37°C)	Mytron, Heilbad Heiligenstadt, Deutschland
Kühlzentrifuge	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Magnetrührer	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Stromversorgungsgerät	Bio-Rad, München, Deutschland
Schüttler	Heidolph, Schwabach, Deutschland
sterile Werkbank	Heraeus Instruments, Berlin, Deutschland
Thermoblock	Biometra, Göttingen, Deutschland
Vortex Genie <sup>®</sup> 2	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
Wasserbad	Biometra, Göttingen, Deutschland
Zellkulturmikroskop	Motic, Neolab, Heidelberg, Deutschland
Zellkulturmikroskop-Kamera	uEye, IDS, Obersulm, Deutschland

### 2.2 Chemikalien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
2-Mercapto-Ethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Acrylamid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Alexa Fluor 568 Phalloidin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
APS-Lösung	Serva, Heidelberg, Deutschland
BCA-Reagenz	Pierce, Rockford, USA
Bromphenol-Blau	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

---

BSA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Cardioplegicum-Lösung® 100 ml	Charité, Berlin, Deutschland
CellTiter-Glo Cell Viability Assay	Promega, Madison, USA
CM-H <sub>2</sub> DCFDA, Acetyl-Ester	Invitrogen, Oregon, USA
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
DAPI	Pierce, Rockford, USA
ECL-Detektionskit	Pierce, Rockford, USA
EDTA	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
EGTA	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Guaiacol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 %	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
HCl	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
MTT-Reagenz, 5 mg/ml	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
PMSF	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ponceau S 0,1 %, 5 % Essigsäure	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Probenpuffer, reduzierend	Thermo Scientific, Rockford, USA
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
SDS	Serva, Heidelberg, Deutschland
Stripping Puffer	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIS-Acetat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Triton X-100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau 0,5 %	Biochrom, Berlin, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

### 2.3 Zellkulturmaterialien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
24-Well Mikrotiter-Platten	TPP, Trasadingen, Schweiz
96-Well Mikrotiter-Platten	Nunc, Langenselbold, Deutschland
96-Well Mikrotiter-Platten, black-walled	Nunc, Langenselbold, Deutschland
96-Well Mikrotiter-Platten, opaque	Nunc, Langenselbold, Deutschland
Combitips <sup>®</sup>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
DMEM Flüssigmedium	Biochrom, Berlin, Deutschland
DMEM Flüssigmedium ohne Phenolrot	Biochrom, Berlin, Deutschland
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FCS	Biochrom, Berlin, Deutschland
Gelatine	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Gentamycin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Gewebekulturflaschen 75 cm <sup>2</sup> , 150 cm <sup>2</sup>	TPP, Trasadingen, Schweiz
Hepes	Biochrom, Berlin, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Multipipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Biochrom, Berlin, Deutschland
Natriumpyruvat	Biochrom, Berlin, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
Pasteurpipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PBS	Biochrom, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettierhilfe mit Akku	Integra Bioscience, Baar, Deutschland
Serologische Pipetten, 5-50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Trypsin /EDTA-Lösung	Biochrom, Berlin, Deutschland
Vakuumfiltration	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkultur-Röhrchen, 15 ml, 50 ml	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland

## 2.4 Antikörper

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Anti-AIF Antikörper	Cell Signaling, Boston, USA
Anti-Akt Antikörper	Cell Signaling, Boston, USA
Anti-Bax Antikörper	Cell Signaling, Boston, USA
Anti-Bcl-2 Antikörper	Cell Signaling, Boston, USA
Anti-Caspase-3 Antikörper	Cell Signaling, Boston, USA
Anti-Caspase-9 Antikörper	Cell Signaling, Boston, USA
Anti-Hämoxygenase-1 Antikörper	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
Anti-p53 Antikörper	Abcam, Cambridge, UK
Anti-pAkt Antikörper	Cell Signaling, Boston, USA
Anti-PARP Antikörper	Cell Signaling, Boston, USA
Anti-pHiston H2AX Antikörper	Cell Signaling, Boston, USA
Anti-pp53 Antikörper	Cell Signaling, Boston, USA
Anti-Rabbit IgG Antikörper	Jackson Laboratory, Maine, USA
Anti- $\beta$ -Aktin Antikörper	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
M30 CytoDEATH, Fluorescein	Roche, Mannheim, Deutschland

## 2.5 Sonstige Materialien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Blotting-Filterpapier	Bio-Rad, München, Deutschland
Deckgläser für Immunhistochemie	VWR, Darmstadt, Deutschland
Deckgläser für Westernblot	Biostep GmbH, Jahnsdorf, Deutschland
Gel-Kämme	Bio-Rad, München, Deutschland
Hyperfilme	Bio-Rad, München, Deutschland
Nitrozellulosemembran	Bio-Rad, München, Deutschland
(Plus-)Marker, vorgefärbt	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Spacer-Platten	Biostep GmbH, Jahnsdorf, Deutschland
Zellschaber	TPP, Trasadingen, Schweiz



### **3 Methoden**

#### **3.1 Zellkultur**

Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden Zellen der kardiomyozytären Zelllinie H9c2 von der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA) verwendet. Die Zelllinie H9c2 wurde ursprünglich 1976 aus embryonalem Gewebe des Ventrikelmyokards von BD1X-Ratten isoliert [86, 87]. In Untersuchungen der H9c2-Zellen konnten typische Charakteristika von Herzmuskelzellen nachgewiesen werden, u.a. kardiale L-Typ-Calciumkanäle und eine Art kardiale Zellmembran und -oberfläche [88, 89]. So haben sich H9c2-Zellen trotz einiger geringer Unterschiede in der kardiologischen Forschung als Standardzellmodell durchgesetzt, da sie zuverlässig kultivierbar und in ihrem Expressionsprofil und den Signaltransduktionswegen mit denen frisch extrahierter neonataler Rattenkardiomyozyten vergleichbar sind.

Die Kryokultur wurde schonend aufgetaut. 24 Stunden nach der Ausplattierung wurde das Kryo-Medium, welches DMSO enthält, gegen normales Nährmedium ausgetauscht. In der Erhaltungskultur wurde das Zellkulturmedium regelmäßig alle zwei bis drei Tage gewechselt. Das Kulturmedium bestand aus DMEM mit 10 % FCS, 2 % L-Glutamin, 2 % HEPES, 2 % Natriumpyruvat, 2 % Natriumhydrogencarbonat, je 1 % Penicillin/Streptomycin und Gentamycin (10 mg/ml).

Bei Erreichen eines 80 % konfluenten Zellrasens wurde die Kultur im Verhältnis 1:3:1:4 passagiert. Für die einzelnen Experimente wurden Zellen aus mindestens drei unterschiedlichen Kryostocks bis maximal zur 20. Zellpassage verwendet.

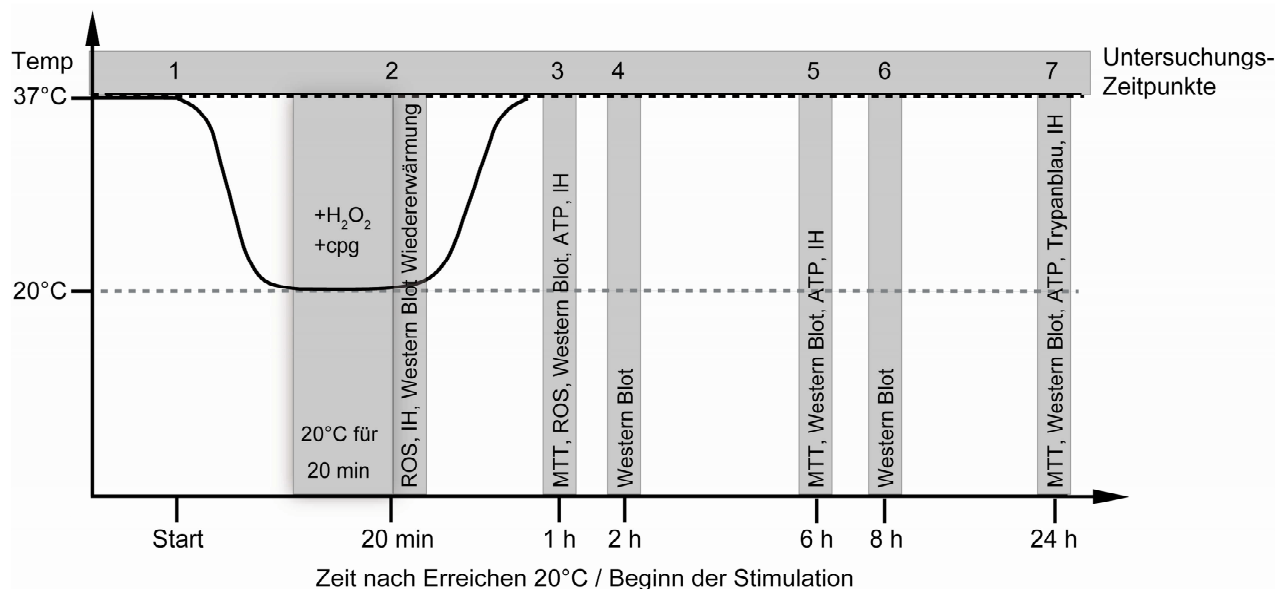
#### **3.2 Zelldifferenzierung**

Um die Vergleichbarkeit des Zellkulturmodells mit den Gegebenheiten in der Klinik noch weiter zu verbessern, wurden die Zellen synchronisiert. Dies wird typischerweise durch ein Mangelmedium (2 % fetales Kälberserum statt 10 %) erreicht, mit dem die Zellen 24 Stunden vor Versuchsbeginn inkubiert wurden [90-93]. Das 2 %ige Mangelmedium wurde für alle Versuche verwendet.

#### **3.3 Das dynamisches Zeit-Temperatur-Protokoll**

Das dynamische Zeit-Temperatur-Protokoll wurde an die Situation in der Klinik während offener Herzoperationen bei Neugeborenen und Säuglingen unter Einsatz der Herz-

Lungen-Maschine angelehnt. Die ausdifferenzierten H9c2-Zellen wurden mithilfe eines Kühlbrutschrankes innerhalb von 35 Minuten auf 20°C gekühlt (Induktion der Hypothermie), für 20 Minuten bei 20°C belassen (Erhaltung der Hypothermie) und anschließend wiedererwärmt (innerhalb von 20 Minuten von 20°C auf 37°C). Es folgte eine Nachbeobachtungszeit von 24 Stunden. Die Luftfeuchtigkeit während der Experimente war 100 %, der CO<sub>2</sub>-Gehalt lag bei 5 %. Beim Erreichen der 20°C-Temperaturmarke wurden die Zellen mit Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 mM) und/oder Kardioplegielösung (sterile und endotoxinfreie Infusionslösung, 1000 ml enthalten: Magnesiumaspartat x 2 H<sub>2</sub>O 2,575 g; ProcainHCl 0,3 g; Xylitol 4,5 g; Wasser für Injektionszwecke) im Verhältnis 3:1 in 2 % Medium behandelt. Nach 20 Minuten erfolgte ein Mediumwechsel. Die Kardiomyozyten wurden zu sieben festgelegten Zeitpunkten untersucht: 1) Start, 2) direkt vor der Wiedererwärmung = nach 20 Minuten bei 20°C, 3) eine Stunde nach Erreichen 20°C, 4) zwei Stunden nach Erreichen 20°C, 5) sechs Stunden nach Erreichen 20°C, 6) acht Stunden nach Erreichen 20°C, 7) 24 Stunden nach Erreichen 20°C. Gleichzeitig wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und/oder mit Kardioplegielösung stimulierte und unstimulierte H9c2-Zellen kontinuierlich als Kontrolle bei 37°C belassen (siehe Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Das Zeit-Temperatur-Protokoll mit Methoden

Temp = Temperatur, ROS = Bestimmung Reaktiver Sauerstoffradikale, IH = Immunhistologische Färbung, ATP = Messung des ATP-Gehalts der Zelle, MTT = Vitalitäts-/Aktivitätsassay, cpg = Kardioplegielösung. 1) Start, 2) direkt vor der Wiedererwärmung = nach 20 min bei 20°C, 3) eine Stunde nach Erreichen 20°C, 4) zwei Stunden nach Erreichen 20°C, 5) sechs Stunden nach Erreichen 20°C, 6) acht Stunden nach Erreichen 20°C, 7) 24 Stunden nach Erreichen 20°C

**Tabelle 3: Versuchsgruppen**

1. 37°C Kontrolle, ungeschädigt	2. Dynamisch Kontrolle, ungeschädigt
3. 37°C, geschädigt mit 2 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	4. Dynamisch, geschädigt mit 2 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
5. 37°C, stimuliert mit Kardioplegielösung	6. Dynamisch, stimuliert mit Kardioplegielösung
7. 37°C, geschädigt mit 2 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , zusätzlich Kardioplegieadministration	8. Dynamisch, geschädigt mit 2 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , zusätzlich Kardioplegieadministration

### 3.4 Trypanblau-Färbung zur Zellzählung

Als Methode zur Zellzahleinstellung und Vitalitätsmessung wurde die Trypanblau-Färbung genutzt. Trypanblau ist ein saurer Farbstoffkomplex, der in anionischer Form an intrazelluläre Proteine bindet. Der Farbstoff Trypanblau dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Zytosol und färbt diese Zellen tiefblau. Vitale Zellen mit intakter Zellmembran stellen sich unter dem Mikroskop leuchtend hell dar. H9c2-Zellen wurden in einer Konzentration von  $3 \times 10^5$  Zellen auf Petrischalen (22 cm<sup>2</sup>) ausgesät. 24 Stunden nach Kühlung (Erreichen 20°C) wurden die Zellen mit Trypanblau (0,25 %) in einer 96-Well Rundbodenplatte gefärbt und anschließend in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Da die Zellen aus dem Überstand mitgezählt wurden, wurden sowohl die adhärenenten vitalen als auch die vitalen, jedoch nicht mehr zur Adhäsion fähigen Zellen erfasst. Des Weiteren wurden bereits im Überstand vorhandene tote Zellen gezählt.

### 3.5 Zytotoxizitätsmessung: LDH-Ausschüttung

Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurde ein Zytotoxizitäts-Kit, der auf dem kolorimetrischen Nachweis der Laktatdehydrogenase (LDH) im Überstand basiert, verwendet [94]. Das Enzym LDH liegt fast in jeder Zelle im Zytosol vor und katalysiert die Oxidation von Laktat zu Pyruvat mit der gleichzeitigen Reduktion von NAD<sup>+</sup> zu NADH/H<sup>+</sup> bzw. dessen Rückreaktion. Die Aktivität des Enzyms lässt sich in einer zweiten Enzymreaktion nachweisen, bei der das Enzym Diaphorase die Reduktion von einem farblosen Tetrazoliumsalz zu einem roten Formazansalz katalysiert, was fotometrisch detektiert werden kann. Die Menge des gebildeten Formazans ist direkt proportional zur LDH-Aktivität und korreliert mit der Anzahl toter Zellen [95]. In Doppelbestimmung wurden jeweils 100 µl des Überstandes aus dem Versuchsansatz ( $2 \times 10^4$  Zellen/Well) entnommen und zur Messung der LDH-Konzentration auf eine

neue 96-Well Mikrotiterplatte gegeben. Zum Überstand wurden jeweils 100 µl der Reaktionslösung hinzugegeben. Die Reaktionslösung setzt sich aus einem Katalysator (Diaphorase/NAD<sup>+</sup>) und dem INT-Farbstoff in einem Mischungsverhältnis von 1:45 zusammen. Die Mikrotiterplatte wurde nachfolgend lichtgeschützt bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubiert. Die Abstopfung der Reaktion erfolgte mit 1 N HCl. Nachfolgend wurden die Proben innerhalb von 15 Minuten bei 485 nm photometrisch gemessen. Als Kontrollen dienten die maximale LDH-Ausschüttung (100 %), die durch die Lysierung der Zellen eines Wells mit 2 % Triton X-100 ermittelt wurde und die minimale Ausschüttung von LDH (basale Freisetzung), d. h. der Überstand unbehandelter Zellen zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns. Aus den gemessenen Werten konnte mit Hilfe der vom Hersteller mitgelieferten Formel die Zytotoxizität in Prozent berechnet werden.

$$\text{Zytotoxizität (\%)} = \frac{\text{Messwert} - \text{minimale LDH-Ausschüttung}}{\text{Maximale LDH-Ausschüttung} - \text{minimale LDH-Ausschüttung}} \times 100$$

### 3.6 MTT: Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase

Der verwendete MTT-Assay basiert auf der Umwandlung des gelblichen, wasserlöslichen 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) durch die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen zum blau-violetten wasserunlöslichen Formazan. Somit eignet sich der Test sowohl zum Nachweis vitaler Zellen als auch zur Beurteilung der mitochondrialen Aktivität. Des Weiteren lässt sich eine Aussage über das Proliferationsverhalten der untersuchten Zellen treffen [96, 97].

Die H9c2-Zellen wurden auf eine mit 0,2% Gelatine beschichtete 96-Well Mikrotiterplatte in einer Konzentration von  $2 \times 10^4$  Zellen/Well ausgesät und für 24 Stunden in 2 % Mangelmedium bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die zu testenden Substanzen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Kardioplegielösung) entsprechend des in Abbildung 2 dargestellten Protokolls in 2 % Mangelmedium angesetzt und je 200 µl/Well auf die Zellen in der Mikrotiterplatte pipettiert. Eine, sechs und 24 Stunden nach Stimulation wurde MTT-Reagenz (0,5 mg/ml) in 2 % Mangelmedium à 200 µl/Well auf die Zellen gegeben und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Nachdem die Zellen 20 Minuten mit Isopropanol + 0,04 % HCl lysiert wurden, erfolgte die Messung des Farbumschlages bei  $\lambda_{em} = 570$  nm im Platten-Reader.

### 3.7 Bestimmung des ATP-Gehaltes mittels CellTiter Glo<sup>®</sup>

Für die intrazelluläre ATP-Messung wurde der CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Test verwendet. Die Zellen wurden in Mangelmedium mit 2 % hitzeinaktiviertem FCS mit einer Zellzahl von 4000 Zellen/Well in weißen, für Absorbtionsmessungen geeigneten 96-Well Zellkulturplatten ausplattiert. Nach Adhärenz der Zellen über Nacht und einem Mediumwechsel (2 % Mangelmedium, hitzeinaktiviertes FCS) fanden die Hypothermie-versuche statt. Die ATP-Messung erfolgte eine, sechs und 24 Stunden nach Schädigung (Abbildung 2). Das Medium wurde zu diesen Zeiten abpipettiert und durch 100 µl neues Medium plus 100 µl CellTiter-Glo<sup>®</sup> Reagenz pro Well ersetzt. Nach Lysieren der Zellen und einer Inkubation bei Raumtemperatur für 10 Minuten wurde die Lumineszenzintensität der Proben in einem Absorbtionsreader gemessen und anhand der mitgeführten Standardreihe quantitativ ausgewertet.

### 3.8 Bestimmung freier Sauerstoffradikale mittels CM-H<sub>2</sub>DCFDA

Um die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu analysieren, wurde CM-H<sub>2</sub>DCFDA als Detektionsreagenz verwendet. CM-H<sub>2</sub>DCFDA ist ein nicht fluoreszierendes Chloromethyl-Derivat des H<sub>2</sub>DCFDA, welches durch passive Diffusion in lebenden Zellen angereichert wird. In der Zelle werden die Acetat-Gruppen durch intrazelluläre Esterasen abgespalten. Eine intrazelluläre Oxidation des Farbstoffes führt dann zu einem fluoreszierendem CMDCF, das aufgrund seiner Polarität in der Zelle verbleibt. Die Oxidation des nicht-fluoreszierenden 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat (H<sub>2</sub>DCFDA) zu dem stark fluoreszierenden 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF) geschieht durch in der Zelle entstandene ROS, wobei die Fluoreszenzintensität mit der Menge der ROS-Bildung korreliert [98, 99].

Für die ROS-Messung wurden die Zellen in Mangelmedium in schwarzen 96-Well-Platten ausplattiert ( $1,5 \times 10^4$ /Well) und 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Zum Ausplattieren und auch während der Dauer der Versuche wurde Phenolrot-freies Medium mit 2 % FCS verwendet, um eine Interaktion des Farbstoffes mit dem Reagenz zu verhindern. Um eine verminderte Aufnahme oder verringerte Spaltung der Ester durch die Hypothermiebehandlung auszuschließen, wurden die Zellen nach einem Mediumwechsel 30 Minuten mit 10 µM CM-H<sub>2</sub>DCFDA angesetzt und in sterilem PBS inkubiert. Anschließend wurden die H9c2-Zellen entsprechend des Zeit-Temperatur-Protokolls (Abbildung 2) behandelt. Zu den gewählten Zeitpunkten (nach 20 Minuten

Schädigung bei 37°C bzw. 20°C, sowie eine Stunde nach Schädigung) wurden die Zellen einmalig mit PBS gewaschen und 30 Minuten in Phenolrot-freiem Medium inkubiert. Im Anschluss wurde das Medium abpipettiert, die Platten noch einmal mit sterilem PBS gewaschen und die Zellen wurden für eine Minute mit steril filtriertem Trypanblau (0,025 %) gefärbt, um die intrazelluläre Autofluoreszenz zu vermindern [100]. Abschließend wurde der Überstand entfernt und die Extinktion der Zellen bei  $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$  in einem Fluoreszenzplattenreader gemessen.

### **3.9 Phasenkontrastmikroskopie**

Zur morphologischen Analyse und Dokumentation der Veränderungen der H9c2-Kardiomyozyten nach  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Schädigung und/oder Kardioplegielösung unter Kühlung und Wiedererwärmung wurden die Zellen konfluent in Petrischalen ausgesät ( $1,5 \times 10^6$  Zellen/60  $\text{cm}^2$ ) und 24 Stunden nach Stimulation mit einem Phasenkontrastmikroskop bei 40-facher Vergrößerung dargestellt und aufgenommen. Es wurden pro Versuch und Petrischale drei verschiedene Ausschnitte ausgewählt und fotografiert.

### **3.10 Immunhistochemische Färbungen mit anti-H2AX/DAPI, M30 CytoDEATH, F-Actin/Phalloidin**

Zur Darstellung früher und andauernder apoptotischer Vorgänge wurden H9c2-Zellen mit Hilfe des M30 CytoDEATH-Kits eine bzw. sechs Stunden nach Stimulation gefärbt. Der Antikörper M30 CytoDEATH erkennt eine durch Caspasen induzierte Spaltung von Cytokeratin 18 [101]. Eine positive Färbung mit M30 CytoDEATH findet nur im Zytoplasma von apoptotischen Zellen statt. Zur besseren Beurteilung der Zellmorphologie wurden die Zellen zusätzlich mit Phalloidin gefärbt. Die Markierung der Zellkerne erfolgte mit DAPI. Anschließend wurden die Präparate mit Immunfluoreszenz-Mikroskopie ausgewertet.

$4 \times 10^4$  H9c2-Kardiomyozyten wurden auf mit 0,2 % Gelatine beschichtete Deckgläschen in Mangelmedium in einer 24-Well Platte ausgesät und 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach einem Mediumwechsel wurde das Versuchsprotokoll (Abbildung 2) durchgeführt und eine, sechs und 24 Stunden nach Stimulation wurden die Zellen nach einmaligem Waschen mit sterilem PBS mit 4 % Paraformaldehyd (pH 7,4; 15 Minuten) fixiert. Vor Beginn der Färbung wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und zum Permeabilisieren mit 0,1 % Triton X-100 in PBS für fünf Minuten inkubiert. Nach

erneutem Waschen (PBS, 3x) erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 1 % BSA in PBS für 30 Minuten. Danach wurden die Zellen 45 Minuten im Dunkeln mit M30 CytoDEATH Fluorescein 1:200 in PBS + 1 % BSA inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Färbung mit Alexa Fluor 568 (Phalloidin), 1:40 in PBS + 1 % BSA, für 30 Minuten ebenfalls im Dunkeln. Anschließend wurden die Deckgläschen dreimal mit PBS gewaschen und die Kerne der H9c2-Zellen mit DAPI (1 mg/ml, 1:1000 in PBS) gefärbt. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen auf Objektträgern mit Immunomount eingedeckt, und nach ausreichender Trocknung mikroskopiert und fotodokumentiert.

### **3.11 Untersuchung der intrazellulären Signalwege mittels Western Blot Technik**

#### **3.11.1 Gewinnung der Proteine**

Zur Proteingewinnung wurden die H9c2-Zellen ( $1,5 \times 10^6$  Zellen/60 cm<sup>2</sup>) auf Petrischalen ausgesät. Die 24-stündige Inkubation mit Mangelmedium erfolgte nach Erreichen der Konfluenz. Nach einem Mediumwechsel wurde das Experiment begonnen. Direkt nach Schädigung, 10, 20, 30, 45 Minuten, und eine, zwei, sechs, acht und 24 Stunden nach der Stimulation wurden die Stoffwechselprozesse und intrazelluläre Signalkaskaden durch eiskaltes PBS abgestoppt. Um auch bereits apoptotische Zellen im Proteinpellet zu erhalten, wurden die Zellen im Medium abgeschabt, die Zellsuspension in ein Zellkulturröhrchen überführt und fünf Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 1 ml kaltem PBS resuspendiert, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei 2000 U/min fünf Minuten zentrifugiert. Nach erneutem Waschen mit kaltem PBS und fünf Minuten Zentrifugation wurde das Pellet in 60 µl Proteinlysis-Puffer, bestehend aus 20 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 % Triton X-100, 1 mM PMSF und einem Protease Inhibitor Cocktail, resuspendiert und bei -80°C gelagert.

#### **3.11.2 Aufreinigung der Proteine**

Die gewonnenen Proben wurden bei 4°C aufgetaut und anschließend mit einer ausgezogenen Pipettenspitze fünf Mal luftblasenfrei resuspendiert. Nachfolgend wurden die Proben bei 12000 U/min für 10 Minuten in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### **3.11.3 Bestimmung der Proteinkonzentrationen mit der BCA-Methode**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein BCA-Protein Assay gemäß der Gebrauchsanweisung verwendet, wobei die 1:10 mit Aqua bidest verdünnten Proben auf eine 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert und für 30 Minuten bei 37°C mit der BCA-Lösung (50:1) inkubiert wurden. Anschließend konnten die Proteinkonzentrationen im ELISA-Plattenreader bei 550 nm gemessen und anhand einer mitgeführten Standardreihe berechnet werden.

### **3.11.4 Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die gemessenen Proteinproben wurden mit reduzierendem Proben-Puffer (5-fach konzentriert) 1:4 verdünnt und für fünf Minuten bei 95°C gekocht. Das im Probenpuffer enthaltene SDS bewirkt die Denaturierung der Proteine, und das enthaltene Dithiothreitol (DTT) reduziert die vorhandenen Disulfid-Brücken. Beim Anlegen einer elektrischen Spannung werden so die zu untersuchenden Proteine entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Nach dem Kochen wurden die Proben zur Kondensation kurzzeitig in Eis gelagert und anschließend zentrifugiert (30 Sekunden, 2000 U/min). In Abhängigkeit der Molekulargewichte der nachzuweisenden Proteine wurden Trenngele mit 12-20 % Acrylamid zur Gelelektrophorese (Bio-Rad System; 1,5 mm Spacer-Platten) verwendet. Für große Proteine wurden 12 %ige Gele verwendet, für kleinere Proteine wurden Gele mit 15-20 % Acrylamid genutzt. Durch die Zugabe von APS und TEMED, die die gebildeten Radikale stabilisieren und so eine gleichmäßige Polymerisation bewirken, kommt es zur Radikalketten-Polymerisation von Acrylamid und dem vernetzenden Bisacrylamid, wodurch eine poröse Gelmatrix erzeugt wird. Das auspolymerisierte Trenngel wurde mit einem Sammelgel mit 4 % Acrylamid überschichtet, das in Anwesenheit eines zehnzinkigen Kammes verfestigte. Anschließend wurden die Proben und die vorgefärbten Markerproteine aufgetragen. Zum Auftrennen der Proteine wurden eine Spannung von 80 V und eine Stromstärke von 400 mA über 1,5-3 Stunden verwendet.

### **3.11.5 Transfer der Proteine mit der Tankblotting-Methode**

Für den anschließenden Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wurde die Tankblotting-Methode gemäß Herstellerangaben (Bio-Rad) verwendet. Bei einer Spannung von 100 V und einer Stromstärke von 400 mA wurden die Proteine auf die Nitrocellulosemembran transferiert. Der Blottingpuffer wurde während dieser Zeit mit



einem Eisacku und einem Magnetrührer gekühlt, um eine Hitzeschädigung der Proteine zu verhindern. Nach 60 Minuten wurde der Blottingvorgang beendet und die Membran als Transferkontrolle mit dem Farbstoff Ponceau S (0,1 % + 5 % Essigsäure) gefärbt. Bis zur Verwendung wurden die Blots trocken und dunkel gelagert.

**Tabelle 4: Zusammensetzung der verwendeten Puffer**

<b>Elektrophorese-Puffer:</b> TRIS-Base, 25 mM Glycin, 250 mM SDS 0,1 %	<b>Blotting-Puffer:</b> Glycin, 192 mM Tris-Base, 25 mM Methanol 20 %
<b>Sammelgelpuffer:</b> 0,5 M TRIS-HCl (pH 6,8) 30,28 g TRIS ad 350 ml Aqua bidest pH einstellen mit 1 N HCl ad 500 ml	<b>Trenngelpuffer:</b> 1,5 M TRIS-HCl (pH 8,8) 90,84 g TRIS ad 350 ml Aqua bidest pH einstellen mit 1 N HCl ad 500 ml
<b>Sammelgel:</b> Sammelgelpuffer, 0,5 M (pH 6,8) SDS-Lösung 10 % APS-Lösung 10 % Acrylamid 5 % TEMED (nach Gel-Prozentigkeit) H <sub>2</sub> O (nach Gel-Prozentigkeit)	<b>Trenngel:</b> Trenngelpuffer, 1,5 M (pH 8,8) SDS-Lösung 10 % APS-Lösung 10 % Acrylamid 12-20 % TEMED (nach Gel-Prozentigkeit) H <sub>2</sub> O (nach Gel-Prozentigkeit)

### 3.11.6 Detektion der Proteine

Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurden die Nitrozellulosemembranen mit den transferierten Proteinen eine Stunde mit 5 % Magermilchpulver in PBS und 0,05 % Tween für eine Stunde blockiert. Der Primärantikörper wurde anschließend gemäß Herstellerangaben in PBS-Tween angesetzt und bei 4°C über Nacht unter leichtem Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen dreimal für 10 Minuten mit PBS-Tween gewaschen, dann wurde für 1,5 Stunden ein enzymgekoppelter Sekundärantikörper (Donkey anti Rabbit, Donkey anti Mouse; 1:10000 in PBS-Tween) auf die Membranen gegeben. Zur Entwicklung mit Röntgenfilmen wurde als Substrat für das Enzym des Sekundärantikörpers die Reagenzien 1 und 2 des Enhanced Chemiluminescence (ECL)-Kits 1:2 angesetzt (ca. 2 ml pro Blot) und für eine Minute bei Raumtemperatur auf den Membranen belassen. Anschließend wurden die Membranen zwischen zwei Folien als Schutz vor Austrocknung in Filmkassetten überführt. In einer

Dunkelkammer wurden Röntgenfilme aufgelegt (je nach Stärke der Chemilumineszenz 30 Sekunden bis 40 Minuten), wobei das vom Enzym umgewandelte Substrat mit seiner Lumineszenz den Film belichtete. Anschließend wurden die Filme durch eine Entwicklungsmaschine entwickelt. Nach Detektion der gewünschten Proteine wurde  $\beta$ -Actin 1:15000 als Ladekontrolle nachgewiesen.

### **3.11.7 Densitometrische Analyse**

Zur photodensitometrischen Analyse und statistischen Auswertung wurden die Röntgenfilme mit 600 dpi eingescannt. Die Analyse der detektierten Banden erfolgte mit dem Java-basierten Programm ImageJ (National Institute of Health, freie Software). Die Zu- oder Abnahme der Bandendicke wurde in Relation zum Startwert (Start = 1) untersucht. Die gleichmäßige Auftragung wurde mittels  $\beta$ -Actin-Ladekontrolle überprüft. In den Grafiken wurde die relative Erhöhung (ein Vielfaches vom Startwert) der Bandendicke dargestellt, miteinander verglichen und statistisch auf Signifikanzen geprüft.

### **3.12 Statistische Analyse**

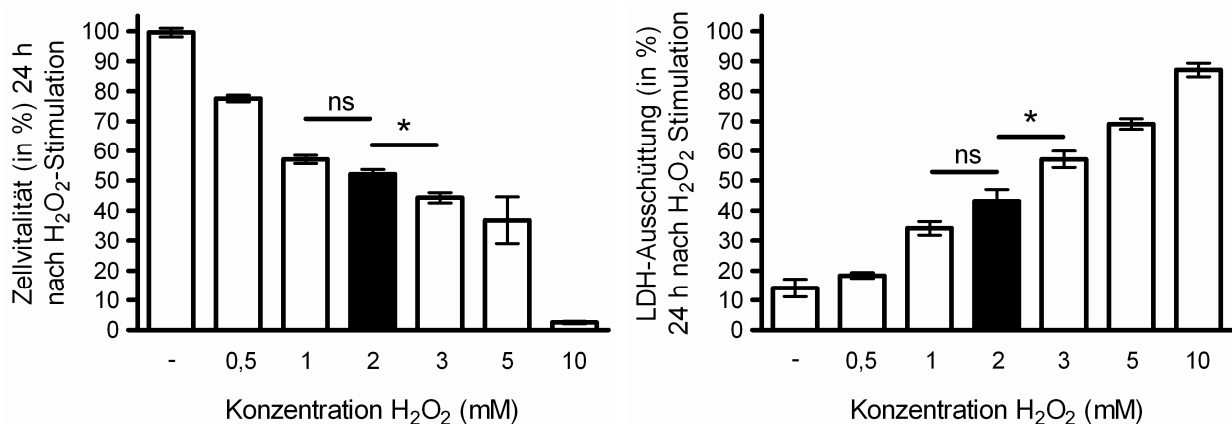
Alle Auswertungs- und Statistikprogramme wurden mit dem Betriebssystem Microsoft Windows XP ausgeführt. Als Basis zur statistischen Analyse wurden alle Versuche mindestens dreimal durchgeführt und es wurden unterschiedliche Stocks und/oder Passagen verwendet. Die Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. Zur statistischen Auswertung und zur Diagrammgestaltung wurde das Programm „GraphPad Prism, Version 4.0“ benutzt. Die Überprüfung der statistischen Signifikanz erfolgte für nicht gepaarte Stichproben mit dem einseitigen Student-t-Test. Zum Vergleich von mehr als zwei Gruppen zu einem Zeitwert wurde der One-Way ANOVA und zum Vergleich mehrerer Gruppen über die Zeit wurde der Two-Way ANOVA jeweils mit post-hoc Testung verwendet. p-Werte kleiner 0,05 \*, kleiner 0,01 \*\* und kleiner 0,001 \*\*\* wurden als statistisch signifikant gewertet. Die Erstellung der Abbildungen erfolgte mit Adobe Illustrator CS3.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Zellvitalität

#### 4.1.1 Einfluss unterschiedlicher H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen auf die Zellvitalität

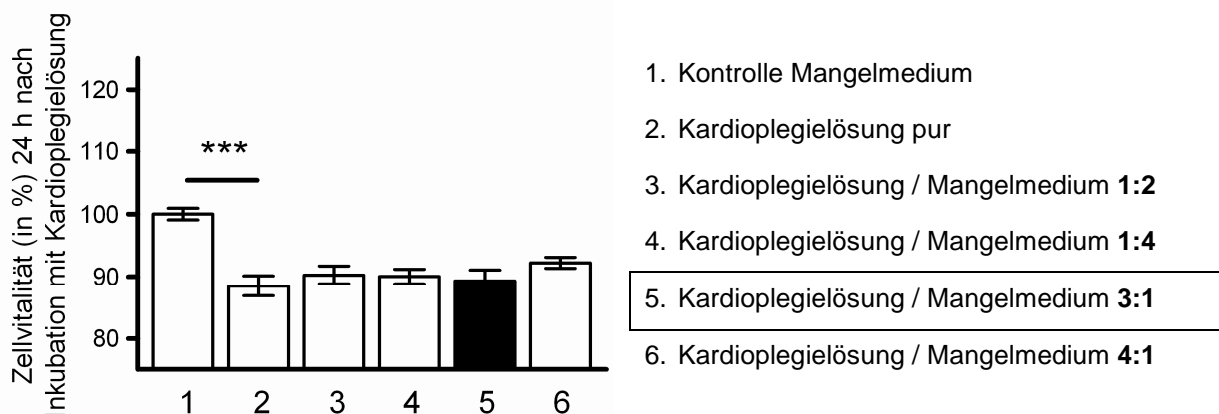
In Vorversuchen wurde die Abhängigkeit der Zellschädigung bzw. Vitalität von der eingesetzten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration ermittelt. Dafür wurden die Kardiomyozyten 20 Minuten bei 37°C mit unterschiedlichen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen von 0,5 bis 10 mM inkubiert, danach erfolgte ein Mediumwechsel. 24 Stunden nach der Inkubation wurde der Überstand auf seine LDH-Konzentration untersucht und die Vitalität der Zellen mittels MTT Assay gemessen. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte konzentrationsabhängig eine Abnahme der Zellvitalität und parallel eine Zunahme der LDH-Ausschüttung. Ab einer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration von 3 mM waren über die Hälfte der Zellen tot. Diese Konzentration resultierte in einer Zellvitalität von 44,5 % (Abbildung 3 A) und einer LDH-Ausschüttung von 55,4 % (Abbildung 3 B). Bei einer Konzentration von 10 mM waren weniger als 5 % der Zellen vital. Für alle folgenden Versuche wurde eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 mM (in der Abbildung 3 jeweils schwarz hervorgehoben) für 20 Minuten gewählt, da bei dieser Konzentration nach 24 Stunden über 50 % Zellvitalität (Abbildung 3 A) und weniger als 50 % LDH-Ausschüttung (Abbildung 3 B) vorhanden waren.



**Abbildung 3:** Konzentrationsabhängige Zytotoxizität von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Zellvitalitätstest (A) und LDH-Ausschüttung (B) von H9c2-Zellen nach Gabe unterschiedlicher Konzentrationen von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 mM bis 10 mM); \* p<0,05.

#### 4.1.2 Einfluss der Kardioplegielösung auf die Zellvitalität

In Vorversuchen wurde der Einfluss unverdünnter Kardioplegielösung auf die Zellvitalität getestet. Zusätzlich wurde untersucht, ob das Mischungsverhältnis von Kardioplegielösung zu 2 % Mangelmedium einen Einfluss auf die Zellvitalität hat. Die Kardiomyozyten wurden dafür 20 Minuten bei 37°C mit Kardioplegielösung mit und ohne Mediumzusatz (Abbildung 4) inkubiert. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel.

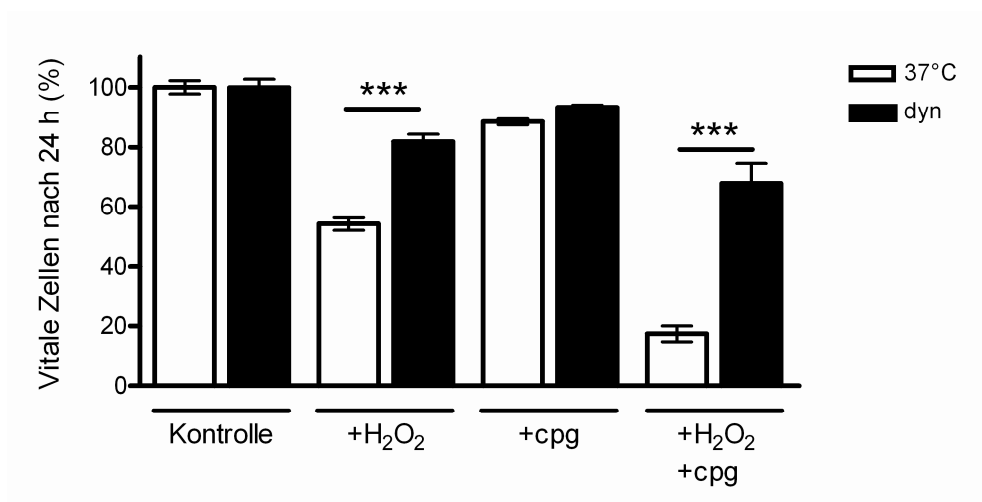


**Abbildung 4:** Zellvitalität von H9c2-Zellen 24 h nach Administration von Kardioplegielösung in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen. Gewähltes Mischungsverhältnis schwarz hervorgehoben. \*\*\*  $p < 0,001$ .

24 Stunden nach der Inkubation wurde die Vitalität der Zellen mittels MTT Assay gemessen. Unabhängig davon, ob die Kardioplegielösung unverdünnt auf die Zellen gegeben oder mit Mangelmedium verdünnt wurde, führte die Inkubation der H9c2-Zellen mit den verschiedenen Mischungsansätzen durchschnittlich zu einer signifikanten Reduktion der Zellvitalität auf 90 % (Abbildung 4). Um im Zellkulturmodell eine annähernd physiologische Situation mit keiner absoluten Mangelversorgung abzubilden, wurde für alle folgenden Versuche ein Mischungsverhältnis von drei Teilen Kardioplegielösung zu einem Teil Mangelmedium gewählt.

### 4.1.3 Einfluss der Hypothermie auf die Zellvitalität

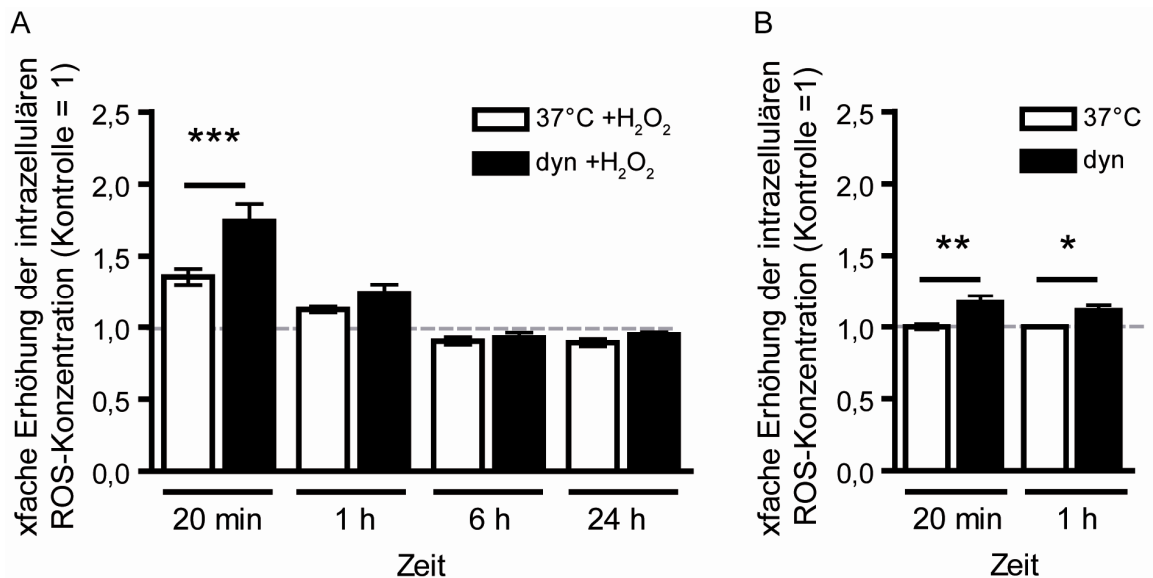
Weiterhin wurde der Einfluss der Hypothermie auf die Zellvitalität ohne und mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung und/oder Kardioplegielösung mittels Trypanblau-Färbung untersucht (Abbildung 5). Hypothermie hatte keinen Einfluss auf die Zellvitalität unstimulierter H9c2-Zellen. Es zeigte sich, dass Hypothermie bei gleichzeitiger Schädigung mit 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Zellvitalität signifikant auf 88,7 % erhöhte im Vergleich zu 54,2 % in der 37°C Kontrollgruppe. Auf die Kombination aus Kardioplegielösung und 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reagierten die normothermen Zellen mit einem ausgeprägten, signifikanten Vitalitätsverlust auf 17,3 %. Die gekühlten und wiedererwärmten Zellen waren signifikant vitaler (67,9 %).



**Abbildung 5:** Einfluss der Hypothermie auf die Zellvitalität 24 h nach Kühlung und Stimulation. dyn = gekühlte und wiedererwärmte Zellen, +H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, +cpg = Kardioplegielösung; \*\*\* p<0,001.

#### 4.2 ROS-Konzentration nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stimulation und der Einfluss der Hypothermie

Die Bildung von übermäßig vielen reaktiven Sauerstoffspezies führt in der Zelle zu oxidativem Stress. Diese Stoffwechsellage kann einerseits zur Schädigung des Myokards führen, z.B. im Rahmen eines Ischämie-Reperfusionsschadens [102], andererseits können ROS auch in niedriger Konzentration eine zellprotektive Wirkung entfalten [103].

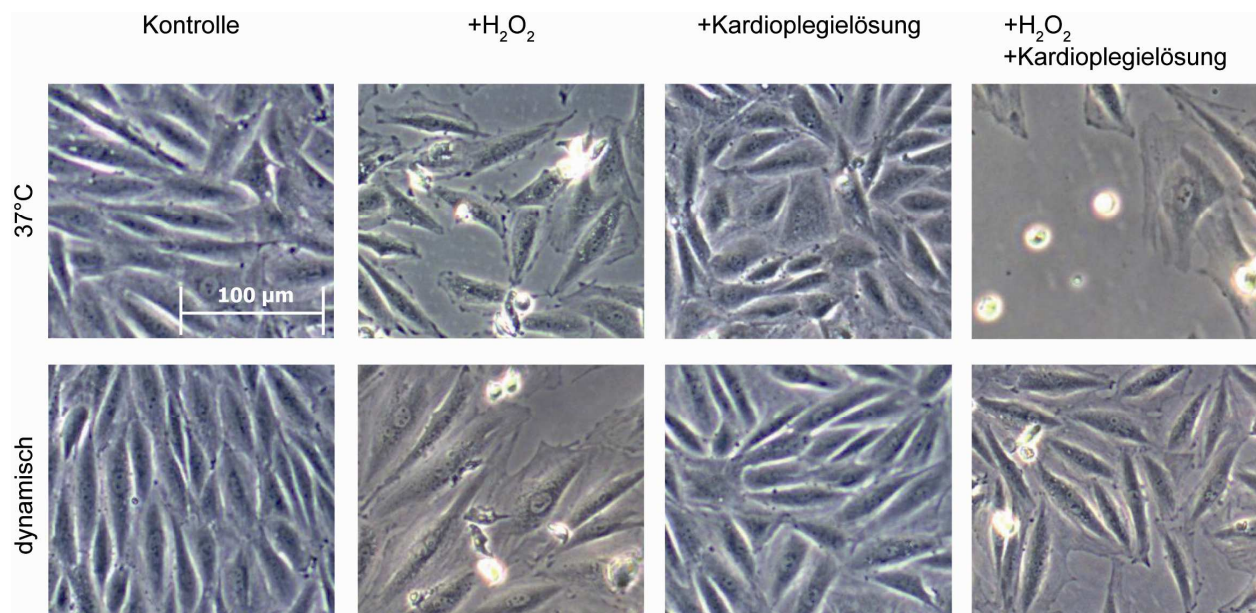


**Abbildung 6:** Intrazelluläre ROS-Konzentration 20 min, 1 h, 6 h und 24 h nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung (A) und 20 min und 1 h nach Kühlung in Bezug auf die unstimulierten Kontrollzellen (B). 1 = unstimulierte Kontrollzellen bei 37°C. dyn = gekühlte und wiedererwärmte Zellen, 37°C = normotherme Zellgruppe. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.

Hypothermie führte zu einer signifikant höheren Konzentration von ROS direkt nach der Schädigung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Abbildung 6 A). Nach einer Stunde war zwischen beiden Temperaturgruppen kein Unterschied mehr festzustellen. Hypothermie ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung führte ebenfalls zu einer signifikant stärkeren intrazellulären ROS-Konzentration direkt nach Kühlung (20 min 20°C) bis eine Stunde nach Beginn der Wiedererwärmung im Vergleich zu den Zellen, die unstimuliert bei 37°C belassen wurden (Abbildung 6 B).

### 4.3 Morphologische Veränderungen 24 Stunden nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stimulation

Um morphologische Veränderungen der H9c2-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen nach 24 Stunden mittels Phasenkontrastmikroskop nativ fotodokumentiert und ausgewertet (Abbildung 7). Unstimulierte, bei Normothermie belassene H9c2-Kardiomyozyten waren spindelförmig. Hypothermie provozierte keine wesentliche Veränderung dieser Zellmorphologie. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung bei Normothermie führte zu einer flachen Zellmorphologie mit Zeichen der Membranzerstörung (Auflockerung der Zellmembran, Apoptosekörperchen) und zu einer deutlichen Zellzahlminderung (vergleiche Abbildung 4). Diese Effekte konnten durch Hypothermie verhindert werden. Kardioplegielösung führte sowohl unter Normo- als auch unter Hypothermie zu einer etwas rundlicheren Zellform, wobei die physiologische Zellform erhalten blieb. Kardioplegielösung und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führten unter Normothermie zu einer massiven Zellzahlreduktion und die Zellen zeigten sich großflächig und platt. Die Kombination aus Hypothermie, Kardioplegielösung und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führte zu deutlich mehr vitalen Zellen und einer aktivierten, langgezogenen Zellmorphologie.



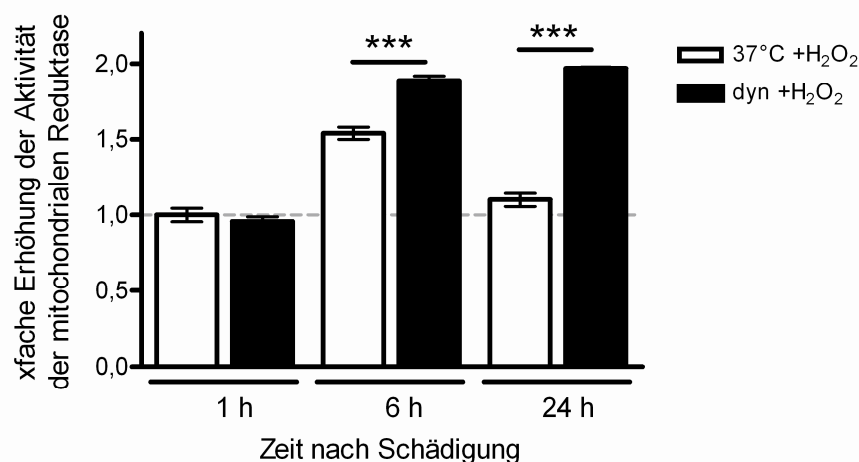
**Abbildung 7:** Phasenkontrast-Mikroskopie der H9c2-Zellen 24 h nach Inkubation ohne/mit 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und ohne/mit Kardioplegielösung bei 40-facher Vergrößerung.

#### 4.4 Einfluss der Hypothermie auf die mitochondriale Funktion

Die Verringerung zellulärer Energiereserven trägt maßgeblich zur Schädigung der Zelle durch oxidativen Stress bei. Deshalb wurden die Effekte der Hypothermie und der Kardioplegielösung auf die Energiebereitstellung der Zelle nach oxidativem Stress untersucht. Als Parameter dienten sowohl die Aktivität der mitochondrialen Reduktase als auch der intrazelluläre ATP-Gehalt.

##### 4.4.1 Einfluss der Hypothermie auf die Aktivität der mitochondrialen Reduktase nach oxidativem Stress

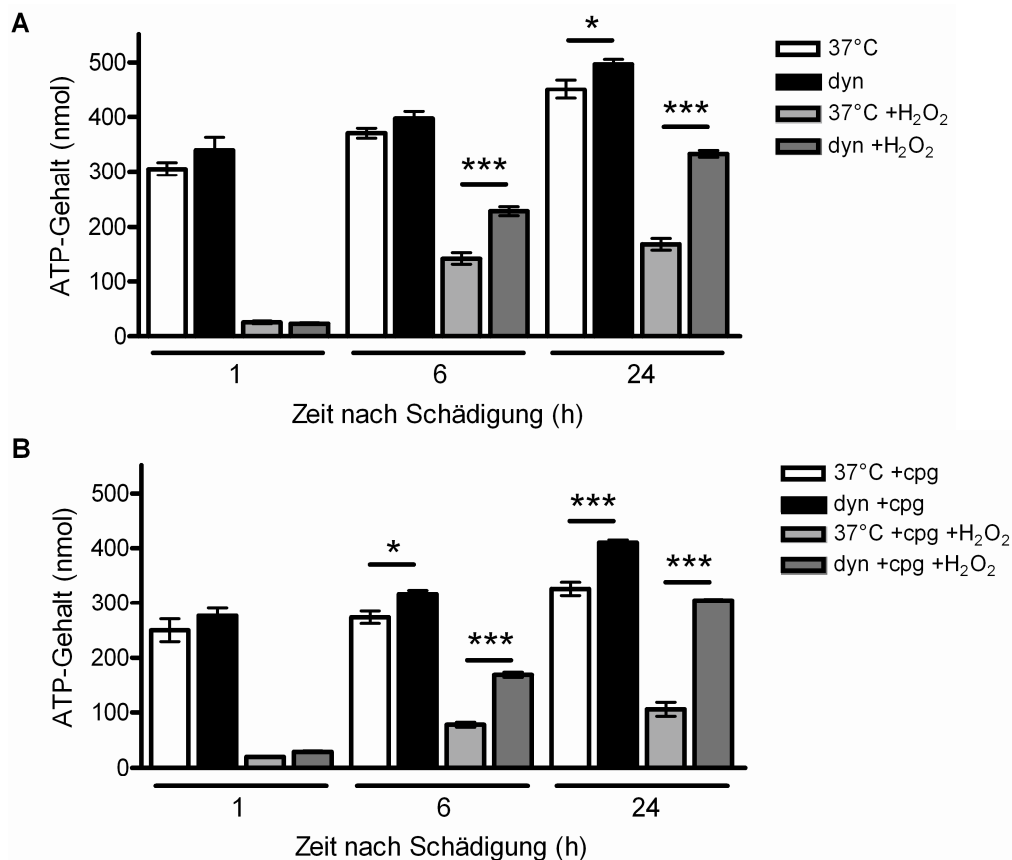
Eine Stunde nach Schädigung mit 2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  war sowohl in der normothermen als auch in der hypothermen Gruppe eine Verringerung der Aktivität der mitochondrialen Reduktase festzustellen. Die während der Schädigung gekühlten Zellen zeigten eine signifikant stärkere Erhöhung sechs und 24 Stunden nach Schädigung (Abbildung 8). Unter normothermen Bedingungen wurde nach  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Stimulation nur eine transiente Erhöhung der Reduktaseaktivität beobachtet, während nach 24 Stunden die Aktivität vergleichbar mit einer maximalen Schädigung nach einer Stunde war.



**Abbildung 8:** Mitochondriale Aktivität 1 h, 6 h und 24 h nach Kühlung und  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Schädigung. 1,0 = geschädigte normotherme Zellen 1 h nach Schädigung. dyn = gekühlte und wiedererwärmte Zellen. \*\*\*  $p < 0,001$ .



#### 4.4.2 Einfluss von Hypothermie und Kardioplegielösung auf den ATP-Gehalt nach oxidativem Stress



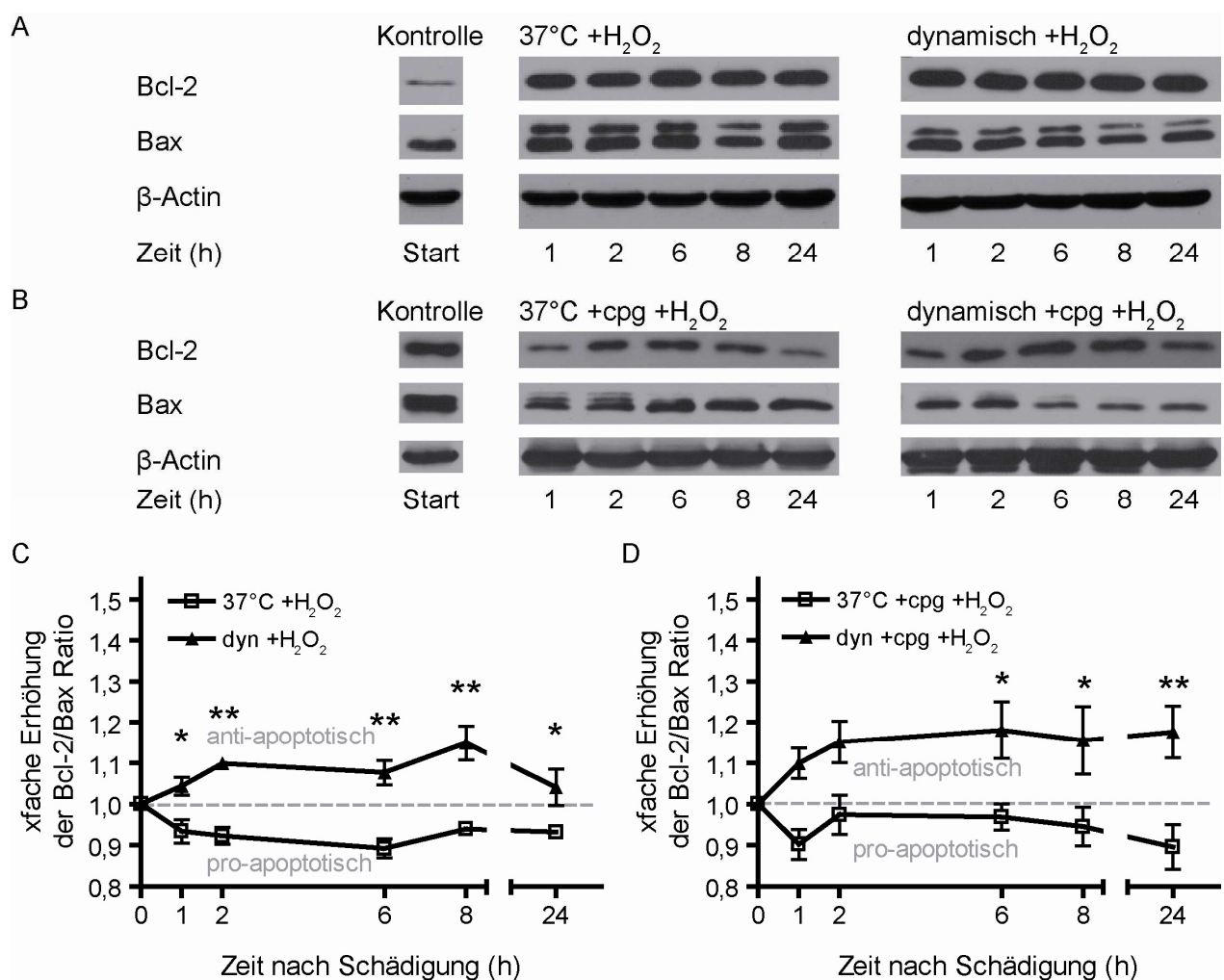
**Abbildung 9:** Einfluss von Hypothermie (A) und Kardioplegielösung (+cpG) (B) auf den ATP-Gehalt (nmol ATP /  $4 \times 10^3$  Zellen) 1 h, 6 h und 24 h nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung (+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). 37°C = normotherme Zellen, dyn = gekühlte und wiedererwärmte Zellen. \* p < 0,05; \*\*\* p < 0,001.

Eine Stunde nach Schädigung der Zellen mit 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sank der ATP-Gehalt sowohl in den Zellen der normothermen Gruppe als auch bei den gekühlten Zellen stark ab. Analog zu der gesteigerten Aktivität der mitochondrialen Reduktase (Abbildung 8) war sechs bis 24 Stunden nach Schädigung in den gekühlten und wiedererwärmten Zellen signifikant mehr ATP vorhanden im Vergleich zu den Zellen, die bei 37°C belassen wurden. Hypothermie allein führte nach 24 Stunden zu einem signifikant höheren ATP-Gehalt in den Zellen (Abbildung 9 A). Die Kardioplegielösung bewirkte eine Reduktion des ATP-Gehalts, wobei die zusätzlich gekühlten Zellen bereits nach sechs Stunden signifikant mehr ATP produzieren konnten. Dieser Effekt hielt ebenfalls bis 24 Stunden nach Inkubation an. Die Kombination von 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Kardioplegielösung führte zu einer signifikanten Reduktion des ATP-Gehaltes nach einer Stunde. Nach sechs und 24 Stunden waren in den gekühlten und wiedererwärmten Zellen erneut signifikant höhere ATP-Konzentration als in den normothermen Zellen (Abbildung 9 B) zu finden.

## 4.5 Einfluss der Hypothermie auf das Apoptose-Verhalten von H9c2-Zellen

### 4.5.1 Veränderung der Expression von Bcl-2 und Bax durch Hypothermie

Hypothermie führte in dem von uns verwendeten Zellkulturmodell zu einer erhöhten Zellvitalität und einer besser erhaltenen mitochondrialen Funktion nach  $H_2O_2$ -Schädigung. In einem nächsten Schritt wurden mitochondriale Signalmoleküle genauer untersucht. In der Signaltransduktion der Apoptose nehmen die Proteine der Bcl-2 Familie eine zentrale Rolle ein. Die Wirkung von Bcl-2 als Apoptose-Inhibitor ist vom Verhältnis zwischen den Bcl-2/Bcl-2-Homodimeren und den Bcl-2/Bax-Heterodimeren abhängig [104].

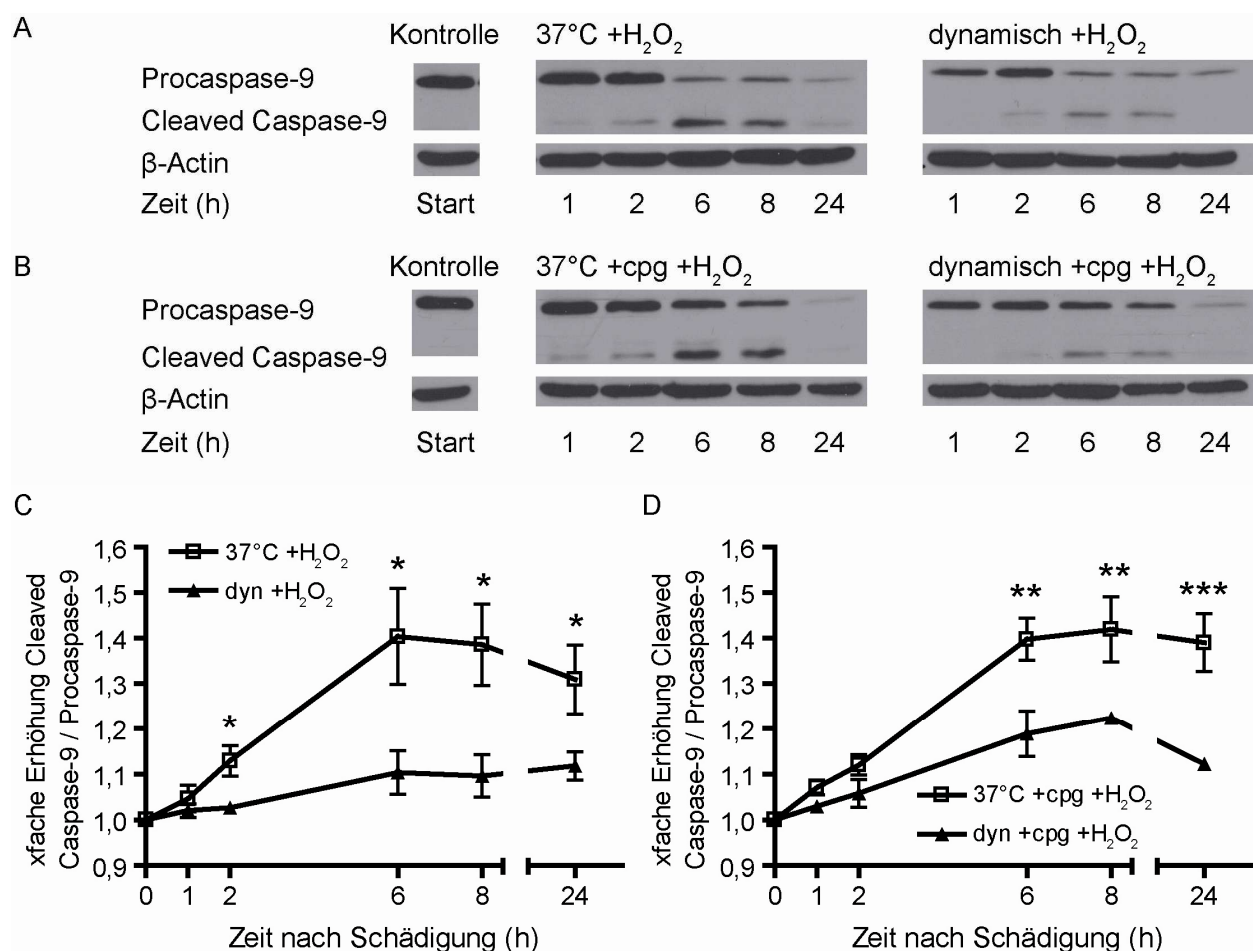


**Abbildung 10:** Western Blot (A, B) und densitometrische Analysen (C, D) anti- (Bcl-2) und pro- (Bax) apoptotischer Signalmoleküle nach  $H_2O_2$ -Schädigung (A, C) und Kardioplegielösung (B, D). dyn + $H_2O_2$  = gekühlte und wiedererwärmte Zellen, 37°C + $H_2O_2$  = normotherme Zellgruppe, +cpg = plus Kardioplegielösung, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

Die Expression des anti-apoptotischen Moleküls Bcl-2 war bis 24 Stunden nach  $H_2O_2$ -Schädigung und Hypothermie erhöht, während Bax erniedrigt war. In der hypothermen

Gruppe war das Verhältnis von Bcl-2/Bax deutlich größer eins und somit im anti-apoptotischen Bereich, während bei normothermen, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-geschädigten Zellen das Verhältnis kleiner eins war und somit charakteristisch für den pro-apoptotischen Bereich (Abbildung 10 C). Kardioplegielösung und Hypothermie führten zu einer leicht gesteigerten Bcl-2 Expression im Vergleich zur alleinigen Hypothermie, wohingegen die Expression von Bax reduziert war. Bei normothermen Zellen konnte nach der Stimulation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Kardioplegielösung ein signifikant pro-apoptotisches Verhältnis (< 1) nachgewiesen werden (Abbildung 10 D).

#### 4.5.2 Einfluss der Hypothermie auf die Aktivierung der Caspase-9



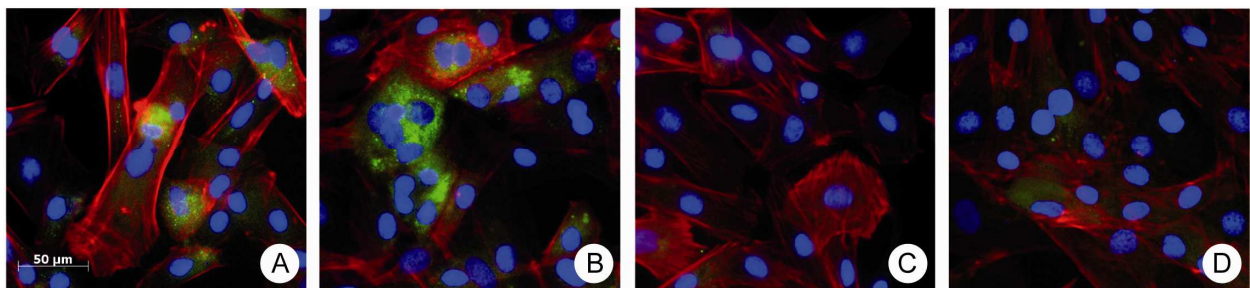
**Abbildung 11:** Western Blot (A, B) und densitometrische Analysen (C, D) der Caspase-9 nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung (A, C) und Kardioplegielösung (B, D). dyn = gekühlte und wiedererwärmte Zellen, 37°C = normotherme Zellgruppe, cpg = Kardioplegielösung, \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.

Um den weiteren intrazellulären Signalweg der Apoptose zu untersuchen, wurde die Aktivität der Caspase-9 bestimmt.

Normotherme mit  $H_2O_2$  geschädigte Zellen zeigten bereits nach zwei Stunden eine signifikant stärkere Spaltung der Caspase-9 im Vergleich zur Hypothermiegruppe (Abbildung 11 A, C). Nach der zusätzlichen Gabe von Kardioplegielösung konnte in den normothermen Zellen nach sechs bis 24 Stunden eine etwas stärkere Aktivierung der Caspase-9 (Abbildung 11 B, D) festgestellt werden.

#### 4.5.3 Einfluss der Hypothermie auf die Aktivierung der Caspase-3

Um die Endstrecke der Apoptose-Signalkaskade und den Einfluss der Caspase-3 zu untersuchen, wurden die H9c2-Zellen direkt (20 min nach der  $H_2O_2$ -Stimulation) und sechs Stunden nach  $H_2O_2$ -Schädigung mit dem M30 CytoDEATH-Kit gefärbt. Dieser Antikörper weist Neopeptide des Cytokeratins 18 nach Spaltung durch Caspase-3 nach. Zur Darstellung des Zytoskeletts wurden die Zellen mit F-Actin gefärbt, die Kerne wurden mit DAPI sichtbar gemacht.



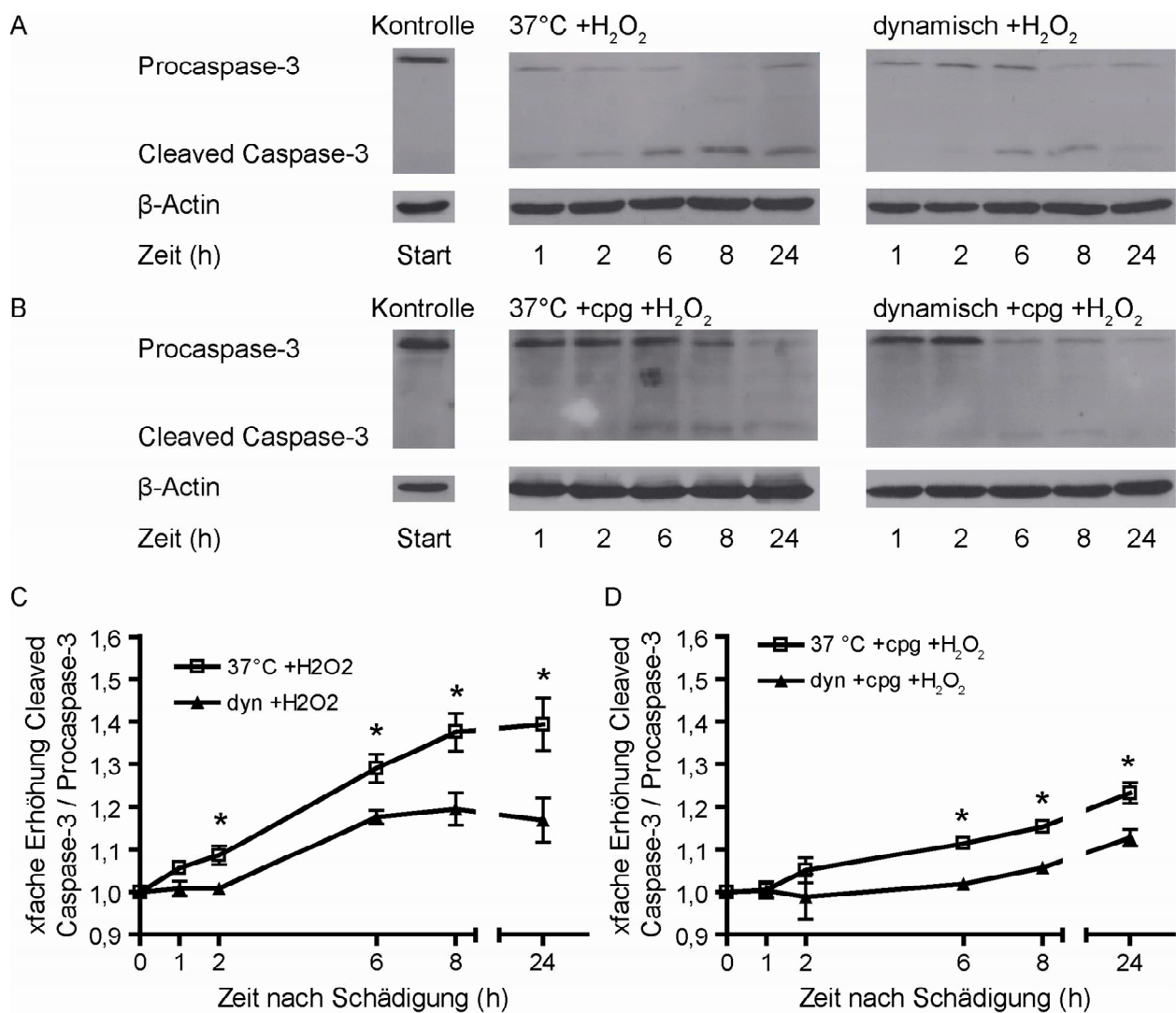
**Abbildung 12:** M30 CytoDEATH-Färbung von H9c2-Zellen 20 min und 6 h nach 2 mM  $H_2O_2$ -Schädigung. Zellen, die bei 37°C belassen wurden, direkt nach Schädigung (A); Zellen, die bei 37°C belassen wurden, 6 h nach Schädigung mit  $H_2O_2$  (B). Gekühlte Zellen direkt nach Schädigung (C); gekühlte Zellen 6 h nach Schädigung (D). dyn = gekühlte und wiedererwärmte Zellen, 37°C = normotherme Zellgruppe. Grün = M30 CytoDEATH, Cytokeratin 18; rot = F-Actin, Zytoskelett; blau = DAPI, Zellkerne.

Direkt nach der Schädigung waren bei den gekühlten Zellen wesentlich weniger M30-positive Zellen nachzuweisen als in der normothermen geschädigten Gruppe. Nach sechs Stunden waren in beiden Gruppen M30-positive Zellen zu finden, in der Hypothermiegruppe waren jedoch signifikant weniger angefärbte Zellen sichtbar (Abbildung 12).

Zur Quantifizierung der Aktivierung der Caspase-3 wurde die Western Blot Technik verwendet. Die H9c2-Zellen, die während der Stimulation mit 2 mM  $H_2O_2$  gekühlt wurden, zeigten nach acht und 24 Stunden signifikant weniger Spaltprodukte als die Zellen der normothermen Gruppe (Abbildung 13 A, C), wobei die Werte der

hypothermen Zellen über den gesamten Beobachtungszeitraum niedriger waren als die der bei 37°C belassenen Zellen.

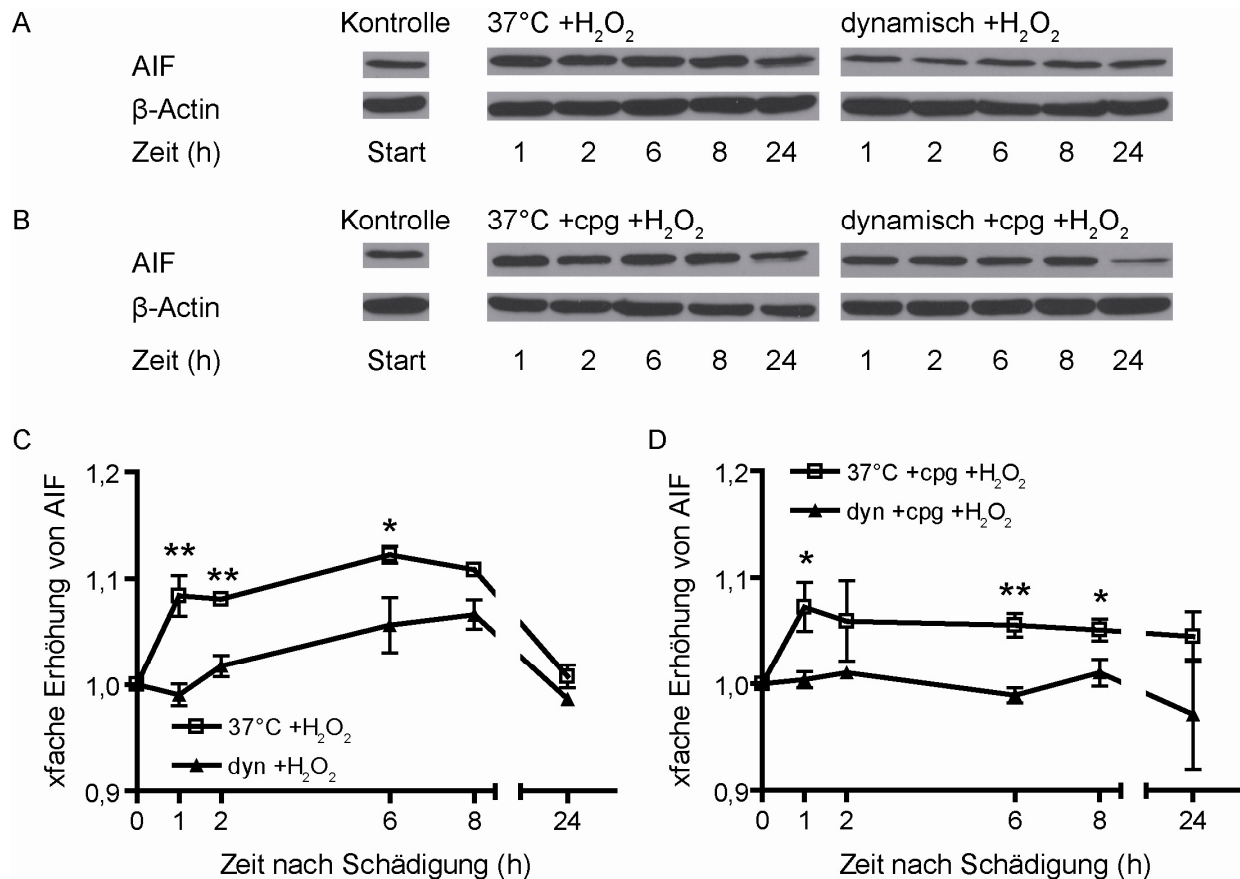
Die Gabe von Kardioplegielösung (Abbildung 13 B, D) während der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung führte nach sechs Stunden in der Hypothermiegruppe zu einer signifikant geringeren Caspase-3-Spaltung im Vergleich zur Normothermiegruppe. Sowohl in der normothermen als auch in der hypothermen Gruppe war nach Gabe von Kardioplegielösung eine geringere Enzymspaltung nachzuweisen, als nach der alleinigen Stimulation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Abbildung 13:** Western Blot (A, B) und densitometrische Analysen (C, D) der Caspase-3 nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung (A, C) und Kardioplegielösung (B, D). dyn = gekühlte und wiedererwärmte Zellen, 37°C = normotherme Zellgruppe, cpg = Kardioplegielösung. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.

#### 4.5.4 Einfluss von Hypothermie und Kardioplegielösung auf die AIF-Freisetzung

Um festzustellen, ob auch der Caspase-unabhängige Apoptoseweg aktiviert wird und ob Hypothermie und Kardioplegielösung einen Einfluss darauf haben, wurde die Expression des Apoptose-induzierender Faktor (AIF) untersucht.



**Abbildung 14:** Western Blot (A, B) und densitometrische Analysen (C, D) der AIF-Expression nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung (A, C) und Kardioplegielösung (B, D). dyn = gekühlte und wiedererwärmte Zellen, 37°C = normotherme Zellgruppe, cpg = Kardioplegielösung. \* p<0,05, \*\* p<0,01.

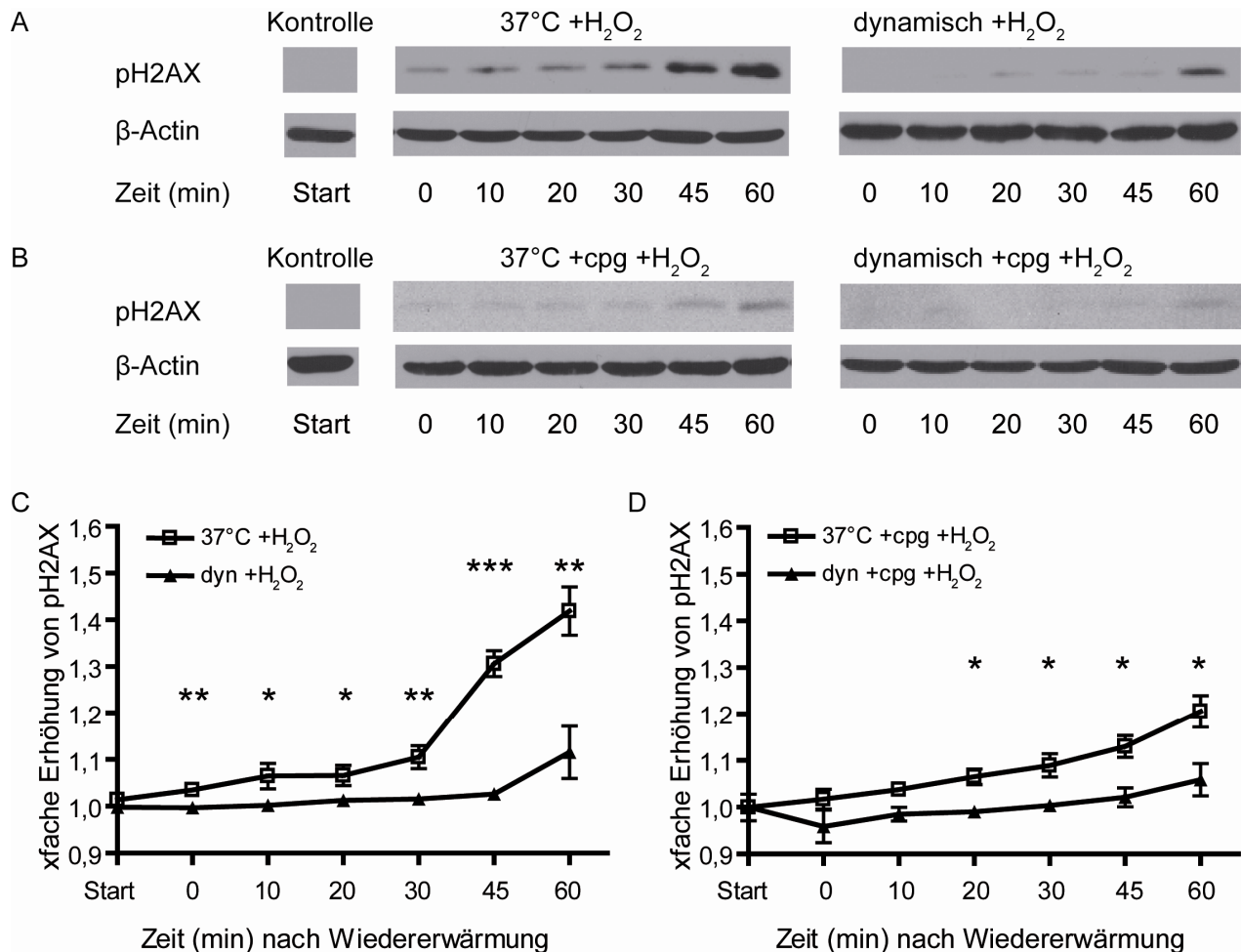
Hypothermie reduzierte signifikant die Freisetzung von AIF in den ersten sechs Stunden nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung (Abbildung 14 A, C) im Vergleich zu Normothermie, wobei sich nach acht Stunden die Expression in beiden Gruppen annäherte und nach 24 Stunden das Ausgangsniveau erreichte. Die Administration von Kardioplegielösung unter Hypothermie führte eine, sechs und acht Stunden nach Schädigung zu einer signifikant niedrigeren Expression von AIF (Abbildung 14 B, D). Auch normotherme Zellen zeigten nach Inkubation mit Kardioplegielösung während H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung eine signifikant niedrigere Expression von AIF im Vergleich zu den ausschließlich mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> geschädigten Zellen.



## 4.6 Einfluss von Hypothermie auf DNA-Schäden nach oxidativem Stress

### 4.6.1 Veränderung der H2AX-Phosphorylierung nach oxidativem Stress

Da die Phosphorylierung des Histons H2AX ein Zeichen für eine frühe und anhaltende DNA-Schädigung ist, wurde diese als Marker für die Effekte der Hypothermie und Kardioplegielösung auf ROS-induzierte DNA-Doppelstrangbrüche untersucht.

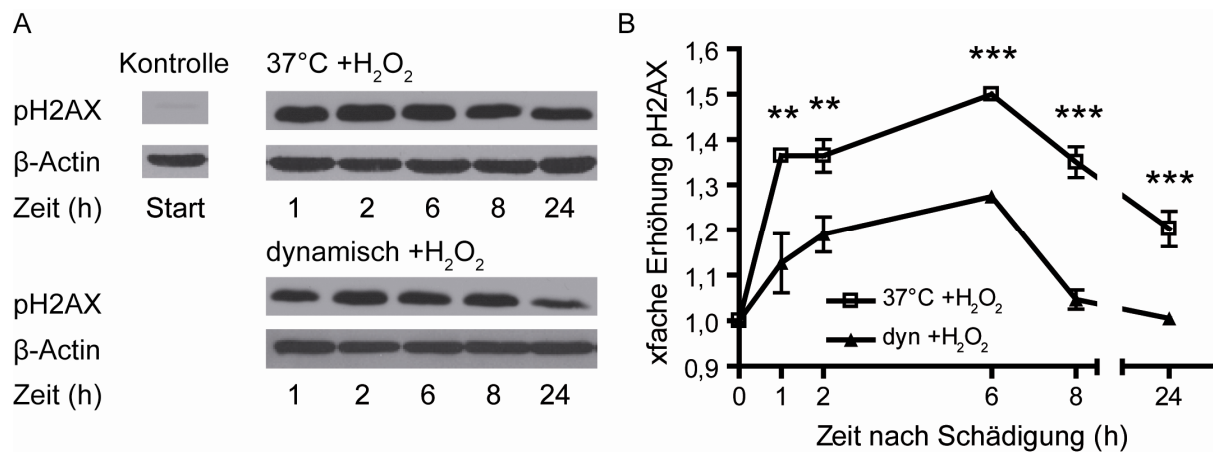


**Abbildung 15:** Western Blot (A, B) und densitometrische Analysen (C, D) der H2AX-Phosphorylierung direkt nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung (A, C) und Kardioplegielösung (B, D). dyn = gekühlte und wiedererwärmte Zellen, 37°C = normotherme Zellgruppe, cpg = Kardioplegielösung. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.

Es konnte gezeigt werden, dass normotherme Zellen, die oxidativem Stress ausgesetzt wurden, direkt nach Ende der Schädigung eine beginnende H2AX-Phosphorylierung zeigten. Der Unterschied war signifikant zur hypothermen Vergleichsgruppe (Abbildung 15 A, C). Bei gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit Kardioplegielösung zeigte vor allem die normotherme Gruppe eine deutliche Reduktion der frühen H2AX-Phosphorylierung. Die gekühlten und wiedererwärmten Zellen, die oxidativem Stress

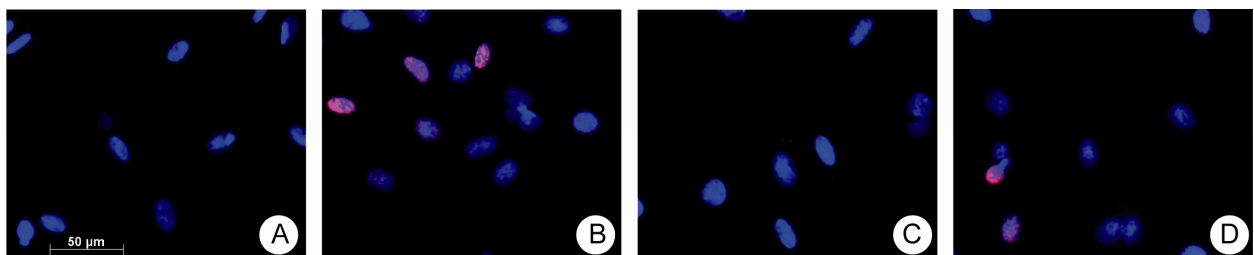
und Kardioplegielösung ausgesetzt waren, zeigten eine unverändert geringe Phosphorylierung des Histons H2AX (Abbildung 15 B, D).

Da die Gabe der Kardioplegielösung die frühe H2AX-Phosphorylierung sowohl unter Normothermie als auch unter Hypothermie verhinderte, wurde sich auf den Zusammenhang zwischen der anhaltenden H2AX-Phosphorylierung und der Hypothermie auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vermittelten (2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Doppelstrangbrüche konzentriert.



**Abbildung 16:** Western Blot (A) und densitometrische Analysen (B) der Phosphorylierung von H2AX. dyn = gekühlte und wiedererwärmte Zellen, 37°C = normotherme Zellgruppe. \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.

Normotherme Zellen zeigten bis 24 Stunden nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung eine signifikant stärkere H2AX-Phosphorylierung als gekühlte, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-geschädigte Zellen (Abbildung 16 A, B). Der maximale Anstieg der Phosphorylierung war unter beiden Bedingungen sechs Stunden nach Schädigung zu finden, weswegen dieser Zeitpunkt für den immunhistochemischen Nachweis der H2AX-Phosphorylierung gewählt wurde (Abbildung 17).

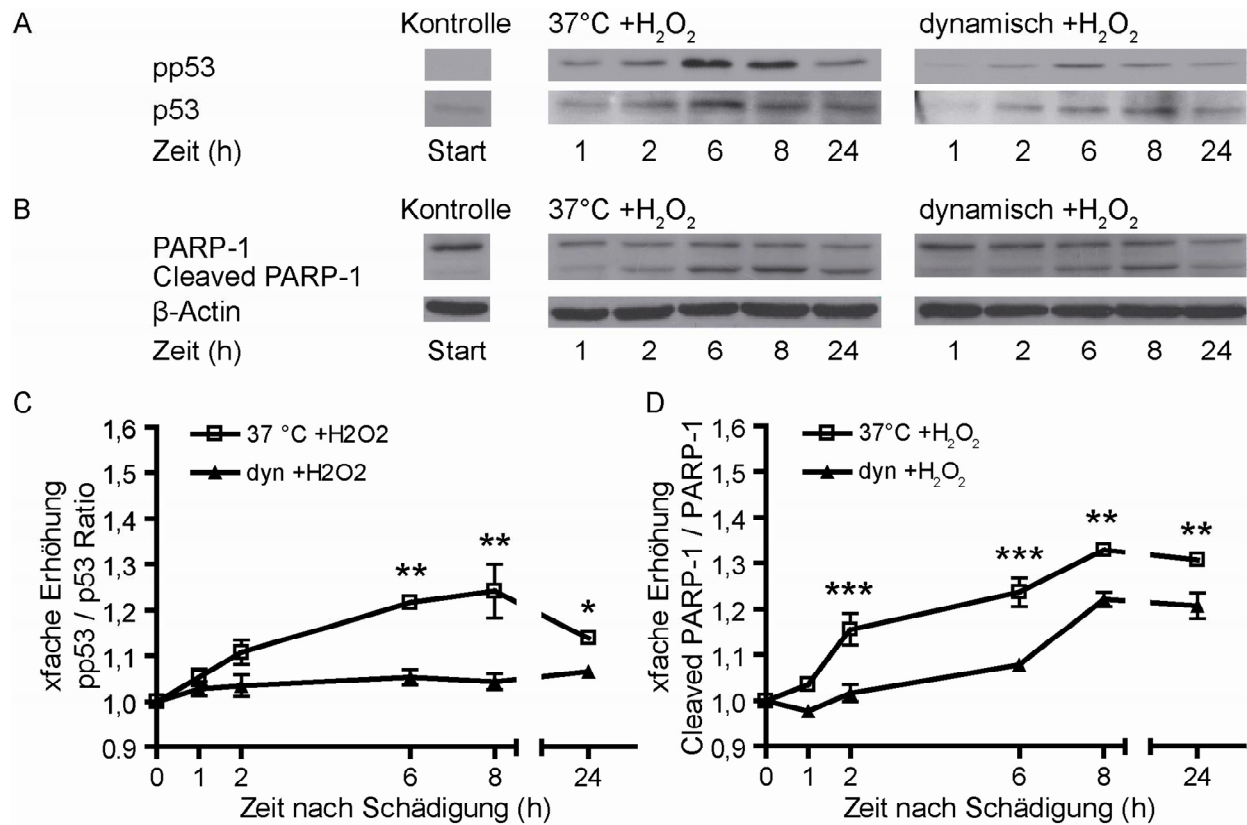


**Abbildung 17:** Immunhistochemische Färbung von γH2AX 6 h nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung Normotherme unstimulierte Zellen ohne H2AX-Phosphorylierung (A). Normotherme H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-geschädigte Zellen mit signifikant höherer H2AX-Phosphorylierung (B). Gekühlte und wiedererwärmte unstimulierte Zellen ohne H2AX-Phosphorylierung (C). Gekühlte und wiedererwärmte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-geschädigte Zellen mit geringerer H2AX-Phosphorylierung (D). Rot = γH2AX, DNA-Schäden; blau = DAPI, Zellkern.



### 4.6.2 Einfluss der Hypothermie auf die Phosphorylierung von p53 und PARP-1

Zur Bestimmung des Einflusses der Hypothermie auf H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vermittelte DNA-Schäden wurden die Phosphorylierung des Tumorsuppressors p53 und die Spaltung des Reparaturenzyms PARP-1 untersucht.



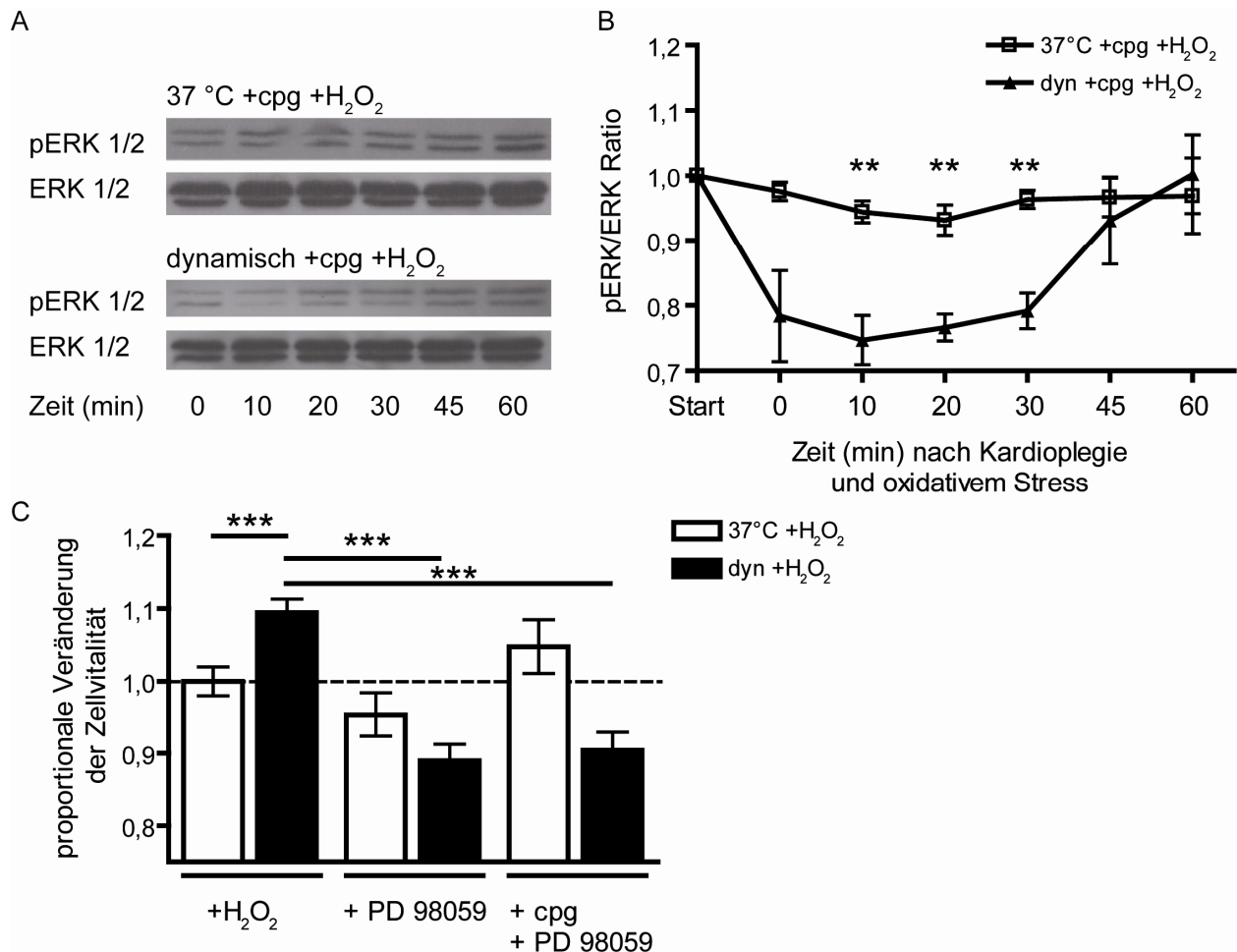
**Abbildung 18:** Western Blot (A, B) und densitometrische Analysen (C, D) der Phosphorylierung von p53 (A, C) und der Spaltung von PARP-1 (B, D) nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung. dyn = gekühlte und wiedererwärmte Zellen, 37°C = normotherme Zellgruppe. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.

Zellen, die bei Normothermie mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert wurden, zeigten eine erhöhte Phosphorylierung von p53 nach sechs und acht Stunden, mit einem Maximum nach acht Stunden. Die Phosphorylierung von p53 war nach oxidativem Stress unter Hypothermie auf einem niedrigeren nahezu konstanten Phosphorylierungsniveau (Abbildung 18 A, C).

Bereits zwei Stunden nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung war in der Gruppe der normothermen Zellen eine signifikant höhere PARP-1 Aktivierung zu finden als bei den gekühlten Zellen. In beiden Gruppen war eine vergleichbare PARP-1 Aktivitätssteigerung über den gesamten Beobachtungszeitraum zu verzeichnen, während unter Hypothermie die PARP-1 Spaltung signifikant reduziert war (Abbildung 18 B, D).

## 4.7 Regulationsmechanismen der H9c2-Zellen nach oxidativem Stress

### 4.7.1 Einfluss der Hypothermie auf die ERK-Aktivierung nach oxidativem Stress und Gabe von Kardioplegielösung



**Abbildung 19:** Western Blot (A), densitometrische Analysen (B) der ERK 1/2 Expression direkt nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung und Zugabe der Kardioplegielösung und Effekte des spezifischen ERK-Inhibitors PD 98059 auf die Zellvitalität (C). dyn = gekühlte und wiedererwärmte Zellen, 37°C = normotherme Zellgruppe, cpg = Kardioplegielösung. \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001. Zu C: dargestellt ist die Veränderung der Zellvitalität im Verhältnis zu den normothermen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-geschädigte Zellen nach 24 h (= 1,0).

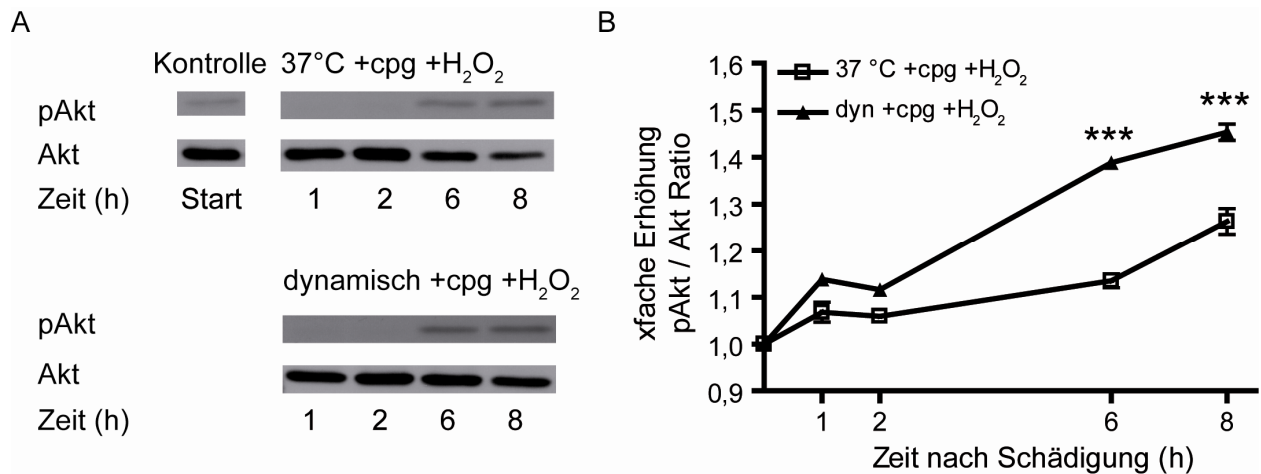
In unserem Zellkulturmodell konnten wir eine Reduktion der ERK-Aktivität in der Phase der Wiedererwärmung nachweisen (Abbildung 19 A, B). Im Vergleich zur normothermen Gruppe zeigten die gekühlten und wiedererwärmten Zellen vor allem in der frühen Phase der Wiedererwärmung eine signifikant geringere ERK-Aktivität. Nach 45 min näherte sich das Aktivitätsniveau beider Temperaturgruppen an.

Die spezifische Blockade der ERK-Enzyme mit 10 µM PD 98059 führte interessanterweise sowohl nach alleiniger Stimulation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als auch in der

Kombination mit Kardioplegielösung gerade in den gekühlten und wiedererwärmten Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Zellvitalität (Abbildung 19 C).

#### 4.7.2 Einfluss von Hypothermie und Kardioplegielösung auf die Akt-Phosphorylierung

Da Akt, oder Phosphokinase-B eine entscheidende Rolle in der Kontrolle des Zellüberlebens und der Apoptose spielt, wurde die Aktivierung von Akt untersucht.

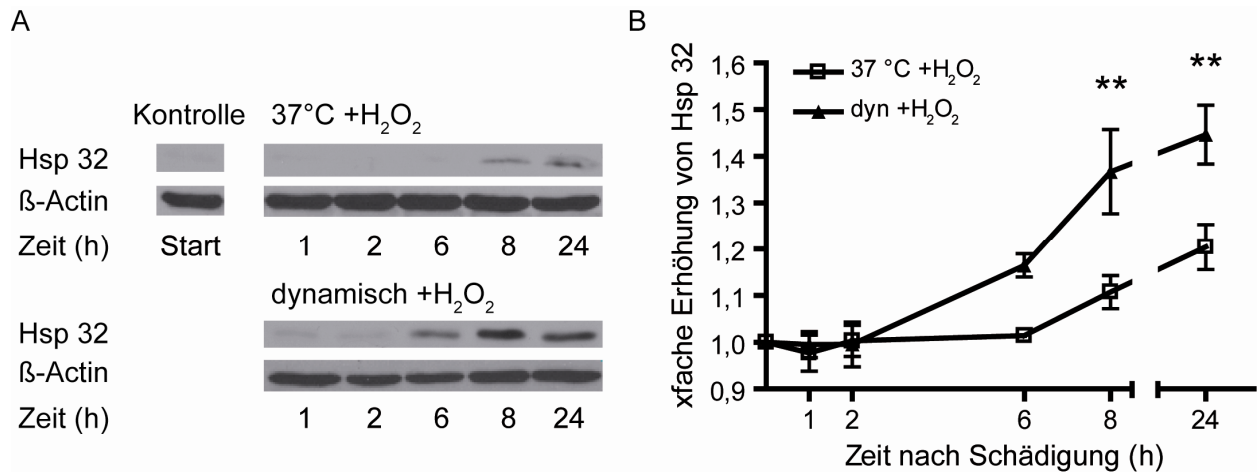


**Abbildung 20:** Western Blot (A) und densitometrische Analysen (B) der Phosphorylierung von Akt nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung und Administration der Kardioplegielösung. dyn/dynamisch = gekühlte und wiedererwärmte Zellen, 37°C = normotherme Zellgruppe, cpg = Kardioplegielösung. \*\*\* p<0,001.

Hypothermie in Kombination mit Kardioplegielösung führte sechs und acht Stunden nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung im Vergleich zu den Zellen der normothermen Gruppe zu einer signifikant höheren Phosphorylierung und somit zur Aktivierung von Akt (Abbildung 20 A, B).

### 4.7.3 Einfluss der Hypothermie auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Aktivierung der Hämoxxygenase-1

Die Hämoxxygenase-1 (HO-1, Hsp 32) wird bei oxidativem Stress aktiviert und gilt als zellprotektiv [105]. Deshalb wurde untersucht, ob Hypothermie einen Einfluss auf die Expression hatte.



**Abbildung 21:** Western Blot (A) und densitometrische Analysen (B) der Hsp 32-Expression nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung. dyn / dynamisch = gekühlte und wiedererwärmte Zellen, 37°C = normotherme Zellgruppe. \*\* p<0,01.

Sechs Stunden nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung führte Hypothermie zu einer höheren Expression von Hsp 32 im Vergleich zur normothermen Gruppe. Acht und 24 Stunden nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung zeigten die gekühlten und wiedererwärmten Zellen eine signifikant höhere Expression von Hsp 32 als unter Normothermie (Abbildung 21 A, B).

## 5 Diskussion

Milde und tiefe Hypothermie werden zum Schutz der Organsysteme in vielen verschiedenen klinischen Indikationsbereichen genutzt [3-11, 106]. In der Kinderherzchirurgie ist es das älteste Verfahren zur Organprotektion während Herzoperationen im Neonatal- und Säuglingsalter. Der Zellmetabolismus wird verlangsamt und die verfügbare Operationszeit am stillstehenden Herzen wird verlängert [30-32]. Hypothermie bzw. Kardioplegie sind die am häufigsten angewandten Methoden, um die Toleranz des Herzens gegenüber Ischämie zu erhöhen. Eine Vielzahl von Methoden werden derzeit eingesetzt und gleichzeitig optimiert bezüglich Zufuhr, Druck, Zeit und Temperatur der Kardioplegielösung [35]. Die Temperatur der Kardioplegielösung hat einen signifikanten Effekt auf die metabolische Aktivität des Herzens und ist somit nicht zu vernachlässigen. Bislang gibt es jedoch sehr kontroverse Diskussionen über die optimale Temperatur der Kardioplegielösung [34, 107]. Trotz intensiver Forschung und vieler Studienergebnisse, die additive Effekte von Kardioplegie und Hypothermie nachweisen konnten, sind die zugrunde liegenden zellulären Mechanismen immer noch weitestgehend unklar und Bestandteil aktueller Forschung [108]. Zum Verständnis der beteiligten intrazellulären Signalwege und deren Auswirkungen wurde in unserer Arbeitsgruppe (im Forschungslabor der Abteilung für Pädiatrie mit Schwerpunkt Kardiologie) ein spezielles Zellkulturmodell entwickelt [25, 109-111]. Dies diente dazu, die an Hypothermie und kardioplegischer Ischämie beteiligten Stoffwechselwege zu untersuchen und zu charakterisieren. Angelehnt an Bedingungen in der Kinderherzchirurgie wurden in der vorliegenden Arbeit H9c2-Kardiomyozyten dynamischen Temperaturveränderungen ausgesetzt. Anschließend wurden morphologische, immunhistochemische und funktionelle Veränderungen nach oxidativem Stress während und nach Kühlung und/oder Kardioplegieadministration untersucht.

### 5.1 Etablierung und Anwendung des Zellkulturmodells mit oxidativem Stress

Der durch  $H_2O_2$ -induzierte oxidative Stress ist ein gut dokumentiertes Modell um die zellulären Auswirkungen von oxidativem Stress *in vitro* zu untersuchen [112]. In der vorliegenden Arbeit wurde  $H_2O_2$  modellhaft als Induktor für oxidativen Stress, der während Phasen der Ischämie und Reperfusion auf die Zelle einwirkt, genutzt. Die von uns initiierte Hypothermie lag bei 20°C und wurde für 20 Minuten bei gleichzeitiger

Simulation des oxidativen Stresses aufrecht erhalten. Ziel war es, im Zellkulturmodell die intraoperative Absenkung der Körpertemperatur während des kardiopulmonalen Bypasses vor der Phase der Reperfusion zu simulieren.

Unter den von uns gewählten experimentellen Bedingungen (20 Minuten Hypothermie bei 20°C) wurde eine extrem kurze Exposition der Zellen mit oxidativem Stress gewählt. Um einen aussagekräftigen Effekt zu erzielen, wurde deshalb eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 mM verwendet. Bei dieser Konzentration konnte nach 24 Stunden unter normothermen Kontrollbedingungen eine Reduktion der Zellvitalität auf 50 % bei gleichzeitigem Anstieg der LDH-Freisetzung nachgewiesen werden. Diese Änderungen weisen darauf hin, dass der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte oxidative Stress reproduzierbar eine spezifische Zellschädigung bewirkte. Sowohl Zhao et al. als auch Pechtelidou et al. konnten ebenfalls einen zeit- und dosisabhängigen Anstieg des Zelltodes 24 Stunden nach der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung nachweisen [113, 114].

## 5.2 Einfluss der Hypothermie auf die Zellvitalität

In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass eine kurze Hypothermie-Phase bei 20°C - in Analogie zu der in der klinischen Routine zur Anwendung kommenden Temperatur während komplexer pädiatrischer herzchirurgischer Eingriffe - *in vitro* zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl von apoptotischen Kardiomyozyten führt. Der Zelltod war in den gekühlten und wiedererwärmten H9c2-Zellen (12 %) nach 24 Stunden im Vergleich zur 37°C Vergleichsgruppe (45,8 %) signifikant reduziert. Huang et al. konnten ebenfalls eine durch Hypothermie herbeigeführte Reduktion der Apoptose nach oxidativem Stress aufzeigen. Im Unterschied zu unserer Studie wurde hier eine moderate Hypothermie (31°C) eingesetzt, die für 24 Stunden aufrechterhalten wurde. Währenddessen waren die H9c2-Zellen kontinuierlich einer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration von 100 µM ausgesetzt [115].

In Übereinstimmung mit publizierten Daten [115] konnten wir zeigen, dass Hypothermie im Vergleich zu normothermen Bedingungen die Vitalität von Kardiomyozyten nach Exposition mit oxidativem Stress erhöht. Somit ist induzierte Hypothermie sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine der wirkungsvollsten Strategien zur Zytoprotektion während Ischämie bzw. Reperusionsperioden.

### 5.3 Einfluss der Hypothermie auf den Apoptoseprozess von H9c2-Zellen

Wir konnten zeigen, dass die unter hypothermen Bedingungen verringerte Zytotoxizität 24 Stunden nach der Exposition mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erwartungsgemäß mit einer reduzierten LDH-Ausschüttung und einer geringeren Caspase-3- und PARP-1-Spaltung einhergeht. Dies spricht für eine Reduktion der Aktivierung apoptotischer Stoffwechselwege. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Hypothermie einen direkten Effekt auf die Initiierung der Apoptose hat und dadurch Kardiomyozyten vor oxidativem Stress schützt.

Unsere Ergebnisse und Schlußfolgerungen sind in guter Übereinstimmung zu publizierten Daten von Shao et al., die zeigen konnten, dass das Kühlen von Kardiomyozyten auf 25°C in der Ischämiephase die Apoptoserate verringert, indem die Aktivität der proapoptotischen Caspase-3 vermindert wurde und die Fragmentierung der DNA geringer ausfiel [116]. Auch Shuja et al. konnten im Ratten-Tiermodell des hämorrhagischen Schocks eine Hypothermie-assoziierte Reduktion der Caspase-3 nachweisen [117], was darauf hinweist, dass sowohl *in vitro* als auch *in vivo* prinzipiell vergleichbare zelluläre Mechanismen an der zytoprotektiven Wirkung der Hypothermie beteiligt sind.

Im klinischen Kontext während kardiochirurgischer Eingriffe können apoptotische Prozesse auf unterschiedliche Weise und durch eine Anzahl verschiedener Faktoren aktiviert werden. Neben mechanischen Faktoren wie einem zu hohen Perfusionsdruck und mechanischem Stress kommen zellulären Mechanismen wie reaktiven Sauerstoffspezies, zu hohen Calciumkonzentrationen, der Entstehung von Nitritoxid, und der Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie TNF- $\alpha$  und Angiotensin II eine bedeutende Rolle zu [118]. Apoptotische Prozesse tragen maßgeblich zur Pathogenese verschiedener Arten der kardialen Dysfunktion nach Ischämie und Reperfusion bei [119].

Im Fokus des klinischen Interesses steht daher die Hemmung der Apoptose von Kardiomyozyten. Es ist wichtig, zelluläre Mechanismen bzw. Signalwege zu identifizieren, die das Zellüberleben und/oder Apoptose vermitteln, um zukünftig gezielte Inhibitoren und damit zellprotektive Prinzipien entwickeln zu können.

### 5.3.1 Regulationsmechanismen der H9c2-Zellen nach oxidativem Stress

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> trägt erwiesenermaßen massiv zum oxidativen Stress bei, wobei der Schaden, der durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ausgelöst wird, sehr heterogen ist [37, 120]. Es konnte gezeigt werden, dass oxidativer Stress direkt zu kardialen Pathologien zum Beispiel Herzversagen führt [121]. Oxidativer Stress entsteht, wenn das Gleichgewicht zwischen Produktion und Abbau von ROS wie z.B. Superoxidanionen, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikalen gestört ist [121].

In unserer Studie war die sekundäre Produktion von intrazellulären ROS direkt nach der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung sowohl in gekühlten und wiedererwärmten Zellen als auch in den Zellen der normothermen Gruppe erhöht. Trotzdem konnten wir in den gekühlten Zellen eine Reduktion der Apoptosevorgänge nachweisen, die bis 24 Stunden nach der Schädigung anhielt. Interessanterweise konnte ROS in den gekühlten Zellen bereits nach der Wiedererwärmung besser abgebaut werden als in den normothermen Zellen. Dies könnte ein zellprotektiver Mechanismus sein, da nichtletale Konzentrationen von ROS mitochondriale Biogenese-verwandte Gene regulieren, die für Zellüberleben, Schadensreparatur und die Synthese neuer Proteine kodieren [122]. Es konnte gezeigt werden, dass Hypothermie die Expression von Stressproteinen (NF-κB, iNOS) nach oxidativem Stress verringert und die Entzündungsreaktion nach Ischämie und Reperfusion minimiert [123].

Wir konnten nachweisen, dass die Induktion von oxidativem Stress mittels 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unter hypothermen Bedingungen zu einer höheren zellulären Reduktaseaktivität sechs Stunden nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Exposition führte. Diese Ergebnisse weisen auf eine verbesserte mitochondriale Funktion in gekühlten und wiedererwärmten Zellen im Vergleich zu normothermen Kardiomyozyten nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung hin. Somit wird die oben erwähnte Arbeitshypothese gestützt, dass die zytoprotektive Wirkung der Hypothermie zu einem wesentlichen Teil über die Stärkung der mitochondrialen Funktion, der zellulären Energiebereitstellung und -bilanzierung vermittelt wird.

Zusätzlich konnten wir zeigen, dass Hypothermie zu einer Reaktivierung der ATP-Produktion in der Zelle führte. Bereits in der frühen Phase nach oxidativem Stress konnten gekühlte und wiedererwärmte H9c2-Zellen eine signifikant höhere Wiederherstellung der ATP-Produktion zeigen. Wir fanden signifikant höhere ATP-Konzentrationen in den gekühlten und wiedererwärmten Zellen sechs Stunden und 24 Stunden nach der oxidativen Schädigung. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der



Schutz der Mitochondrienfunktion einhergeht mit einer erhöhten Produktion energiereicher Phosphate. Dies könnte einer der wesentlichen und bedeutenden Mechanismen sein, die der zytoprotektiven Wirkung der Hypothermie auf Kardiomyozyten zugrunde liegen.

Ähnliches konnte durch Ning et al. belegt werden: nach Reperfusion waren die ATP-Konzentrationen in Kaninchenherzen, die milder Hypothermie ausgesetzt waren, höher als in den Herzen unter Kontrollbedingungen. Auf der Transkriptionsebene geht dieses einher mit einer erhöhten Expression von nuklearen und mitochondrialen Genen, die für die Integrität der mitochondrialen Membran essentielle Proteine kodieren [124]. Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit Untersuchungen von Zachariassen et al. in denen ein durch Hypothermie induzierter, fast vollständiger Stillstand der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase mit nachfolgender ATP-Konservierung gefunden wurde [125]. Zusätzlich führte die hypotherme Vorbehandlung von isolierten Rattenherzen zu einer Erhöhung der ATP- und  $\text{NAD}^+$  Konzentrationen und während der Reperfusion zu einer stärkeren Hemmung der mitochondrialen „Permeability Transition Pore“. Diese Mechanismen führten vermutlich zur beobachteten Kardioprotektion [126].

Überdies kann eine Beschädigung des Herzgewebes und des Koronarendothels während der Entnahme und des Transports nach der Herztransplantation das Ergebnis beeinflussen. Hypothermie in Kombination mit neuartig zusammengesetzten Lösungen (Somah-Lösung) konnte eine gesteigerte Zellvitalität des Myokards mit einer Erhaltung der Mitochondrien und hohen Konzentrationen energiereicher Phosphate erzielen [127]. Bes et al. konnten an isolierten Kardiomyozyten zeigen, dass tiefe Hypothermie ( $4^\circ\text{C}$ ), wie sie nach Organentnahme zur Konservierung genutzt wird, früh zu einem Stillstand der elektromechanischen Aktivität führte. Nach der Wiedererwärmung kam es zu einer vollständigen und stabilen Wiederherstellung der Erregungsfähigkeit und Kontraktilität [128].

Energiekonsumierende Prozesse in der Zelle, wie z.B. Reparaturvorgänge sowie die Aufrechterhaltung der Atmungskette, können erhalten werden und die Integrität und Funktionalität der einzelnen Zelle wird gewahrt. Übertragen auf einen Zellverband mit gerichteter Reizleitung lassen sich positive Effekte hinsichtlich Herzrhythmusstörungen vermuten.

Auch zytoprotektive Signalwege können durch eine vermehrte ATP-Bereitstellung aktiviert werden. So führt die Aktivierung des Survival-Proteins Akt zu einer erhöhten

Zellvitalität und Überlebensrate. In dem von uns verwendeten Modell kommt es u.a. zu einer gesteigerten Phosphorylierung von Akt. Matsui et al. konnten zeigen, dass Kardiomyozyten mit konstitutiv aktiven Akt-Gen *in vitro* deutlich niedrigere Apoptoseparameter aufwiesen [129]. Darüber hinaus konnte durch Matsui et al. nachgewiesen werden, dass eine übermäßige Akt-Aktiveringung nach Ischämie und Reperfusion *in vivo* zu einer Reduktion der Infarktgröße und einer gesteigerten Kontraktilität führte [130].

Diese Befunde bilden eine sehr wichtige Stütze unserer Arbeitshypothese: Tiefe Hypothermie führte zu einer Aktivierung und damit zu einer Erhöhung der zellulären pAkt-Konzentration. Akt kann den Caspase-vermittelten Zelltod durch die Phosphorylierung und somit Inaktivierung des proapoptotischen Proteins BAD und der Caspase-9 hemmen und führt somit funktionell zu einer erhöhten Zellvitalität [77, 78].

Shuja et al. konnten in einem Modell des hämorrhagischen Schocks an der Ratte nachweisen, dass eine tiefe Hypothermie (15°C) Kardiomyozyten über die Aktivierung des Akt-Survival-Stoffwechselweges schützte und dies erwartungsgemäß auch zur Verminderung von apoptotischen Prozessen führte [117].

Brunt et al. konnten zeigen, dass nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stimulation die Aktivierung der Hämoxygenase zum Teil vom Akt-Stoffwechselweg stimuliert wird und dass beide Signalwege - einmal aktiviert - sich gegenseitig verstärken und somit synergistisch positiv auf die Zellvitalität wirken [84].

Wir konnten nachweisen, dass die von uns verwendete tiefe Hypothermie während der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung zu einem Anstieg der Hämoxygenase-1 führte. Czibik et al. konnten sowohl in einem Zellkulturmodell mit immortalisierten Mausherzzellen als auch im Mausmodell zeigen, dass eine erhöhte Hämoxygenase-1-Aktivität H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Zelltod reduzieren kann [131]. Attuwaybi et al. konnten in einem Rattenmodell der Darmischämie zeigen, dass Ischämie und Reperfusion zu einer verstärkten Hämoxygenase-1-Expression 12 Stunden und 24 Stunden nach Reperfusion führte und dass tiefe Hypothermie (15°C) die Expression zusätzlich steigerte [123]. Das Akt-Survivalprotein und die Hämoxygenase-1 wirken intrazellulär dem oxidativen Stress entgegen. In Kombination wirken sich beide Signalmoleküle positiv auf die Stabilität des mitochondrialen Membranpotentials und damit auf den Erhalt der funktionellen Integrität der Mitochondrien als essentielle Zellorganelle für eine ausgeglichene Energieversorgung [84] aus.

In Übereinstimmung mit bereits publizierten Ergebnissen konnten wir zeigen, dass die ATP-Bereitstellung ein sehr wichtiger Mechanismus für die Aktivierung von essentiellen Proteinen des Akt-Stoffwechselweges und darüber hinaus für weitere regulatorische Proteine wie zum Beispiel die Familie der MAP-Kinasen ist. Für die Integrität von komplexen Herzkreislauffunktionen nach herzchirurgischen Operationen spielen die MAP-Kinasen ebenfalls eine bedeutende Rolle. So konnte gezeigt werden, dass der CPB zu einer erhöhten Vasokonstriktion führt, vermutlich durch eine sehr schnelle Induktion und Aktivierung der ERK1/2. Dies bedingt eine gesteigerte Produktion von Entzündungsmediatoren (Interleukin-6, Cyclooxygenase-2) und somit die Stimulation von Entzündungsprozessen [132].

Aus unseren *in vitro* Daten und publizierten Ergebnissen aus *in vivo* Studien lässt sich schlussfolgern, dass spezifische Fehlfunktionen nach dem kardiopulmonalen Bypass im ERK-Stoffwechselweg ihr zelluläres Korrelat finden. So ist bekannt, dass eine frühe Erhöhung der ERK-Aktivität mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit des Auftretens koronarer Spasmen einhergehen kann [133-135].

In unserem Zellkulturmodell konnten wir nach Hypothermie eine Reduktion der ERK-Aktivität in der Phase der Wiedererwärmung nachweisen. Im Vergleich zur normothermen Gruppe zeigten die gekühlten und wiedererwärmten Zellen vor allem in der frühen Phase der Wiedererwärmung eine signifikant geringere ERK-Aktivität. Die spezifische Blockade der ERK-Enzyme mit dem Inhibitor PD 98059 führte interessanterweise gerade in den gekühlten und wiedererwärmten Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Zellvitalität. Somit könnte insbesondere die verzögerte ERK-Aktivierung einen positiven Effekt auf die Zellvitalität nach 24 Stunden haben, da je nach Dauer und Ausmaß der ERK-Aktivierung unterschiedliche Signalwege (Inflammation vs. Zellüberleben) aktiviert werden. So konnte in einem *in vitro* Modell zur postoperativen systemischen Entzündungsreaktion mit humanen umbilikal-venösen Endothelzellen gezeigt werden, dass tiefe Hypothermie (17°C) und die Stimulation der Zellen mit TNF- $\alpha$  im Vergleich zu den normothermen, stimulierten Zellen zu einer verstärkten Aktivierung der ERK-Enzyme in der Phase der Wiedererwärmung führte [109].

In Übereinstimmung mit unserer Arbeitshypothese, dass der hauptsächliche Schutzmechanismus der Hypothermie auf mitochondrialer Ebene vermittelt wird, fanden wir eine Hochregulation des anti-apoptotischen mitochondrialen Proteins Bcl-2 als Folge

der Hypothermie in Kombination mit oxidativem Stress. Bcl-2 ist wichtig für den Zellschutz und die Reduktion bzw. Verhinderung der Apoptose [136]. Sowohl eine Hemmung des Bax-Proteins, die eine Permeabilisierung der Mitochondrienmembran verhindert, als auch die Vermeidung eines übermäßigen ATP-Verbrauchs werden durch Bcl-2 vermittelt [137]. Imahashi et al. fanden heraus, dass eine Überexpression von Bcl-2 im Herzen eine Reduktion des ATP-Verbrauchs und weniger Azidose während Ischämie zur Folge hat [138]. Darüber hinaus konnte in einem Rattenmodell gezeigt werden, dass unter tiefer Hypothermie (15°C) Bcl-2 hochreguliert wurde, wodurch nachfolgende pro-apoptotische Signalwege gehemmt wurden [117]. Des Weiteren konnten Diestel et al. in einem Modell mit humanen umbilikal-venösen Endothelzellen zeigen, dass kontinuierliche moderate Hypothermie (33°C) nach TNF- $\alpha$ -Stimulation ebenfalls zu einem Anstieg der Bcl-2-Expression führte. Auch TNF- $\alpha$  ist in der Lage, intrazelluläre pro-apoptotische Signalkaskaden zu aktivieren [139].

In einem Ischämie/Reperusionsmodell mit humanen umbilikal-venösen Endothelzellen konnte ebenfalls unter milder Hypothermie (33°C) eine Erhöhung der Bcl-2-Expression mit der höchsten Expression nach sechs Stunden aufgezeigt werden. Dies ging einher mit einer Reduktion der Caspase-3- und PARP-Aktivität [136].

Aus diesen publizierten Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die Hypothermie-induzierte Hochregulation von Bcl-2 zur ATP-Konservierung und Neusynthese von energiereichen Phosphaten beiträgt und somit eine positive Wirkung auf den Ausgleich zwischen anabolen und katabolen Stoffwechselprozessen besitzt. Die Hochregulation des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 stellt also eine wichtige Regelgröße für die zyto- bzw. kardioprotektive Wirkung der Hypothermie dar.

#### **5.4 Einfluss von Hypothermie auf die DNA-Schädigung**

p53 ist ein wichtiger Apoptose-Regulator und wird durch Phosphorylierung aktiviert [140]. Es ist bekannt, dass sich zu Beginn der Apoptose eine kleine Menge von p53 zum Mitochondrium verlagert und dort mit Bax interagiert. Es kommt zur Bildung von MOMP, womit konzentrationsabhängig die Freisetzung von Cytochrom C, Endonuklease G und AIF getriggert und Caspase-3 aktiviert wird [141]. Wir fanden heraus, dass tiefe Hypothermie zu einer verringerten p53-Phosphorylierung führte, was die nukleären p53-Konzentrationen verringern oder die Transkriptionsaktivität von p53 hemmen könnte. Dies resultiert in einer geringeren Produktion und Aktivierung des proapoptotischen Proteins Bax und einer verringerten Freisetzung weiterer Apoptose-

induzierenden Faktoren. Dadurch stellt die unter Hypothermie beobachtete reduzierte Phosphorylierung von p53 einen potenten Schutzmechanismus vor Apoptose dar. Deshalb vermuten wir, dass eine gesteigerte Phosphorylierung von p53 eine wichtige Rolle in der Förderung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vermittelten Apoptose in normothermen Kardiomyozyten spielt.

Die Phosphorylierung von H2AX am Serin 139 ist ein sensitiver Marker für eine DNA-Schädigung [142]. Die  $\gamma$ H2AX-Phosphorylierung bei DNA-Schäden dient unter anderem dem Reparaturenzym PARP-1 zur Identifikation dieser Schäden. Eine geringe DNA-Schädigung kann durch die Reparaturenzyme bewältigt werden. Bei einer massiven Schädigung der DNA durch oxidativen Stress kommt es jedoch zu einer übermäßigen, unphysiologischen PARP-1-Aktivierung. Es kommt zum Energieverlust durch einen PARP-assoziierten gesteigerten ATP-Verbrauch [143]. Wir konnten zeigen, dass normotherme geschädigte Kardiomyozyten signifikant früher höhere Konzentrationen von phosphoryliertem H2AX im Zellkern aufwiesen als die Kardiomyozyten, die während der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung gekühlt wurden. Auch konnten wir in den gekühlten und wiedererwärmten Zellen eine geringere Spaltung und somit vermutlich eine geringere Aktivität der PARP-1 nachweisen. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass Hypothermie bei 20°C nicht nur die Mitochondrien schützt, sondern ebenfalls zum Schutz der DNA vor oxidativem Stress und Apoptose beiträgt.

### **5.5 Einfluss der Kardioplegielösung auf die Zellvitalität**

Seit mehr als 50 Jahren wird die Zusammensetzung und Temperatur der Kardioplegielösung kontinuierlich überarbeitet und weiterentwickelt. Trotz permanenter Forschung und zunehmendem Wissen ist die optimale Zusammensetzung der Kardioplegielösung nicht eindeutig geklärt. Ziel der Applikation von Kardioplegielösung ist es, einen sofortigen Herzstillstand ohne Verlust der energiereichen Phosphate aus der Zelle zu erreichen. Dadurch soll das Myokard intra- und nachfolgend auch postoperativ geschützt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kardioplegielösung, die im Deutschen Herzzentrum Berlin unter anderem verwendet wird, interessanterweise sowohl positive als auch negative Einflüsse auf die Zellvitalität hat. Die im Zellkulturmodell eingesetzte Verdünnung von drei Teilen Kardioplegielösung und einem Teil Mangelmedium verstärkte in beiden Temperaturgruppen die Bcl-2-Expression nach

oxidativem Stress. Ebenso konnte in Kombination mit Hypothermie eine Reduktion der Bax-Expression gesehen werden. Direkt nach Schädigung konnten Hypothermie und Kardioplegie in Kombination eine Reduktion und einen verspäteten Anstieg der ERK-Aktivierung bewirken, was auch zur gesteigerten Akt-Aktivierung beigetragen haben könnte.

Nach der Gabe von Kardioplegielösung war der ATP-Gehalt der Zellen beider Temperaturgruppen signifikant vermindert. Das ATP-Angebot war nach 24 Stunden in den gekühlten und wiedererwärmten Zellen signifikant höher als in den normothermen Zellen. Somit könnte Hypothermie die Erholung der Zelle nach der intraoperativ notwendigen Gabe von Kardioplegielösung unterstützen.

Interessanterweise zeigte sich jedoch nach der Gabe von Kardioplegielösung eine Erhöhung der Caspase-9, was aber nicht in einer erhöhten Aktivität der Caspase-3 resultierte. Auch konnte ein positiver Effekt der Kardioplegielösung in beiden Temperaturgruppen auf die frühe DNA-Schädigung nach oxidativem Stress nachgewiesen werden. In unseren Experimenten konnte allerdings auch eine stark reduzierte Zellvitalität mit morphologisch veränderten Zellen in der normothermen Gruppe nach Gabe der Kardioplegielösung gezeigt werden. Die Untersuchung des Caspase-unabhängigen Apoptoseweges über AIF erbrachte keine signifikant höhere Expression derselben. Klare Schlussfolgerungen lassen sich mit den vorliegenden Ergebnissen noch nicht ziehen. Somit sind weitere Untersuchungen zur Erklärung der beobachteten Phänomene notwendig.

Bis zum heutigen Zeitpunkt gibt es keine eindeutigen mechanistischen Erklärungen für die zytoprotektiven oder auch pro-apoptotischen Wirkungen der Kardioplegie. Am Modell mit isolierten neonatalen Rattenherzen konnte gezeigt werden, dass warme kristalloide Kardioplegielösung zur Öffnung mitochondrialer Membranporen führte. Nachfolgend kam es zur Bax-Translokation ins Zytosol und somit wurde die Apoptose eingeleitet [144]. Dem entgegen stehen Ergebnisse aus einem Kaninchenmodell mit verschiedenen Kardioplegielösungen. Es wurde gezeigt, dass kalte kristalloide Kardioplegielösung zu einer verstärkten Phosphorylierung von Bad und somit einer verringerten Caspase-3-Aktivierung führte [145]. In einer klinischen Studie an Biopsien des rechten Vorhofs von Patienten, die mithilfe des kardiopulmonalen Bypasses unter kalter Kardioplegielösung operiert wurden, konnten wiederum sowohl signifikant erhöhte Expressionen von Bcl-2 und phosphorylierten Bad festgestellt werden. Im Gegensatz

dazu stand eine hohe Aktivität der Caspase-3. Zusätzlich wurden noch erhöhte Aktivitäten von AIF mit einer Translokation in den Nukleus beobachtet. Außerdem wurde eine signifikante Genhochregulation von c-Fos und c-Jun nachgewiesen, welche beide frühe Mediatoren für Zellstress und der Apoptoseinduktion sind [146]. Somit induziert die kristalloide Kardioplegielösung über bisher noch nicht genau geklärte Mechanismen sowohl pro- als auch anti-apoptotische Signalwege.

## 6 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe eines *in vitro* Zellkulturmodells mit H9c2-Zellen der Einfluss von tiefer Hypothermie und der Administration von Kardioplegielösung auf das durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Apoptoseverhalten der Zellen untersucht. Es lässt sich sagen, dass die Veränderungen durch tiefe Hypothermie und Kardioplegie sehr komplex und vielschichtig sind. In der vorliegenden Arbeit konzentrierten wir uns hauptsächlich auf die mitochondrialen Stoffwechselwege. Die Ergebnisse der Experimente lieferten wichtige Informationen über die Signalmoleküle, die unter Hypothermie und oxidativem Stress für Kardioprotektion sorgen. Darüber hinaus konnten Signalwege, die durch Kardioplegie und Hypothermie aktiviert werden, näher charakterisiert werden. Bei unserem Modell handelt es sich um ein Zellkulturmodell an dem z.B. klinisch relevante Parameter wie Temperatur unter chirurgischen Bedingungen an Kardiomyozyten *in vitro* nachgestellt wurden. Als schädigende Noxe wurde von uns H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verwendet und die nachgeschalteten zellulären Mechanismen könnten sich durchaus von Ischämie-Reperfusionsschäden *in vivo* unterscheiden. Darüber hinaus sind die Konditionen rund um kardiochirurgische Korrekturoperationen mit der Herz-Lungen-Maschine wesentlich komplexer und die Ursachen für postoperatives Herzversagen haben verschiedenste Hintergründe. Dennoch liefert das Zellkulturmodell wichtige Erkenntnisse über die zugrundeliegenden Effekte tiefer Hypothermie und der Administration von Kardioplegielösung während oxidativem Stress. Die vorliegenden Ergebnisse dienen als Basis für weitere Untersuchungen und können dazu beitragen, die kardioprotektiven Strategien während oxidativem Stress besser zu verstehen und zu optimieren. Aus diesen Erkenntnissen könnten neue Ansätze entwickelt werden, auch wenn die Konsequenzen für die Klinik sehr vorsichtig formuliert werden sollten. Die Komplexität des menschlichen Organismus und die Wechselwirkungen der einzelnen Faktoren wie Alter und Schwere

der Grunderkrankung des Patienten, die Dauer der Operation und weitere Vorerkrankungen des Patienten beeinflussen stark den postoperativen Verlauf und die zellulären Effekte sowohl lokal und als auch global im Körper.

## **7 Ausblick**

Die Daten der vorliegenden Arbeit bieten eine gute Ausgangsposition für weitere Untersuchungen. Zunächst sollten die noch nicht verstandenen Signalwege weitergehend erforscht werden. Dies könnte unter anderem mittels Kernisolierung und Real-Time PCR erfolgen. Aufbauend auf weiteren Erkenntnissen könnte dazu übergegangen werden, die Ergebnisse, die die mitochondriale Aktivität anbelangen, an einer schlagenden Zelllinie, an isolierten neonatalen Kardiomyozyten oder an isolierten Organen (Langendorff-Herz) zu verifizieren. In einem nächsten Schritt könnte ein Tiermodell zur Evaluierung der im Organismus stattfindenden Prozesse etabliert werden. Außerdem könnten antioxidativ wirksame Substanzen wie Vitamin C auf ihre additiven Effekte auf die Hypothermie-induzierten Schutzmechanismen untersucht werden. Interessant wäre es auch, den Effekt spezifischer Inhibitoren der Apoptosekaskaden, z. B. PARP-Inhibitoren, zu untersuchen. Es konnte in einem Modell mit isolierten Rattenherzzellen und Kardioplegielösung gezeigt werden, dass der PARP-Inhibitor 3-Aminobenzamid den Reperfusionsschaden signifikant vermindern konnte [147]. Weiterhin wäre eine Testung von Medikamenten, die regelhaft intraoperativ eingesetzt werden und zusätzlich antioxidative und zytoprotektive Eigenschaften aufweisen (z.B. Propofol), auf ihre additiven oder supportiven Effekte interessant.



## 8 Zusammenfassung

Hypothermie und Kardioplegie sind seit den 1950er Jahren bedeutende Methoden in der Herzchirurgie. Die genauen zellulären Mechanismen der Kardioprotektion sind jedoch nach wie vor weitgehend ungeklärt und Bestandteil aktueller Forschung.

Das Ziel der hier vorgelegten Arbeit war es, die zugrunde liegenden Mechanismen der Hypothermie-induzierten Kardioprotektion während Phasen des oxidativen Stresses in einem Kardiomyozyten-Zellkulturmodell zu untersuchen. Zellen der Ratten-Kardiomyozytenzelllinie H9c2 wurden in Analogie zu dem klinischen Prozedere gekühlt und wiedererwärmt: von 37°C auf 20°C, belassen der Zellen bei 20°C für 20 Minuten (währenddessen Schädigung mit 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Administration der Kardioplegielösung), anschließende Wiedererwärmung auf 37°C. Daraufhin analysierten wir die Ausschüttung der Laktatdehydrogenase, die Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies, die intrazelluläre ATP-Produktion und die Aktivität der mitochondrialen Reduktase, die Expression apoptoseassoziiierter Signalmoleküle (Bax, Caspase-9, Caspase-3, AIF), DNA-Schädigungsmarker (H2AX, PARP-1, p53, M30 CytoDeath-Färbung) und die Expression zytoprotektiver Moleküle (ERK, Bcl-2, Akt, Hsp 32).

Hypothermie verringerte die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Apoptose in Kardiomyozyten, was sich in einer geringeren LDH-Ausschüttung, einer geringeren Caspase-9 und Caspase-3 Spaltung und einer verminderten Färbung der Cytokeratine zeigte. Zusätzlich konnte Hypothermie eine Verringerung der AIF- und p53-Expression bewirken. Nach der Wiedererwärmung waren gekühlte und wiedererwärmte Zellen besser in der Lage, ROS zu eliminieren. Zusätzlich waren die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase und der ATP-Gehalt nach Kühlung während des oxidativen Stresses signifikant höher als in den normothermen Zellen. Hypothermie erhöhte signifikant die Expression zytoprotektiver Signalmoleküle wie Bcl-2, Akt und Hsp-32. Ebenso konnte Hypothermie die DNA-Schädigung, dargestellt in der Expression von H2AX, p53 und PARP-1, signifikant verringern.

Die Effekte der Kardioplegielösung allein oder in Kombination mit Hypothermie nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induziertem oxidativen Stress erbrachten unterschiedliche Ergebnisse. Wir konnten zeigen, dass Hypothermie und kalte Kardioplegielösung in Kombination im Vergleich zur normothermen Gruppe positive Effekte auf das Zellüberleben zeigten. Die Reduktion der frühen ERK-Aktivität mit nachfolgender Phosphorylierung des Akt-

Survivalproteins sprechen wie die Hochregulation der Bcl-2-Expression und die Reduktion der Bax-Expression, einhergehend mit einer verringerten Caspase-3-Aktivität, für eine kardioprotektive Wirkung kalter Kardioplegielösung. Auch konnte eine geringere Phosphorylierung von H2AX nachgewiesen werden. Kalte kristalloide Kardioplegielösung führte in den Zellen, die bei 37°C mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> geschädigt wurden, zu einem signifikanten Anstieg des Zelltodes, einem Verlust der Mitochondrienfunktion (ATP-Produktion und Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase), typischen morphologischen Apoptosemerkmalen und der Erhöhung proapoptotischer Signalmoleküle (Bax, Caspase-9).

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass Hypothermie Kardiomyozyten während H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vermitteltem oxidativen Stress durch eine Hemmung mitochondrialer Dysfunktionen und die Hemmung früher DNA-Schädigung vor Apoptose schützt. Die Kombination von Hypothermie und Kardioplegie während oxidativem Stress erbrachte keine signifikante Verbesserung der Zellvitalität und Aktivität. Die Gabe von kalter Kardioplegielösung während der Stimulation der Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei 37°C führte zu einem gesteigerten Verlust der Zellvitalität.

## 9 Abstract

Hypothermia and cardioplegia are both standard methods for organ protection during heart surgery but the underlying basic mechanisms still remain mostly unclear and represent objects of current research activities. The purpose of our study was to investigate the mechanisms of hypothermia-induced cardioprotection during oxidative stress in a cardiomyocyte cell culture model. For hypothermic treatment we cooled H9c2 cardiomyocytes to 20°C, maintained 20 min at 20°C during which short-term oxidative damage was inflicted with 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, followed by rewarming to 37°C. Later on, we analyzed lactate dehydrogenase (LDH), caspase-9 and -3 cleavage, reactive oxygen species (ROS), mitochondrial activity, intracellular ATP production, cytoprotective signaling molecules (Bcl-2, Akt protein, Hsp-32) as well as DNA damage (H2AX, p53 and PARP-1 activity). Hypothermia significantly decreased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damage in cardiomyocytes as demonstrated in a lower LDH release, less caspase-3 cleavage and less M30 CytoDeath staining. After rewarming, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damaged cells demonstrated a significantly higher reduction rate of intracellular ROS compared to normothermic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damaged cardiomyocytes. This was in line with a significantly greater mitochondrial dehydrogenase activity and higher intracellular ATP content in cooled and rewarmed cells. Moreover, hypothermia preserved cell viability by up-regulation of the anti-apoptotic protein Bcl-2 and a reduction of p53 phosphorylation. DNA damage, proven by PARP-1 cleavage and H2AX phosphorylation, was significantly reduced by hypothermia.

The effects of cardioplegic solution during simulation of ischemia were different depending on the temperature. We could demonstrate that hypothermia and cardioplegic solution showed positive effects on cell viability during oxidative stress in comparison to normothermic cells although cell vitality was decreased compared to cells treated with hypothermia during oxidative stress. Early reduction of ERK activity with subsequent increased phosphorylation of Akt protein together with increased expression of Bcl-2 and reduced Bax expression with reduced Caspase-3 activity represent anti-apoptotic signaling pathways induced by hypothermia and cold cardioplegic solution. These results are in line with a reduction in the phosphorylation rate of H2AX. In contrast, cold cardioplegic solution during oxidative stress led to increased cell death in normothermic cells with loss of mitochondrial function and typical morphological apoptotic features and an increase in proapoptotic signalling molecules.

**Literaturverzeichnis**

1. Holzer, M., et al., *Hypothermia for neuroprotection after cardiac arrest: systematic review and individual patient data meta-analysis*. Crit Care Med, 2005. **33**(2): p. 414-8.
2. Polderman, K.H. and I. Herold, *Therapeutic hypothermia and controlled normothermia in the intensive care unit: practical considerations, side effects, and cooling methods*. Crit Care Med, 2009. **37**(3): p. 1101-20.
3. Bernard, S.A., et al., *Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia*. N Engl J Med, 2002. **346**(8): p. 557-63.
4. Wolfrum, S., et al., *Mild therapeutic hypothermia in patients after out-of-hospital cardiac arrest due to acute ST-segment elevation myocardial infarction undergoing immediate percutaneous coronary intervention*. Crit Care Med, 2008. **36**(6): p. 1780-6.
5. Nolan, J.P., et al., *European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2010 Section 1. Executive summary*. Resuscitation, 2010. **81**(10): p. 1219-76.
6. Holzer, M., et al., *Mild hypothermia and outcome after CPR. Hypothermia for Cardiac Arrest (HACA) Study Group*. Acta Anaesthesiol Scand Suppl, 1997. **111**: p. 55-8.
7. Zeiner, A., et al., *Mild resuscitative hypothermia to improve neurological outcome after cardiac arrest. A clinical feasibility trial. Hypothermia After Cardiac Arrest (HACA) Study Group*. Stroke, 2000. **31**(1): p. 86-94.
8. Hemmen, T.M. and P.D. Lyden, *Hypothermia after acute ischemic stroke*. J Neurotrauma, 2009. **26**(3): p. 387-91.
9. Nagel, S., et al., *Therapeutic hypothermia in experimental models of focal and global cerebral ischemia and intracerebral hemorrhage*. Expert Rev Neurother, 2008. **8**(8): p. 1255-68.
10. Olsen, T.S., U.J. Weber, and L.P. Kammersgaard, *Therapeutic hypothermia for acute stroke*. Lancet Neurol, 2003. **2**(7): p. 410-6.
11. Yenari, M.A. and T.M. Hemmen, *Therapeutic hypothermia for brain ischemia: where have we come and where do we go?* Stroke, 2010. **41**(10 Suppl): p. S72-4.
12. Zanelli, S., M. Buck, and K. Fairchild, *Physiologic and pharmacologic considerations for hypothermia therapy in neonates*. J Perinatol, 2011. **31**(6): p. 377-86.
13. Peterson, K., S. Carson, and N. Carney, *Hypothermia treatment for traumatic brain injury: a systematic review and meta-analysis*. J Neurotrauma, 2008. **25**(1): p. 62-71.
14. Finkelstein, R.A. and H.B. Alam, *Induced hypothermia for trauma: current research and practice*. J Intensive Care Med, 2010. **25**(4): p. 205-26.

15. Schubert, G.A., et al., *Hypothermia reduces cytotoxic edema and metabolic alterations during the acute phase of massive SAH: a diffusion-weighted imaging and spectroscopy study in rats*. J Neurotrauma, 2008. **25**(7): p. 841-52.
16. Schubert, G.A., et al., *Hypothermia reduces early hypoperfusion and metabolic alterations during the acute phase of massive subarachnoid hemorrhage: a laser-Doppler-flowmetry and microdialysis study in rats*. J Neurotrauma, 2008. **25**(5): p. 539-48.
17. Schwab, S., et al., *Moderate hypothermia in the treatment of patients with severe middle cerebral artery infarction*. Stroke, 1998. **29**(12): p. 2461-6.
18. Kollmar, R. and S. Schwab, *Therapeutic hypothermia in neurological critical care*. Dtsch Med Wochenschr, 2010. **135**(47): p. 2361-5.
19. Kollmar, R., et al., *Hypothermia reduces perihemorrhagic edema after intracerebral hemorrhage*. Stroke, 2010. **41**(8): p. 1684-9.
20. Todd, M.M., et al., *Mild intraoperative hypothermia during surgery for intracranial aneurysm*. N Engl J Med, 2005. **352**(2): p. 135-45.
21. Lindinger, A., G. Schwedler, and H.W. Hense, *Prevalence of congenital heart defects in newborns in Germany: Results of the first registration year of the PAN Study (July 2006 to June 2007)*. Klin Padiatr, 2010. **222**(5): p. 321-6.
22. Khandelwal, M., et al., *Evaluation of fetal and uterine hemodynamics during maternal cardiopulmonary bypass*. Obstet Gynecol, 1996. **88**(4 Pt 2): p. 667-71.
23. Hoffman, J.I. and S. Kaplan, *The incidence of congenital heart disease*. J Am Coll Cardiol, 2002. **39**(12): p. 1890-900.
24. Paparella, D., T.M. Yau, and E. Young, *Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update*. Eur J Cardiothorac Surg, 2002. **21**(2): p. 232-44.
25. Diestel, A., et al., *Methylprednisolone and tacrolimus prevent hypothermia-induced endothelial dysfunction*. J Heart Lung Transplant, 2009. **28**(7): p. 718-24.
26. Langley, S.M., et al., *Preoperative high dose methylprednisolone attenuates the cerebral response to deep hypothermic circulatory arrest*. Eur J Cardiothorac Surg, 2000. **17**(3): p. 279-86.
27. Hill, G.E., et al., *Aprotinin and methylprednisolone equally blunt cardiopulmonary bypass-induced inflammation in humans*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1995. **110**(6): p. 1658-62.
28. Arens, J., et al., *The Aachen MiniHLM--a miniaturized heart-lung machine for neonates with an integrated rotary blood pump*. Artif Organs, 2010. **34**(9): p. 707-13.

29. Su, X.W. and A. Undar, *Brain protection during pediatric cardiopulmonary bypass*. Artif Organs, 2010. **34**(4): p. E91-102.
30. Larsen, R., *Anästhesie und Intensivmedizin in Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie*. Vol. 7. 2009, Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
31. Rosomoff, H.L. and D.A. Holaday, *Cerebral blood flow and cerebral oxygen consumption during hypothermia*. Am J Physiol, 1954. **179**(1): p. 85-8.
32. Polderman, K.H., *Induced hypothermia and fever control for prevention and treatment of neurological injuries*. Lancet, 2008. **371**(9628): p. 1955-69.
33. Langley, S.M., et al., *Intermittent perfusion protects the brain during deep hypothermic circulatory arrest*. Ann Thorac Surg, 1999. **68**(1): p. 4-12; discussion 12-3.
34. Fan, Y., et al., *Warm versus cold cardioplegia for heart surgery: a meta-analysis*. Eur J Cardiothorac Surg, 2010. **37**(4): p. 912-9.
35. Doenst, T., C. Schlensak, and F. Beyersdorf, *Cardioplegia in pediatric cardiac surgery: do we believe in magic?* Ann Thorac Surg, 2003. **75**(5): p. 1668-77.
36. Granger, D.N., *Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury*. Am J Physiol, 1988. **255**(6 Pt 2): p. H1269-75.
37. Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiol Rev, 2002. **82**(1): p. 47-95.
38. Thiagarajan, R.R., R.K. Winn, and J.M. Harlan, *The role of leukocyte and endothelial adhesion molecules in ischemia-reperfusion injury*. Thromb Haemost, 1997. **78**(1): p. 310-4.
39. Wei, Y.H., et al., *Oxidative damage and mutation to mitochondrial DNA and age-dependent decline of mitochondrial respiratory function*. Ann N Y Acad Sci, 1998. **854**: p. 155-70.
40. Tertilt, M., A. Jozkowicz, and J. Dulak, *Oxidative Stress in Tumor Angiogenesis-Therapeutic Targets*. Curr Pharm Des, 2010.
41. Wellen, K.E. and C.B. Thompson, *Cellular metabolic stress: considering how cells respond to nutrient excess*. Mol Cell, 2010. **40**(2): p. 323-32.
42. Kobiakov, V.A., *Mechanisms of tumor promotion by reactive oxygen species*. Biochemistry (Mosc), 2010. **75**(6): p. 675-85.
43. Pani, G., T. Galeotti, and P. Chiarugi, *Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress*. Cancer Metastasis Rev, 2010. **29**(2): p. 351-78.
44. Dumont, M. and M.F. Beal, *Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease*. Free Radic Biol Med, 2010.

45. Bloomer, R.J., et al., *Effect of resistance training on blood oxidative stress in Parkinson disease*. Med Sci Sports Exerc, 2008. **40**(8): p. 1385-9.
46. Evans, J.L., et al., *Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes*. Endocr Rev, 2002. **23**(5): p. 599-622.
47. Tiganis, T., *Reactive oxygen species and insulin resistance: the good, the bad and the ugly*. Trends Pharmacol Sci, 2011. **32**(2): p. 82-9.
48. Galley, H.F., et al., *The effects of intravenous antioxidants in patients with septic shock*. Free Radic Biol Med, 1997. **23**(5): p. 768-74.
49. Chang, J.C., et al., *Regulatory role of mitochondria in oxidative stress and atherosclerosis*. World J Cardiol, 2010. **2**(6): p. 150-9.
50. Dai, D.F. and P.S. Rabinovitch, *Cardiac aging in mice and humans: the role of mitochondrial oxidative stress*. Trends Cardiovasc Med, 2009. **19**(7): p. 213-20.
51. Misra, M.K., et al., *Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes*. Med Sci Monit, 2009. **15**(10): p. RA209-219.
52. Chrissobolis, S., et al., *Oxidative stress and endothelial dysfunction in cerebrovascular disease*. Front Biosci, 2011. **16**: p. 1733-45.
53. Demarco, V.G., et al., *Contribution of oxidative stress to pulmonary arterial hypertension*. World J Cardiol, 2010. **2**(10): p. 316-24.
54. Queen, B.L. and T.O. Tollefsbol, *Polyphenols and aging*. Curr Aging Sci, 2010. **3**(1): p. 34-42.
55. Vaux, D.L., G. Haecker, and A. Strasser, *An evolutionary perspective on apoptosis*. Cell, 1994. **76**(5): p. 777-9.
56. Williams, G.T., *Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis*. Cell, 1991. **65**(7): p. 1097-8.
57. Itoh, G., et al., *DNA fragmentation of human infarcted myocardial cells demonstrated by the nick end labeling method and DNA agarose gel electrophoresis*. Am J Pathol, 1995. **146**(6): p. 1325-31.
58. Thompson, C.B., *Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease*. Science, 1995. **267**(5203): p. 1456-62.
59. Skulachev, V.P., *Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis*. Apoptosis, 2006. **11**(4): p. 473-85.
60. Voll, R.E., et al., *Immunosuppressive effects of apoptotic cells*. Nature, 1997. **390**(6658): p. 350-1.
61. Arends, M.J. and A.H. Wyllie, *Apoptosis: mechanisms and roles in pathology*. Int Rev Exp Pathol, 1991. **32**: p. 223-54.

62. Raff, M.C., *Social controls on cell survival and cell death*. Nature, 1992. **356**(6368): p. 397-400.
63. Peitsch, M.C., H.G. Mannherz, and J. Tschopp, *The apoptosis endonucleases: cleaning up after cell death?* Trends Cell Biol, 1994. **4**(2): p. 37-41.
64. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
65. Lu, B., et al., *Regulation of Fas (CD95)-induced apoptosis by nuclear factor-kappaB and tumor necrosis factor-alpha in macrophages*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **283**(3): p. C831-8.
66. von Harsdorf, R., P.F. Li, and R. Dietz, *Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis*. Circulation, 1999. **99**(22): p. 2934-41.
67. Wolff, S., et al., *p53's mitochondrial translocation and MOMP action is independent of Puma and Bax and severely disrupts mitochondrial membrane integrity*. Cell Res, 2008. **18**(7): p. 733-44.
68. Cohen, G.M., *Caspases: the executioners of apoptosis*. Biochem J., 1997. **326**: p. 1-16.
69. Sakahira, H., M. Enari, and S. Nagata, *Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis*. Nature, 1998. **391**(6662): p. 96-9.
70. Modesti, M. and R. Kanaar, *DNA repair: spot(light)s on chromatin*. Curr Biol, 2001. **11**(6): p. R229-32.
71. Celeste, A., et al., *Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(7): p. 675-9.
72. Susin, S.A., et al., *Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor*. Nature, 1999. **397**(6718): p. 441-6.
73. Loeffler, M., et al., *Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor*. Faseb J, 2001. **15**(3): p. 758-67.
74. Chipuk, J.E., et al., *Mechanism of apoptosis induction by inhibition of the anti-apoptotic BCL-2 proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(51): p. 20327-32.
75. Wang, X., et al., *The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival*. Biochem J, 1998. **333** (Pt 2): p. 291-300.
76. Cagnol, S. and J.C. Chambard, *ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence*. Febs J, 2010. **277**(1): p. 2-21.
77. Amaravadi, R. and C.B. Thompson, *The survival kinases Akt and Pim as potential pharmacological targets*. J Clin Invest, 2005. **115**(10): p. 2618-24.



78. Matsui, T. and A. Rosenzweig, *Convergent signal transduction pathways controlling cardiomyocyte survival and function: the role of PI 3-kinase and Akt*. J Mol Cell Cardiol, 2005. **38**(1): p. 63-71.
79. Stiles, B.L., *PI-3-K and AKT: Onto the mitochondria*. Adv Drug Deliv Rev, 2009. **61**(14): p. 1276-82.
80. Aikawa, R., et al., *Insulin prevents cardiomyocytes from oxidative stress-induced apoptosis through activation of PI3 kinase/Akt*. Circulation, 2000. **102**(23): p. 2873-9.
81. Katori, M., et al., *A novel strategy against ischemia and reperfusion injury: cytoprotection with heme oxygenase system*. Transpl Immunol, 2002. **9**(2-4): p. 227-33.
82. Martin, D., et al., *Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol*. J Biol Chem, 2004. **279**(10): p. 8919-29.
83. Salinas, M., et al., *Protein kinase Akt/PKB phosphorylates heme oxygenase-1 in vitro and in vivo*. FEBS Lett, 2004. **578**(1-2): p. 90-4.
84. Brunt, K.R., et al., *Protection of human vascular smooth muscle cells from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis through functional codependence between HO-1 and AKT*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(9): p. 2027-34.
85. Pachori, A.S., et al., *Heme-oxygenase-1-induced protection against hypoxia/reoxygenation is dependent on biliverdin reductase and its interaction with PI3K/Akt pathway*. J Mol Cell Cardiol, 2007. **43**(5): p. 580-92.
86. Kimes, B.W. and B.L. Brandt, *Properties of a clonal muscle cell line from rat heart*. Exp Cell Res, 1976. **98**(2): p. 367-81.
87. Yaffe, D., *Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1968. **61**(2): p. 477-83.
88. Hescheler, J., et al., *Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart*. Circ Res, 1991. **69**(6): p. 1476-86.
89. Wang, W., et al., *Properties and expression of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in H9c2 cells derived from rat ventricle*. Am J Physiol, 1999. **276**(5 Pt 2): p. H1559-66.
90. Tsiani, E., et al., *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): p. 1676-86.

91. Yu, B., L.A. Poirier, and L.E. Nagy, *Mobilization of GLUT-4 from intracellular vesicles by insulin and K(+) depolarization in cultured H9c2 myotubes*. Am J Physiol, 1999. **277**(2 Pt 1): p. E259-67.
92. Planavila, A., et al., *Atorvastatin prevents peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) downregulation in lipopolysaccharide-stimulated H9c2 cells*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1736**(2): p. 120-7.
93. Planavila, A., et al., *Inhibition of cardiac hypertrophy by triflusal (4-trifluoromethyl derivative of salicylate) and its active metabolite*. Mol Pharmacol, 2006. **69**(4): p. 1174-81.
94. Babson, A.L. and S.R. Babson, *Kinetic colorimetric measurement of serum lactate dehydrogenase activity*. Clin Chem, 1973. **19**(7): p. 766-9.
95. Decker, T. and M.L. Lohmann-Matthes, *A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity*. J Immunol Methods, 1988. **115**(1): p. 61-9.
96. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
97. Berridge, M.V. and A.S. Tan, *Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction*. Arch Biochem Biophys, 1993. **303**(2): p. 474-82.
98. Wang, H. and J.A. Joseph, *Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader*. Free Radic Biol Med, 1999. **27**(5-6): p. 612-6.
99. LeBel, C.P., H. Ischiropoulos, and S.C. Bondy, *Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress*. Chem Res Toxicol, 1992. **5**(2): p. 227-31.
100. Mosiman, V.L., et al., *Reducing cellular autofluorescence in flow cytometry: an in situ method*. Cytometry, 1997. **30**(3): p. 151-6.
101. Leers, M.P., et al., *Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis*. J Pathol, 1999. **187**(5): p. 567-72.
102. Carden, D.L. and D.N. Granger, *Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury*. J Pathol, 2000. **190**(3): p. 255-66.
103. Corna, G., et al., *Doxorubicin paradoxically protects cardiomyocytes against iron-mediated toxicity: role of reactive oxygen species and ferritin*. J Biol Chem, 2004. **279**(14): p. 13738-45.

104. McDonnell, T.J., et al., *Importance of the Bcl-2 family in cell death regulation*. *Experientia*, 1996. **52**(10-11): p. 1008-17.
105. Bernuzzi, F., et al., *Reactive oxygen species-independent apoptosis in doxorubicin-treated H9c2 cardiomyocytes: role for heme oxygenase-1 down-modulation*. *Chem Biol Interact*, 2009. **177**(1): p. 12-20.
106. Zanelli, S., M. Buck, and K. Fairchild, *Physiologic and pharmacologic considerations for hypothermia therapy in neonates*. *J Perinatol*, 2010.
107. Poling, J., et al., *Evaluation of myocardial metabolism with microdialysis during bypass surgery with cold blood- or Calafiore cardioplegia*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2006. **30**(4): p. 597-603.
108. Korvald, C., et al., *Cardiac dysfunction and inefficiency after substrate-enriched warm blood cardioplegia*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2001. **20**(3): p. 555-62; discussion 562-4.
109. Diestel, A., et al., *Specific p38 inhibition in stimulated endothelial cells: a possible new anti-inflammatory strategy after hypothermia and rewarming*. *Vascul Pharmacol*, 2009. **51**(4): p. 246-52.
110. Diestel, A., et al., *Hypothermia protects H9c2 cardiomyocytes from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced apoptosis*. *Cryobiology*, 2010.
111. Drescher, C., et al., *How does hypothermia protect cardiomyocytes during cardioplegic ischemia?* *Eur J Cardiothorac Surg*, 2011.
112. Chen, H.W., et al., *Cyclosporine A regulate oxidative stress-induced apoptosis in cardiomyocytes: mechanisms via ROS generation, iNOS and Hsp70*. *Br J Pharmacol*, 2002. **137**(6): p. 771-81.
113. Zhao, W., et al., *Protection of peroxiredoxin II on oxidative stress-induced cardiomyocyte death and apoptosis*. *Basic Res Cardiol*, 2009. **104**(4): p. 377-89.
114. Pechtelidou, A., I. Beis, and C. Gaitanaki, *Transient and sustained oxidative stress differentially activate the JNK1/2 pathway and apoptotic phenotype in H9c2 cells*. *Mol Cell Biochem*, 2008. **309**(1-2): p. 177-89.
115. Huang, C.H., et al., *Antiapoptotic cardioprotective effect of hypothermia treatment against oxidative stress injuries*. *Acad Emerg Med*, 2009. **16**(9): p. 872-80.
116. Shao, Z.H., et al., *Hypothermia-induced cardioprotection using extended ischemia and early reperfusion cooling*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. **292**(4): p. H1995-2003.
117. Shuja, F., et al., *Profound hypothermia decreases cardiac apoptosis through Akt survival pathway*. *J Am Coll Surg*, 2009. **209**(1): p. 89-99.

118. Castedo, E., et al., *Influence of hypothermia on right atrial cardiomyocyte apoptosis in patients undergoing aortic valve replacement*. J Cardiothorac Surg, 2007. **2**: p. 7.
119. Shan, D., R.B. Marchase, and J.C. Chatham, *Overexpression of TRPC3 increases apoptosis but not necrosis in response to ischemia-reperfusion in adult mouse cardiomyocytes*. Am J Physiol Cell Physiol, 2008. **294**(3): p. C833-41.
120. Slezak, J., et al., *Hydrogen peroxide changes in ischemic and reperfused heart. Cytochemistry and biochemical and X-ray microanalysis*. Am J Pathol, 1995. **147**(3): p. 772-81.
121. Seo, Y.J., et al., *Role of glutathione in the adaptive tolerance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*. Free Radic Biol Med, 2004. **37**(8): p. 1272-81.
122. Lee, H.C. and Y.H. Wei, *Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(4): p. 822-34.
123. Attuwaybi, B.O., et al., *Hypothermia protects against gut ischemia/reperfusion-induced impaired intestinal transit by inducing heme oxygenase-1*. J Surg Res, 2003. **115**(1): p. 48-55.
124. Ning, X.H., et al., *Hypothermia preserves function and signaling for mitochondrial biogenesis during subsequent ischemia*. Am J Physiol, 1998. **274**(3 Pt 2): p. H786-93.
125. Zachariassen, K.E., *Hypothermia and cellular physiology*. Arctic Med Res, 1991. **50 Suppl 6**: p. 13-7.
126. Khaliulin, I., et al., *Preconditioning improves postischemic mitochondrial function and diminishes oxidation of mitochondrial proteins*. Free Radic Biol Med, 2004. **37**(1): p. 1-9.
127. Thatte, H.S., et al., *Development and evaluation of a novel solution, Somah, for the procurement and preservation of beating and nonbeating donor hearts for transplantation*. Circulation, 2009. **120**(17): p. 1704-13.
128. Bes, S., et al., *Influence of deep hypothermia on the tolerance of the isolated cardiomyocyte to ischemia-reperfusion*. J Mol Cell Cardiol, 2001. **33**(11): p. 1973-88.
129. Matsui, T., et al., *Adenoviral gene transfer of activated phosphatidylinositol 3'-kinase and Akt inhibits apoptosis of hypoxic cardiomyocytes in vitro*. Circulation, 1999. **100**(23): p. 2373-9.
130. Matsui, T., et al., *Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia in vivo*. Circulation, 2001. **104**(3): p. 330-5.

131. Czibik, G., et al., *Cardioprotection by hypoxia-inducible factor 1 alpha transfection in skeletal muscle is dependent on haem oxygenase activity in mice*. Cardiovasc Res, 2009. **82**(1): p. 107-14.
132. Hayashi, Y., et al., *P-selectin participates in cardiopulmonary bypass-induced inflammatory response in association with nitric oxide and peroxynitrite production*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2000. **120**(3): p. 558-65.
133. Metais, C., et al., *Serotonin-induced human coronary microvascular contraction during acute myocardial ischemia is blocked by COX-2 inhibition*. Basic Res Cardiol, 2001. **96**(1): p. 59-67.
134. Metais, C., et al., *Serotonin-induced coronary contraction increases after blood cardioplegia-reperfusion: role of COX-2 expression*. Circulation, 1999. **100**(19 Suppl): p. II328-34.
135. Chesebro, J.H., et al., *A platelet-inhibitor-drug trial in coronary-artery bypass operations: benefit of perioperative dipyridamole and aspirin therapy on early postoperative vein-graft patency*. N Engl J Med, 1982. **307**(2): p. 73-8.
136. Yang, D., et al., *Hypothermia attenuates ischemia/reperfusion-induced endothelial cell apoptosis via alterations in apoptotic pathways and JNK signaling*. FEBS Lett, 2009. **583**(15): p. 2500-6.
137. Gustafsson, A.B. and R.A. Gottlieb, *Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(1): p. C45-51.
138. Imahashi, K., et al., *Transgenic expression of Bcl-2 modulates energy metabolism, prevents cytosolic acidification during ischemia, and reduces ischemia/reperfusion injury*. Circ Res, 2004. **95**(7): p. 734-41.
139. Diestel, A., et al., *Hypothermia downregulates inflammation but enhances IL-6 secretion by stimulated endothelial cells*. Cryobiology, 2008. **57**(3): p. 216-22.
140. Long, X., M.J. Goldenthal, and J. Marin-Garcia, *Oxidative stress enhances phosphorylation of p53 in neonatal rat cardiomyocytes*. Mol Cell Biochem, 2007. **303**(1-2): p. 167-74.
141. Mihara, M., et al., *p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria*. Mol Cell, 2003. **11**(3): p. 577-90.
142. Tanaka, T., et al., *Cytometric analysis of DNA damage: phosphorylation of histone H2AX as a marker of DNA double-strand breaks (DSBs)*. Methods Mol Biol, 2009. **523**: p. 161-8.

143. Tapodi, A., et al., *Pivotal role of Akt activation in mitochondrial protection and cell survival by poly(ADP-ribose)polymerase-1 inhibition in oxidative stress*. J Biol Chem, 2005. **280**(42): p. 35767-75.
144. Leung, C.H., et al., *Transient mitochondrial permeability transition pore opening after neonatal cardioplegic arrest*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2011. **141**(4): p. 975-82.
145. Feng, J., et al., *Molecular indices of apoptosis after intermittent blood and crystalloid cardioplegia*. Circulation, 2005. **112**(9 Suppl): p. I184-9.
146. Ramlawi, B., et al., *Indices of apoptosis activation after blood cardioplegia and cardiopulmonary bypass*. Circulation, 2006. **114**(1 Suppl): p. I257-63.
147. Yamazaki, K., et al., *Prevention of myocardial reperfusion injury by poly(ADP-ribose) synthetase inhibitor, 3-aminobenzamide, in cardioplegic solution: in vitro study of isolated rat heart model*. Eur J Cardiothorac Surg, 2004. **26**(2): p. 270-5.

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

**Publikationsliste****Originalarbeiten als Erst- oder Koautorin**

A. Diestel, J. Roessler, A. Pohl-Schickinger, A. Koster, **C. Drescher**, F. Berger, K.R.L. Schmitt: Specific p38 inhibition in stimulated endothelial cells: A possible new anti-inflammatory strategy after hypothermia and rewarming. *Vascular Pharmacology*. 2009 Oct; 51(4): 246-52.

A. Diestel, **C. Drescher**, O. Miera, F. Berger, K.R.L. Schmitt: Hypothermia protects H9c2 cardiomyocytes from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced apoptosis. *Cryobiology* 2011 Feb; 62(1): 53-61.

**C. Drescher**, A. Diestel, S. Wollersheim, F. Berger, K.R.L. Schmitt: How does hypothermia protect cardiomyocytes during cardioplegic ischemia? *European Journal of Cardiothoracic Surgery*. 2011 Jan 15.

**Posterpräsentationen mit Abstract-Veröffentlichung**

K.R.L. Schmitt, **C. Drescher**, C. Spencer-Hänsch, A. Diestel, F. Berger: Deep hypothermia protects cardiomyocytes from oxidative stress. Jahrestagung der DGPK, Neu-Ulm Oktober 2008.

S. Troeller, A. Diestel, I. M. Sauer, N. Billecke, **C. Drescher**, S. Wollersheim, F. Berger und K.R.L. Schmitt: Hypothermia induces reversible morphological changes in neurons. 3<sup>rd</sup> International Hypothermia Symposium Lundt, Schweden, September 2009.

**C. Drescher**, S. Troeller, S. Wollersheim, A. Diestel, F. Berger und K.R.L. Schmitt: Hypothermia protects cardiomyocytes from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced oxidative stress. 3<sup>rd</sup> International Hypothermia Symposium Lundt, Schweden, September 2009.

**C. Drescher**, A. Diestel, F. Berger, K.R.L. Schmitt: Hypothermia decreases apoptosis after oxidative stress in cardiomyocytes. 45<sup>th</sup> Annual Meeting AEPC Innsbruck, Österreich, Mai 2010.

P. Soltani, F. Berger, **C. Drescher**, S. Wollersheim, K.R.L. Schmitt: Is mild hypothermia cool enough to protect cardiomyocytes after ischemic injury? European society of artificial organs (ESAO) Skopje, Mazedonien, September 2010.



**Vortragspräsentationen mit Abstract-Veröffentlichung**

K.R.L. Schmitt, S. Troeller, S. Wollersheim, **C. Drescher**, F. Berger, S. Hendrix und A. Diestel: Methylprednisolone and deep hypothermia are neuroprotective after NMDA induced cell injury in neonatal mouse brain slices. 3<sup>rd</sup> International Hypothermia Symposium Lundt, Schweden, September 2009.

**C. Drescher**, A. Diestel, S. Wollersheim, F. Berger, K.R.L. Schmitt: How does hypothermia protect cardiomyocytes during cardioplegic ischemia? European society of artificial organs (ESAO) Skopje, Mazedonien, September 2010.

S. Wollersheim, **C. Drescher**, P. Soltani, F. Berger, K.R.L. Schmitt: Deep hypothermia leads to cellular stress and endothelial dysfunction in a coculture model of endothelial cells and macrophages. European society of artificial organs (ESAO) Skopje, Mazedonien, September 2010.

S. Wollersheim, **C. Drescher**, P. Soltani, F. Berger, K.R.L. Schmitt: Hypothermie hat keinen Einfluss auf die Zytokinausschüttung nach Kardiopulmonalem Bypass: Erfahrungen vom Labor bis in die Klinik. Jahrestagung der DGPK Weimar, Oktober 2010.

**Erklärung**

Ich, Cornelia Drescher, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Einfluss von tiefer Hypothermie und Kardioplegie auf das Apoptose-Verhalten von H9c2-Kardiomyozyten nach oxidativem Stress“

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.

Datum

Unterschrift

## **Danksagung**

Zum Abschluss dieser Arbeit gilt mein besonderer Dank:

Meiner Doktormutter PD Dr. med. Katharina Schmitt für die fachliche Betreuung und die tatkräftige Unterstützung während der gesamten Zeit im Labor und bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Felix Berger für die Überlassung des interessanten Themas, das Ermöglichen dieser wissenschaftlichen Arbeit und die Einbringung neuer Ideen und Ansätze.

Der medizinischen Doktorandin Sonja Wollersheim für die vielen konstruktiven Diskussionen über Methoden und weitergehende Ideen.

Den Mitarbeiterinnen im Labor Dr. Antje Diestel, Chantel Spencer-Hänsch, Anke Jurisch und Franka Brey für die Einarbeitung in das laborexperimentelle Arbeiten und für die Unterstützung und freundliche Zusammenarbeit.

Meinen Eltern, die mir mein Studium und auch diese Arbeit ermöglicht und mich in allen Situationen unterstützt haben.

Meinem Freund Dr. med. Jörg Rößler, der mich sowohl bei der praktischen als auch bei der theoretischen Erstellung dieser Arbeit unterstützt und motiviert hat.