

Molekularbiologische und biochemische Charakterisierung eines Adeninnukleotid-Translokator (ANT)-transgenen Tiermodells

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der freien Universität Berlin

vorgelegt von

Diplom Biologin Inga Klumpe

aus Georgsmarienhütte

Berlin, September 2012

Diese Arbeit wurde angefertigt vom 01.04.2008 bis 11.09.2012 am Institut für Kardiologie und Pulmologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, unter Leitung von Prof. Dr. med. Heinz-Peter Schultheiss und Dr. rer. nat. Andrea Dörner.

1. Gutachter: Prof. Dr. Heinz-Peter Schultheiss

2. Gutachter: Prof. Dr. Petra Knaus

Disputation am 11. April 2013

FÜR MATTHIAS.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung.....	1
1.1 Der Adeninnukleotid-Translokator (ANT).....	1
1.1.1 Struktur und Funktion des ANT	1
1.1.2 Die Isoformen des ANT	2
1.1.3 Genregulation des ANT.....	3
1.1.4 Der ANT in kardialen Erkrankungen	4
1.1.5 Kardioprotektion durch ANT1	4
1.2 Zelluläre Veränderungen bei Ischämie und Hypoxie	5
1.2.1 Myokardialer Energiemetabolismus.....	5
1.2.2 Entstehung und Auswirkungen von ROS.....	7
1.2.3 Das antioxidative Stress-System	7
1.2.4 Nekrose und Apoptose	8
1.2.5 Stressinduzierte Signalwege im Herzen.....	10
1.3 Kontraktiler Mechanismus des Herzens	12
1.4 Zielsetzung	14
2. Material und Methoden	15
2.1 Materialien.....	15
2.1.1 Chemikalien.....	15
2.1.2 Puffer und Stammlösungen	18
2.1.3 Kommerzielle Test-Systeme	20
2.1.4 Enzyme	21
2.1.5 Antikörper.....	21
2.1.6 Nukleinsäuren.....	23
2.1.6.1 Sequenzen der synthetischen Oligonukleotide	23

2.1.6.2	DNA-Template	24
2.1.7	Plasmide	24
2.1.8	Zelllinien und Medien.....	25
2.1.9	Bakterienstämme und Medien	26
2.1.9.1	Bakterienstämme	26
2.1.9.2	Nährmedien	26
2.1.10	Gebrauchswaren	27
2.1.11	Sonstige Materialien und Geräte	28
2.1.12	Sterilisation	29
2.2	ANT1-Tiermodell.....	30
2.2.1	Identifizierung der ANT1-Ratten	30
2.2.2	Ischämie-Induktion im Myokard von WT- und ANT1-Ratten	31
2.2.3	Organentnahme.....	32
2.2.3.1	Herzentnahme aus ischämischen- und <i>Sham</i> -operierten Ratten und Bestimmung der Infarktgröße	32
2.2.3.2	Herzentnahme aus unbehandelten Ratten.....	32
2.3	Zellkulturen	33
2.3.1	Primärkulturen von Kardiomyozyten	33
2.3.1.1	Unterschiede von neonatalen und adulten Rattenkardiomyozyten (NRCM/ARCM).....	33
2.3.1.2	Präparation der NRCM.....	34
2.3.1.3	Hypoxie-Induktion in NRCM.....	35
2.3.1.4	Präparation der ARCM.....	35
2.3.2	HL-1-Zelllinie.....	36
2.3.2.1	Kultivierung von HL-1-Zellen	36
2.3.2.2	Einfrieren und Auftauen von HL-1-Zellen.....	36
2.4	Biochemische Analysen	37
2.4.1	Herstellung von Proteinhomogenaten aus Herzgewebe.....	37
2.4.2	Herstellung von Zellextrakten aus NRCM.....	37

2.4.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	37
2.4.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	38
2.4.5	Western-Blot.....	38
2.4.6	Immunfärbung	39
2.4.7	Katalaseaktivität	39
2.4.8	Proteincarbonylierungen im Gewebe	40
2.4.9	Peroxidkonzentration im Blutserum.....	41
2.4.10	Ca ²⁺ -Transport-Messung	41
2.5	Zellbiologische Analysen	43
2.5.1	Zellzahlbestimmung	43
2.5.2	Zellviabilitätstest	44
2.5.3	ATP-Messung.....	44
2.5.4	Laktatdehydrogenase-Aktivität im Zellmedium	44
2.5.5	Caspase-3/7-Aktivität	45
2.5.6	TUNEL-Färbung	45
2.5.7	Messung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).....	45
2.5.8	Behandlung von NRCM mit H ₂ O ₂	46
2.5.9	Zytokin-Stimulation von NRCM.....	46
2.5.10	Morphologische Analysen von ARCM.....	46
2.5.11	Elektrische Stimulation und Messung der kardialen Kontraktion von ARCM	46
2.5.12	Transfektion und Zytokin-Stimulation von HL-1-Zellen	47
2.5.13	Reportergenanalysen in HL-1-Zellen.....	48
2.6	Molekularbiologische Analysen	48
2.6.1	Isolierung von DNA aus Schwanzspitzenbiopsien zur Genotypisierung	48
2.6.2	Isolierung von RNA aus NRCM	49
2.6.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	49
2.6.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	50

2.6.5	Polymerasekettenreaktion.....	50
2.6.6	cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase	51
2.6.7	Quantitative <i>Real-Time</i> PCR	52
2.6.8	Agarose-Gelelektrophorese	52
2.6.9	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	53
2.6.10	Restriktion von DNA.....	53
2.6.11	Herstellung von <i>Blunt End</i> -DNA-Molekülen.....	53
2.6.12	Reinigung von DNA	54
2.6.13	Ligation von DNA mittels T4-DNA-Ligase	54
2.6.14	Ligation von DNA in den TOPO [®] -Vektor	54
2.6.15	Transformation von kompetenten <i>E.coli</i> -Zellen	55
2.6.16	Herstellung von chemisch kompetenten <i>E.coli</i>	55
2.6.17	Kryokonservierung von <i>E.coli</i> -Kulturen	55
2.6.18	Plasmid-Konstruktion	56
2.6.18.1	pLuc	56
2.6.18.2	pANT1Pro ^{1,5} -Luc.....	57
2.6.18.3	pANT1Pro ⁴ -Luc.....	58
2.6.19	Sequenzierung.....	60
2.7	Statistische Evaluierungen	60
3.	Ergebnisse	61
3.1	Kardioprotektive Wirkung von ANT1 bei Hypoxie	61
3.1.1	Intrazellulärer ATP-Gehalt.....	61
3.1.2	Expression von ANT	62
3.1.3	Bildung von ROS.....	62
3.1.4	Aktivierung des antioxidativen Stress-Systems	63
3.1.5	Nekrotische Zellzerstörung.....	64
3.1.6	Apoptotische Zellzerstörung.....	65

3.1.7	Nekrotische und apoptotische Zellzerstörung in Gegenwart von H ₂ O ₂	67
3.1.8	Aktivierungen von ERK1/2.....	67
3.1.9	Aktivierung von Akt.....	69
3.1.10	HIF-1 α -Expression	71
3.1.11	Hsp90-Expression.....	72
3.2	Kardioprotektive Wirkung von ANT1 bei Ischämie	72
3.2.1	Mortalitätsrate und myokardiale Infarktgröße bei Ischämie.....	72
3.2.2	Oxidativer Stress bei Ischämie	73
3.3	Kontraktiler Mechanismus im Herzen der ANT1-Ratten	74
3.3.1	Expression kontraktiler Proteine und Ca ²⁺ -transportierender Komponenten	74
3.3.2	Bestimmung der SERCA2a-Aktivität	76
3.3.3	Morphologische Veränderungen der ANT1-ARCM	77
3.3.4	Kontraktile Funktion der ANT1-ARCM.....	77
3.4	Identifizierung von ANT1 regulierenden Substanzen	79
3.4.1	Stimulation des ANT1-Promotors.....	79
3.4.2	ANT1-Genregulation in NRCM.....	80
4.	Diskussion	82
4.1	Kardioprotektive Wirkung von ANT1 bei Hypoxie.....	82
4.1.1	Die ANT1-Überexpression beeinflusst den intrazellulären ATP-Gehalt	82
4.1.2	Die ANT1-Überexpression schützt bei Hypoxie vor erhöhter Radikalbildung.....	83
4.1.3	Die ANT1-Überexpression wirkt bei Hypoxie zellprotektiv	85
4.1.4	Die ANT1-Überexpression führt zur Aktivierung von zellprotektiven Signalwegen	87
4.2	Kardioprotektive Wirkung von ANT1 bei Ischämie	89
4.3	Einfluss des ANT1 auf den kontraktilen Mechanismus des Herzens.....	90
4.4	IL-1 β reguliert die Genexpression von ANT1.....	92
4.5	ANT1-spezifische Charakteristika und Kardioprotektion.....	93

5. Zusammenfassung.....	95
6. Summary	97
7. Literaturverzeichnis.....	99
8. Publikationsverzeichnis	115
8.1 Veröffentlichungen.....	115
8.2 Kongressbeiträge	115
Danksagung	117
Lebenslauf.....	118
Eidesstattliche Erklärung.....	119

Abkürzungsverzeichnis

×g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AIF	Apoptose-induzierender Faktor
Akt	Proteinkinase B/Akt
AMM	Äußere mitochondriale Membran
AmpR	Ampicillin-Resistenz
ANT	Adennukleotid-Translokator
APAF-1	Apoptose-Protease aktivierender Faktor 1
ARCM	Adulte Rattenkardiomyozyten
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CAD	Caspase-aktivierte DNAsen
cDNA	<i>Copy-DNA</i>
CI-CV	Atmungskettenkomplexe I-V
CIP	Alkalische Phosphatase, <i>Calf Intestinal</i>
CoQ	Ubichinon
Cu/Zn-SOD	Kupfer/Zink-Superoxid-Dismutase
Cyp-D	Cyclophilin D
Cyt c	Cytochrom c
DCFH-DA	2', 7'-Dichlorofluorescein Diacetat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHPR	Dihydropyridin-Rezeptor
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease

DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	DL-Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EndoG	Endonuklease G
ERK1/2	Extrazellulär regulierte Kinasen 1 und 2
<i>et al.</i>	et alii (und andere)
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid, reduziert
FBS	Fötale Rinderserum
FUDR	5-Fluoro-2'-deoxyuridine
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Gly	Glycin
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GSH	Glutathion
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HIF-1 α	Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 alpha
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HRP	<i>Horse Radish Peroxidase</i>
Hsp90	Hitzeschockprotein 90
Hz	Hertz
IFN- β , IFN- γ	Interferon beta, Interferon gamma
IL-1 β	Interleukin-1 beta
IL-4, IL-6	Interleukin-4, Interleukin-6
IMM	Innere mitochondriale Membran
KanR	Kanamycin-Resistenz
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LAD	Linksantere deszendierende Arterie
LDH	Laktatdehydrogenase
M	Molar (mol/l)

MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
mg	Milligramm
MHC	<i>Myosin Heavy Chain</i>
min	Minute
mM	Millimolar
MnSOD	Mangan-Superoxid-Dismutase
MPTP	Mitochondriale Permeabilitätspore
mtDNA	Mitochondriale DNA
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, reduziert
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher
NRCM	Neonatale Rattenkardiomyozyten
O ₂ ^{·-}	Superoxidanionradikal
P lac	Laktose (Lac)-Promotor
P-Akt	Phosphoryliertes Akt
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDK-1	Phosphoinosid-abhängige Kinase-1
P-ERK1/2	Phosphoryliertes ERK1/2
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PLB	Phospholamban
PMCA	Ca ²⁺ -ATPase der Plasmamembran
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pro	Prolin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R	Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>Revolutions Per Minute</i>
RR	Rutheniumrot
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RyR2	Ryanodin-Rezeptor 2
s	Sekunde

SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SERCA2a	Ca ²⁺ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
SH	Thiolgruppe
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Saline
TCA	Trichloressigsäure
TCEP×HCL	Tris-(2-Carboxyethyl)-phosphine-Hydrochlorid
TGF-β1	<i>Transforming Growth Factor beta 1</i>
Thr ²⁰²	Threoninrest an Position 202
TM	Tropomyosin
TnC, TnI, TnT	Troponin C, Troponin I, Troponin T
TNFα, TNFβ	Tumornekrosefaktor alpha, Tumornekrosefaktor beta
TUNEL	<i>Terminal dUTP Nick End Labeling</i>
Tyr ²⁰⁴	Tyrosinrest an Position 204
UE	Untereinheit
ÜN	Über Nacht
VDAC	<i>Voltage-Dependent Anion Channel</i>
WT	Wildtyp
αMHC	<i>Alpha Myosin Heavy Chain</i>
βMHC	<i>Beta Myosin Heavy Chain</i>

1. Einleitung

1.1 Der Adeninnukleotid-Translokator (ANT)

1.1.1 Struktur und Funktion des ANT

Der ANT ist in der inneren mitochondrialen Membran (IMM) lokalisiert. Er ist der einzige bekannte Carrier, der zytosolisches ADP gegen mitochondriales ATP austauscht [1] und stellt mit 14% das am höchsten exprimierte Protein der IMM dar. Der ANT liegt als Homodimer aus identischen 30 kDa-Untereinheiten vor. Jedes Monomer besteht aus sechs Transmembranhelices, die sich in drei separate, strukturell verwandte Domänen von 100 Aminosäuren unterteilen [2] (Abb. 1.1). Jede Domäne enthält zwei hydrophobe Helices, die sich über matrixexponierte und externe Loops verbinden [3]. Die hydrophoben kernkodierte ANT-Verläuferproteine werden im Zytosol durch molekulare Chaperone wie dem Hitzeschockprotein 70 (Hsp70) und Hsp90 stabilisiert und in Lösung gehalten [4,5]. Zum Einbau in die Mitochondrien transloziert der Komplex aus ANT und Chaperonen zur TOM-Maschinerie der äußeren mitochondrialen Membran (AMM), über die der ANT in den Intermembranraum transportiert wird [6]. Durch die Interaktionen mit TIM-Chaperonen und der Carrier-Translokase (TIM22-Komplex), erfolgt die Insertion in die IMM, wo der ANT zu funktionellen Dimeren assembliert [7-9].

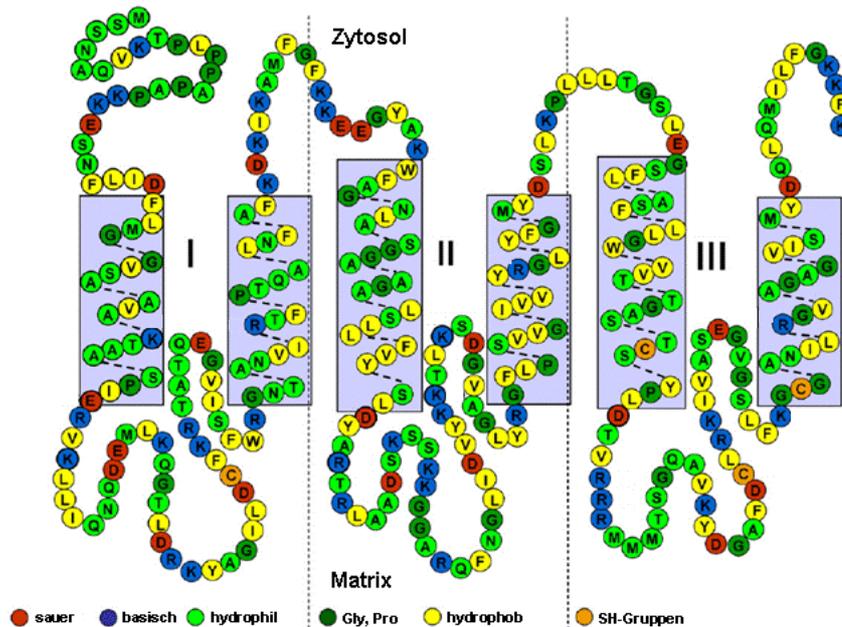


Abb. 1.1: Die Struktur des ANT. Abgebildet sind exemplarisch die Aminosäuresequenz (318 AS) und die sechs Transmembranhelices des ANT aus Hefe (γ AAC2). Die Helices sind in drei strukturell verwandte Domänen (I-

III) unterteilt, die durch matrixexponierte und zytosolische *Hairpin Loops* verbunden sind. Gly: Glycin, Pro: Prolin, SH: Thiolgruppe (modifiziert nach Klingenberg [10]).

Beim ATP/ADP-Transport wird, vom mitochondrialen Membranpotential getrieben, externes ADP^{3-} gegen ATP^{4-} aus der Matrix im Verhältnis 1:1 ausgetauscht [11,12]. Der ANT wechselt dabei zwischen zwei verschiedenen Konformationen, die durch Substratbindung auf der zytosolischen Seite (*c-State*) und der matrixzugewandten Seite (*m-State*) gekennzeichnet sind [13]. Nach Metelkin *et al.* besteht die funktionale anisotrope Transporteinheit aus dem Homodimer, das ATP^{4-} und ADP^{3-} an zwei unterschiedlichen Bindestellen beidseits der Membran bindet und diese daraufhin in entgegengesetzter Richtung über die Membran transportiert [14] (Abb. 1.2). Der Transport ist hoch spezifisch und erfolgt membranpotentialabhängig in Richtung ATP-Export [12,15]. Er ist aber grundsätzlich in beide Richtungen möglich [16,17]. Die ANT-katalysierte Austauschrate ist abhängig vom mitochondrialen Membranpotential, dem pH-Wert, den Adeninnukleotid-Konzentrationen und endogenen Inhibitoren wie Acyl-CoA [14,18,19].

Neben seiner Funktion als ATP/ADP-Transporter ist der ANT ein essentieller Regulator der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung [20,21] (Kapitel 1.2.1) und der Apoptose [22] (Kapitel 1.2.4).

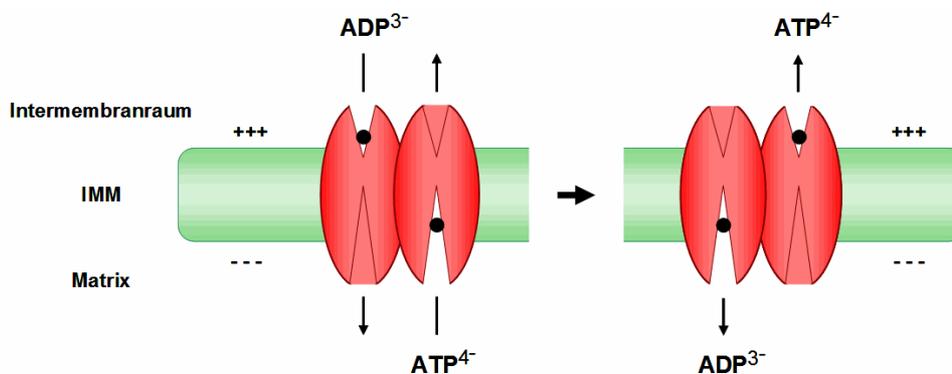


Abb. 1.2: Transportmechanismus des ANT. ANT-Homodimere sind aus zwei parallel angeordneten Monomeren zusammengesetzt, die ATP^{4-} und ADP^{3-} an unterschiedlichen Bindestellen beidseits der Membran binden. Durch einen Antiport-Mechanismus gelangt ADP^{3-} in die mitochondriale Matrix und ATP^{4-} in den Intermembranraum [23] (modifiziert nach Metelkin *et al.* [14] und Ebermann [24]).

1.1.2 Die Isoformen des ANT

Insgesamt sind bei Nagetieren drei (ANT1, 2 und 4) und beim Menschen vier homologe Isoformen des ANT (ANT1-4) bekannt. Diese werden durch drei bzw. vier Gene kodiert und gewebespezifisch exprimiert [25-27]. Der ANT1 ist mit einem Anteil von ca. 70% des Gesamt-ANT-Proteins die

prädominante Isoform in Geweben mit hohem Energiebedarf und eingeschränkter mitotischer Regeneration wie dem Herzen, der Skelettmuskulatur und dem Gehirn [25,28]. Innerhalb des Herzens unterscheidet sich die Expression von ANT1 und den anderen Isoformen nicht zwischen dem linken und dem rechten Ventrikel oder dem Atrium [25]. ANT2 ist wachstumsreguliert und ist die vorherrschende Isoform in der Niere und in mitotisch aktiven Geweben wie Leber, Milz, serumstimulierten Fibroblasten und Lymphozyten [25,29-31]. Im Herzen, in den Skelettmuskeln und im Gehirn beträgt der ANT2-Anteil nur 25% vom gesamten ANT-Protein. ANT3 hingegen wird in geringem Maße in allen Geweben exprimiert und zeigt Charakteristika eines *Housekeeping*-Gens [32]. Die Expression von ANT4 findet hauptsächlich in der Leber, den Testes und in undifferenzierten embryonalen Stammzellen statt [26].

1.1.3 Genregulation des ANT

Die Gene der unterschiedlichen ANT-Isoformen diverser Spezies (Schwein, Ratte, Maus und Mensch) sind hoch konserviert. Sie bestehen aus vier codierenden Exons und drei Introns [28]. Unterschiede in den Intron- und Promotorregionen der ANT-Gene sind für die individuelle Regulation der Expression verantwortlich [28,29].

Der humane ANT1-Promotor besitzt beispielsweise die klassischen TATA- und CCAAT-Elemente, sowie zwei *cis* regulatorische Sequenzen, die im Promotor ca. 500 Bp 5' zum Startcodon lokalisiert sind. Diese OXBOX und REBOX-Elemente reagieren sensitiv auf metabolische und redoxbedingte Einflüsse und regulieren im Myokard neben ANT1 auch Gene von Komponenten der oxidativen Phosphorylierung, wie die β -Untereinheit der ATP-Synthase [33,34]. Da der murine ANT1-Promotor nicht über OXBOX und REBOX-Elemente verfügt [28], wird die Genregulation trotz ähnlicher Proteinexpression offenbar auf unterschiedliche Weise gesteuert. Laut Law *et al.* können spezifische SP1- und Smad-Bindestellen, die die TATA-Box im ANT1-Promotor flankieren, in murinen Astrozyten kooperierend transkriptionelle Aktivierung vermitteln [35].

Der humane ANT2-Promotor besitzt neben der klassischen TATA-Box NF1- und SP1-Bindestellen nahe dem Transkriptionsstart, die für die Regulation von ANT2 essentiell sind [36,37]. Zusätzlich besitzt der ANT2-Promotor eine Region namens GRBOX (*Glycolysis-Regulated Box*), die die ANT2-Expression in differenzierten Geweben hemmt und bei glykolytischem Metabolismus unter sauerstoffarmen Bedingungen hochreguliert. Der ANT2 kann bei Sauerstoffarmut in entgegengesetzter Richtung ATP in die Mitochondrien transportieren, um die mitochondrialen Funktionen aufrechtzuerhalten [17]. Dem ANT3-Promotor fehlen die klassischen TATA- und CCAAT-Motive. Er besitzt stattdessen eine große Anzahl an SP1-Bindestellen und GC-Boxen für dessen konstitutive Expression [34]. Zudem wurden GAS-Sequenzen in der proximalen Promotorregion identifiziert, die eine Regulation über STAT-Faktoren ermöglichen [38].

Über die Genregulationen der ANT-Isoformen durch intrinsische oder extrinsische Faktoren ist bislang wenig bekannt. Jang *et al.* demonstrierten, dass Interleukin-4 (IL-4) und Interferon- γ (IFN- γ) in humanen T-Zellen ANT3 aktivieren und die Induktion über intrazelluläre STAT-Signalwege erfolgt [38]. Für ANT1 wurde eine Regulation durch *Transforming Growth Factor beta 1* (TGF- β 1) in murinen Astrozyten und durch Interleukin-1 beta (IL-1 β) in humanen Beta-Zellen des Pankreas beschrieben [35,39].

1.1.4 Der ANT in kardialen Erkrankungen

Die Identifikation von ANT-spezifischen Autoantikörpern bei Patienten mit Myokarditis und dilatativer Kardiomyopathie führte zu den ersten Hinweisen, dass der ANT in Herzerkrankungen involviert ist. Die Autoantikörper werden gewebespezifisch gebildet und blockieren die ANT-Aktivität der kardialen Mitochondrien, die primär ANT1 exprimieren [40-42]. Darüber hinaus wurde beschrieben, dass Mutationen oder Dysfunktionen in der ANT1-Isoform zu schweren kardialen und muskulären Erkrankungen führen [43,44].

Eine Mutation im ANT1-Gen, die durch eine der fünf Punktmutationen (A89D, L98P, D104G, A114P und V289M) gekennzeichnet ist, löst bei Patienten eine autosomal dominante progressive externe Ophthalmoplegie aus. Das Krankheitsbild ist durch eine langsam verlaufende mitochondriale Myopathie charakterisiert, die vor allem die extraokularen Muskeln betrifft, aber auch zur Kardiomyopathie führt [43]. Muskelbiopsien von Patienten zeigten eine eingeschränkte oxidative Phosphorylierung und Deletionen in der mitochondrialen DNA (mtDNA).

Das Sengers-Syndrom, das eine autosomal rezessive Erkrankung darstellt, ist mit einer ANT1-Fehlfunktion assoziiert und durch einen angeborenen Herzdefekt charakterisiert [44].

Untersuchungen am Tiermodell bestätigten ebenfalls eine kardiale Dysfunktion durch ANT1-Mutation. Mäuse mit einem ANT1-*Knock-Out* entwickeln eine kardiale Hypertrophie, die mit einer eingeschränkten oxidativen Phosphorylierung, mitochondrialen Proliferation und Desorganisation der Muskelfasern assoziiert ist [45]. Ferner demonstrierten Esposito *et al.*, dass der ANT1-*Knock-Out* zu vermehrt mitochondrialem oxidativem Stress führt und zugleich Mutationen in mtDNA auftreten [46]. In der myokardialen Ischämie inhibieren Fettsäuren und peroxidative Modifikationen die ANT-Aktivität, wodurch die Atmungskettenfunktion gestört und Zelltod ausgelöst wird [47,48] (Kapitel 1.2.1 und 1.2.4).

1.1.5 Kardioprotektion durch ANT1

Eine unzureichende ANT1-Funktion führt, wie oben beschrieben, zu schweren kardialen Defekten. Diese sind mit einem gestörten Energiemetabolismus und vermindertem Energietransfer verbunden

[49]. Zudem entsteht oxidativer Stress, der Zelltod induziert und letztendlich eine kontraktile Dysfunktion fördert [32].

Umgekehrt wurde beschrieben, dass eine herzspezifische ANT1-Überexpression in Ratten bei Hypertonie-induzierter Hypertrophie die ANT-Transportkapazität steigert, den Energiemetabolismus stabilisiert, Zelltod verhindert und die kardiale Kontraktion fördert [50]. Eine stabile kardiale Funktion konnte auch in ANT1-überexprimierenden Mäusen beobachtet werden, die unter Typ 1-Diabetes mellitus litten [51].

Ätiologieübergreifend wurde in dieser Studie als Schwerpunkt analysiert, ob eine ANT1-Überexpression bei myokardialer Ischämie und Hypoxie kardioprotektiv wirkt. Die Ischämie ist durch eine Durchblutungsstörung des Herzens charakterisiert. Als Folge der Ischämie tritt Hypoxie auf, d.h. die Sauerstoffverfügbarkeit der Zellen sinkt. Dadurch wird der myokardiale Energiemetabolismus maßgeblich beeinträchtigt, es entsteht oxidativer Stress und Zelltod. In den folgenden Abschnitten werden diese intrazellulären Veränderungen in Bezug auf Ischämie und Hypoxie näher beschrieben.

1.2 Zelluläre Veränderungen bei Ischämie und Hypoxie

1.2.1 Myokardialer Energiemetabolismus

Zur Energiegewinnung metabolisieren die Zellen unter anderem Fettsäuren, Glukose und Laktat [52] (Abb. 1.3). Fettsäuren, die unter normoxischen Bedingungen die bevorzugten Substrate im Energiemetabolismus des Herzens darstellen [53,54], gelangen als Acylcarnitin in die mitochondriale Matrix und werden in der β -Oxidation zu Acetyl-CoA abgebaut.

Der Glukoseabbau in der zytosolischen Glykolyse führt zur Produktion von Pyruvat, das ebenfalls in der mitochondrialen Matrix zu Acetyl-CoA umgewandelt und anschließend in den Citratzyklus eingeschleust wird [55]. Die im Citratzyklus gebildeten Reduktionsäquivalente NADH und FADH₂ transferieren ihre Elektronen in der oxidativen Phosphorylierung auf die NADH-Q-Oxidoreduktase (CI) bzw. Succinat-Q-Oxidoreduktase (CII) der Atmungskette. Von dort gelangen die Elektronen auf Ubichinon (CoQ). Die Q-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase (CIII) katalysiert im Anschluss die Elektronenübertragung von CoQ auf Cytochrom *c* (Cyt *c*). Im letzten Schritt erfolgt die Reduktion von molekularem O₂ zu H₂O, mit Hilfe der Cytochrom-*c*-Oxidase (CIV). Der Elektronenfluss durch die Atmungskettenkomplexe CI, CIII und CIV erzeugt einen elektrochemischen Protonengradienten über der IMM. Die beim Abbau des Protonengradienten freiwerdende Energie wird im Anschluss von der ATP-Synthase (CV) zur Generierung von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat (P_i) genutzt. Über den Antiport-Mechanismus des ANT gelangt ADP in die mitochondriale Matrix und das produzierte ATP in den Intermembranraum. ATP wird dann über Porinporen (*Voltage-Dependent*

Anion Channel, VDAC) ins Zytosol transportiert und der Zelle zur Verfügung gestellt [23]. Somit ist der ANT eng mit der oxidativen Phosphorylierung gekoppelt und reguliert durch seine ADP/ATP-Austauschfunktion die Energieverfügbarkeit der Zelle [56].

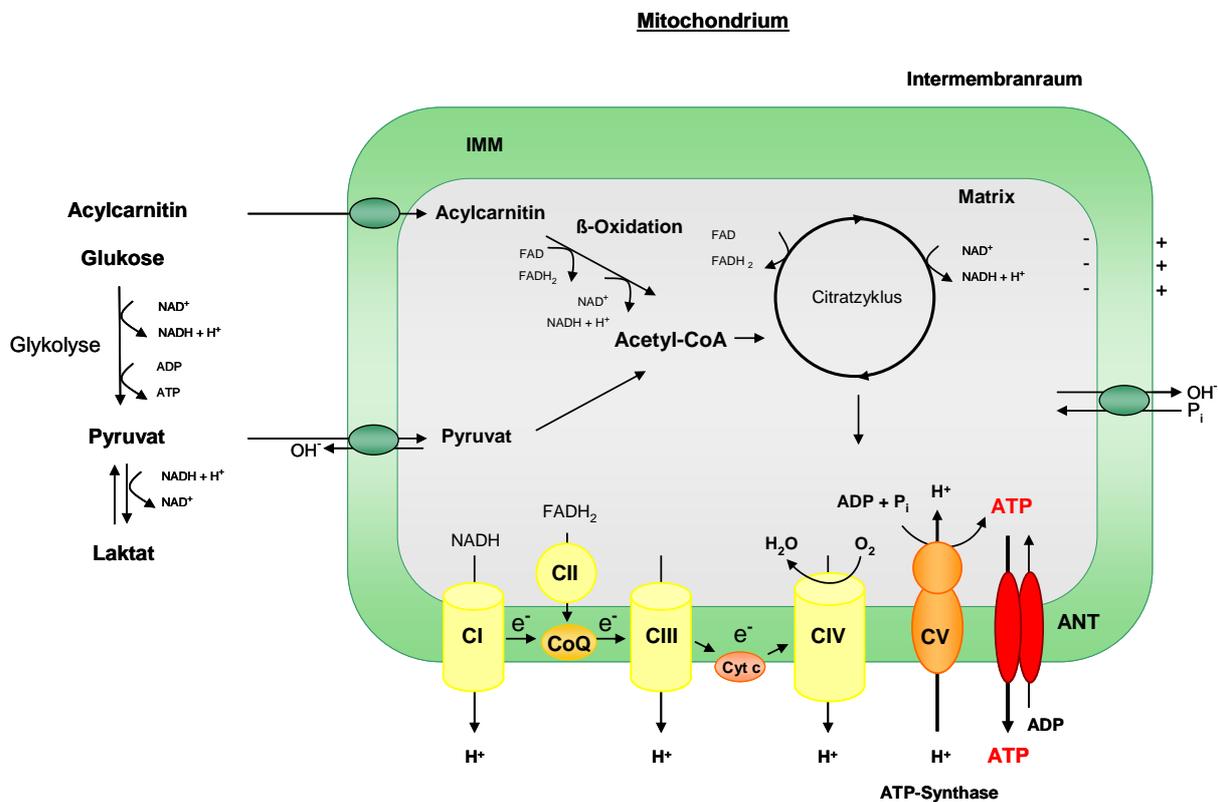


Abb. 1.3: Energiemetabolismus in Herzmuskelzellen. Fettsäuren passieren als Acylcarnitin die IMM und werden in der β -Oxidation abgebaut [57]. Pyruvat aus der Glykolyse wird unter hypoxischen Bedingungen zu Laktat reduziert bzw. aerob in der mitochondrialen Matrix über Acetyl-CoA in den Citratzyklus eingeschleust. Die entstehenden Reduktionsäquivalente NADH und FADH₂ transferieren ihre Elektronen (e⁻) auf CI und CII. Danach werden die e⁻ über CoQ auf CIII und Cyt c übertragen. An CIV erfolgt die Reduktion von O₂ zu H₂O. Der e⁻-Transport führt zur Bildung eines Protonengradienten (H⁺) über der IMM, der von CV zur Generierung von ATP genutzt wird. Der ANT transportiert ATP gegen ADP in den Intermembranraum (modifiziert nach Giordano [52]).

Bei Ischämie bzw. Hypoxie sind gravierende Veränderungen in der Zelle zu beobachten. Fettsäuren akkumulieren als Acylcarnitin oder toxischem Langketten-Acyl-CoA, da die β -Oxidation zum Erliegen kommt. Die Langketten-Acyl-CoA binden von beiden Seiten der IMM an den ANT und inhibieren diesen [58,59]. Die Inaktivierung des ANT verhindert den ADP/ATP-Austausch über die IMM, sodass ADP in der Matrix fehlt. Die ADP-Verarmung führt wiederum zur Inhibierung von CV, sodass die

ATP-Produktion stoppt und der Protonenfluss stagniert. Gleichzeitig wird der Elektronenfluss der Atmungskette verhindert, sodass diese an CI, CoQ, CIII und CIV akkumulieren und direkt auf Sauerstoff übertragen werden können [60,61]. Dabei werden toxische reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet, die oxidativen Stress induzieren und ebenfalls die Atmungskettenfunktion reduzieren. Bei Hypoxie wird die notwendige Energie zunehmend über die anaerobe Glykolyse gewonnen, die jedoch wesentlich weniger ATP liefert [62].

1.2.2 Entstehung und Auswirkungen von ROS

Wie oben beschrieben, entstehen ROS bei Hypoxie zunehmend durch Akkumulation von Elektronen in der oxidativen Phosphorylierung. Doch auch bei Normoxie entweichen stets Elektronen bei der Übertragung an CI und CIII und verursachen die Bildung von ROS (Elektronenleckage) [63-65]. Zu ROS gehören die freien Radikale und Nichtradikale wie Superoxidanionradikale ($O_2^{\cdot-}$), Hydroxylradikale ($\cdot OH$), Hydroxylanionen (OH^-) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) [66]. Darüber hinaus wird Stickstoffmonoxid (NO^{\cdot}) gebildet, das bei Hypoxie mit $O_2^{\cdot-}$ zu Peroxynitrit ($ONOO^-$) reagiert und nitrosativen Stress verursacht.

ROS sind einerseits für viele Abwehr- und Schutzmechanismen im Organismus essentiell, da sie zur Abtötung von Bakterien und Viren beitragen [67]. Andererseits können sie bei Überproduktion körpereigene Strukturen angreifen und Zellschädigungen verursachen. Durch Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren der Phospholipide, wird die Membranpermeabilität erhöht und Nekrose und Apoptose ausgelöst. Auch werden Proteine durch ROS modifiziert. Es kommt zur Ausbildung von intra- und intermolekularen Disulfidbrücken sowie zu Proteincarbonylierungen an den Aminosäuren Histidin, Prolin, Arginin und Lysin. Zusätzlich können durch Oxidation Proteine fragmentieren [68]. Bei den Nukleinsäuren treten durch ROS z.B. Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie Basenmodifikationen auf [69]. Diese Mutationen führen im mtDNA zur fehlerhaften Expression der Atmungskettenkomplexe, was zur Dysfunktion führt und als Rückkopplung die ROS-Produktion stärker induziert [70].

Oxidative Modifikationen beeinträchtigen ebenfalls die ANT-Aktivität. Studien von Girón-Calle *et al.* demonstrierten, dass kovalente Bindungen zwischen peroxidierten Phospholipiden und ANT zu Funktionsstörungen führen und die ANT-Degradation fördern [71]. Außerdem reduziert peroxidiertes Cardiolipin im Mitochondrium die ANT-Aktivität [72].

1.2.3 Das antioxidative Stress-System

Zum Schutz vor oxidativem Stress verfügen die Zellen über antioxidative Abwehrmechanismen, die nicht-enzymatisch oder enzymatisch wirken [73]. Zu den nicht-enzymatischen Antioxidantien gehören z.B. die Vitamine A, B₆, B₁₂, C und E sowie Selenium und Folsäure. Außerdem ist Glutathion (GSH)

essentiell, da die antioxidative Thiolgruppe zur Reduktion der freien Radikale beiträgt und GSH als Kofaktor der Glutathion-Peroxidase fungiert [69]. Die enzymatischen Antioxidantien bestehen aus den Superoxid-Dismutasen (SODs), der Katalase, Glutathion-Peroxidase und Glutathion-Reduktase [74]. Von besonderer Bedeutung sind die mitochondriale Mangan-SOD (MnSOD) und zytosolische Kupfer/Zink-abhängige SOD (Cu/ZnSOD), die die Umwandlung von toxischem $O_2^{\cdot-}$ zu H_2O_2 katalysieren. H_2O_2 wird im Anschluss von der Eisen-abhängigen Katalase zu O_2 und H_2O abgebaut [75-77].

1.2.4 Nekrose und Apoptose

Hypoxische Zellschädigungen und ROS münden zum großen Teil in unspezifische Zellnekrosen. Die Nekrose ist im Wesentlichen mit einem Kollaps der zellulären Homöostase und dem ATP-Verlust verbunden. ATP-abhängige Ionenkanäle der Zelle werden inaktiviert, wodurch Ca^{2+} - und Na^+ -Ionen im Zytosol akkumulieren [78]. Ca^{2+} -abhängige Enzyme, wie die Phospholipase A_2 und Phospholipase C sowie Endonukleasen verstärken ihre Aktivität, was zur erhöhten Lipiddegradation und DNA-Fragmentierung führt [79,80]. Unzureichende antioxidative Stressmechanismen und H_2O_2 steigern die ROS-Produktion [81]. Es folgt eine frühe Permeabilisierung der Zellmembran, woraufhin zytosolisches Material freigelassen und inflammatorische Reaktionen ausgelöst werden.

Neben der Nekrose, ist auch die Apoptose am Zelltod bei Hypoxie beteiligt. Die intrinsische Apoptose ist mit der Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-pore (MPTP) verbunden, die sich an Kontaktstellen zwischen der IMM und AMM bildet [82] (Abb. 1.4). Die endgültige Struktur der Pore ist bislang ungeklärt, wobei ANT und Cyclophilin D (CypD), das mit dem ANT interagiert, als gesicherte regulatorische Komponenten gelten [83-85]. Die Regulation der MPTP erfolgt über Proteine der Bcl-2-Familie, wie anti-apoptotischem Bcl-2 und Bcl- X_L sowie der pro-apoptotischen Proteine Bax, Bad und Bid, die im Zytosol interagieren, zum Mitochondrium translozieren und gleichgewichtsabhängig die Öffnung der MPTP regulieren [85]. Unabhängig davon können Bax- und Bak-Oligomere in die mitochondriale Membran eingebaut werden und eigene Poren bilden. In Bezug auf die MPTP interagiert Bax mit dem ANT und induziert die MPTP-Öffnung, während Bcl-2 die Bindung neutralisiert [86-88]. Die Porenöffnung wird außerdem durch ROS, erhöhte mitochondriale Ca^{2+} -Konzentrationen, ATP-Mangel und hohe P_i -Mengen induziert [89].

Bei Porenöffnung erhöht sich die Permeabilität der inneren mitochondrialen Membran, sodass Ca^{2+} und Wasser einströmen, die Mitochondrien anschwellen, das Membranpotential zusammenbricht und pro-apoptotische Faktoren wie Cyt *c* freigesetzt werden [90]. Cyt *c* löst über die Bildung eines Apoptosoms, bestehend aus Cyt *c*, der Caspase-9 und APAF-1 (Apoptose-Protease aktivierender Faktor 1), die Aktivierung der Effektorcaspasen-3/6/7 aus [91,92], die nachfolgend strukturelle Proteine wie Lamin und Aktin spalten [93]. Zudem werden DNA-Reparaturmechanismen (Poly(ADP-

ribose)-Polymerase; PARP) inaktiviert und Caspase-aktivierte DNAsen (CAD) aktiviert [94,95]. Auch translozieren die Endonuklease G (EndoG) und der Apoptose-induzierende Faktor (AIF) aus dem Intermembranraum in den Nukleus, wo sie zusammen mit CAD die DNA-Fragmentierung hervorrufen [96].

Im extrinsischen Apoptoseweg können so genannte Todesliganden (z.B. $TNF\alpha$) die Trimerisierung von Todesrezeptoren induzieren und über die Caspase-8 Effektorcaspasen-3/6/7 aktivieren. Diese steuern letztendlich den weiteren Apoptoseverlauf. Insgesamt ist die Nekrose durch passive, unspezifische Ereignisse charakterisiert, während die Apoptose ein energieabhängiger, aktiv regulierter Prozess ist [97].

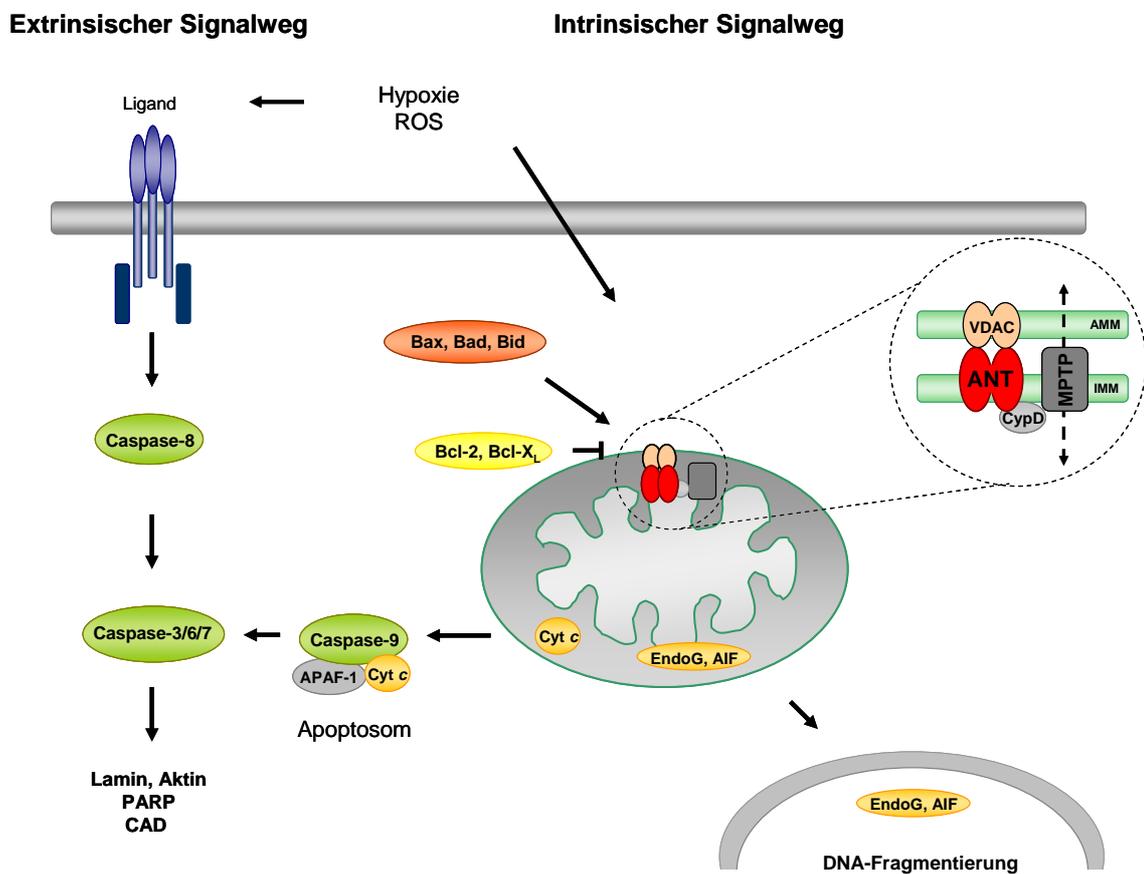


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des extrinsischen und intrinsischen Signalwegs der Apoptose.
 Genaue Beschreibung siehe Text (modifiziert nach Baines und Molkentin [96]).

1.2.5 Stressinduzierte Signalwege im Herzen

Um das Überleben der Zellen bei Hypoxie zu sichern, werden intrazelluläre Signalwege aktiviert, die die Zellprotektion fördern und Apoptose blockieren. Kardioprotektive Wirkungen werden insbesondere für die Wege der extrazellulär regulierten Kinasen 1 und 2 (ERK1/2) und der Proteinkinase B/Akt beschrieben [96,98,99].

Die ERK1/2-Kinasen gehören zur Familie der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK). Die Aktivierung dieser Kinasen erfolgt u.a. durch extrazelluläre Stimuli wie Hypoxie, ROS oder Zytokine, die Rezeptortyrosinkinasen (RTK) oder G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) in der Zellmembran stimulieren [100,101] (Abb. 1.5). Die anschließende Signalweiterleitung verläuft über ein dreistufiges Kaskadensystem, indem kleine G-Proteine zunächst Raf-Kinasen phosphorylieren, die daraufhin nachgeschaltete MEK1/2-Kinasen aktivieren [102]. Die MEK1/2-Kinasen phosphorylieren letztendlich ERK1/2 [103,104]. Die Aktivierung von Akt erfolgt ähnlich wie bei ERK1/2 über extrazelluläre Stimuli, die die Signale über RTK oder GPCR vermitteln. In der Zelle werden die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und Phosphoinosid-abhängige Kinase-1 (PDK-1) aktiviert, die letztendlich Akt phosphorylieren [105].

Die aktivierten Kinasen ERK1/2 und Akt wirken direkt anti-apoptotisch, indem sie pro-apoptotische Faktoren wie Bad und Caspase-9 phosphorylieren. Die Phosphorylierung von Bad bewirkt eine Dissoziation von Bcl-X_L, das daraufhin mit aktiviertem Bcl-2 die Öffnung der MPTP verhindert. Die Phosphorylierung der Caspase-9 hemmt die weitere Caspase-Kaskade-Aktivierung und Apoptose-Induktion [100,106,107]. Überdies können ERK1/2 und Akt zum Zellkern translozieren und Transkriptions- und Translationsfaktoren stimulieren, die das Zellüberleben sichern. Ein Beispiel ist der Hypoxie-induzierbare Faktor-1 alpha (HIF-1 α) [108-110], der als Heterodimer mit HIF-1 β Gene anschaltet, die bei Hypoxie die Sauerstoffverfügbarkeit verbessern [111].

Neben ERK1/2 und Akt bilden die hoch konservierten Proteine der Hsp90-Familie zentrale Komponenten im zellprotektiven Mechanismus [112]. Hsp90 fungiert als molekulares Chaperon, das bei Induktion die Protein-Assemblierung, Faltung und Translokation von Proteinen fördert, wozu auch der ANT gehört [113,114]. Die Hsp90-Proteine sind außerdem essentielle Bestandteile von intrazellulären Signaltransduktionswegen, da sie mit Kinasen wie Akt, MEK1/2 und Raf interagieren, die dadurch stabilisiert und aktiviert werden [115-117].

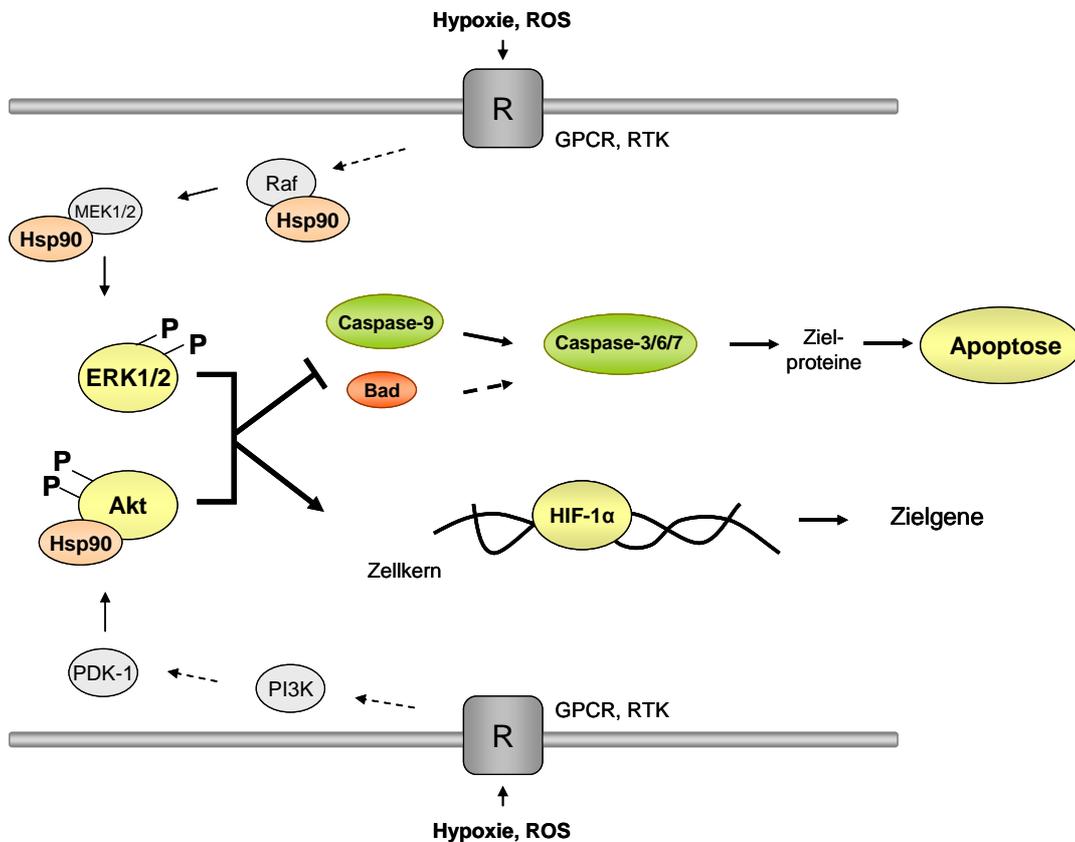


Abb. 1.5: Aktivierung der intrazellulären Signalwege ERK1/2 und Akt zum Schutz vor Apoptose.

Durch extrazelluläre Stimuli (Hypoxie, ROS) werden Rezeptoren (R) wie GPCRs oder RTKs auf der Plasmamembran aktiviert, die die Signale an intrazelluläre Kinasen weiterleiten. Über Phosphorylierungen werden die Kinasen Raf und MEK1/2 bzw. die PI3K und PDK-1 aktiviert, die letztendlich ERK1/2 bzw. Akt phosphorylieren. Diese hemmen Bad und die Caspase-9 und verhindern somit die weitere Caspase-Kaskade-Aktivierung und Apoptose. Durch die Aktivierung von HIF-1 α werden zudem überlebenswichtige Gene im Zellkern angeschaltet. Hsp90 stabilisiert als Chaperon essentielle Kinasen der Signalwege. \longrightarrow direkte Aktivierung, $\cdots\cdots\longrightarrow$ indirekte Aktivierung, \dashv direkte Hemmung.

Insgesamt lösen Hypoxie bzw. Ischämie diverse zelluläre Veränderungen aus. Zu diesen Veränderungen zählen ein gestörter Energiemetabolismus mit reduzierter ANT-Aktivität, die Entstehung von ROS, Nekrose und Apoptose, sowie die Aktivierung von intrazellulären Signalwegen. Der ANT1 kann als Regulator des Energiemetabolismus und der Apoptose entscheidend in diese Prozesse eingreifen. Neben der Kardioprotektion stellte sich die Frage, ob der ANT1 auch unter basalen Bedingungen Veränderungen im Herzen hervorruft und insbesondere den kontraktilen Mechanismus beeinflusst.

1.3 Kontraktiler Mechanismus des Herzens

Bei der Initiation der Kontraktion führt eine elektrische Erregung der zellulären Plasmamembran zur Depolarisation, woraufhin sich spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle (Dihydropyridin-Rezeptoren; DHPR) öffnen und einen geringen Ca^{2+} -Einstrom auslösen (Abb. 1.6). Die Ca^{2+} -Ionen diffundieren über eine kurze Entfernung zum Ryanodin-Rezeptor 2 (RyR2) des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) und bewirken eine Öffnung des intrazellulären Ca^{2+} -Kanals, was einen massiven Ca^{2+} -Einstrom von 0,1 auf 1 μM in die Zelle zur Folge hat [118].

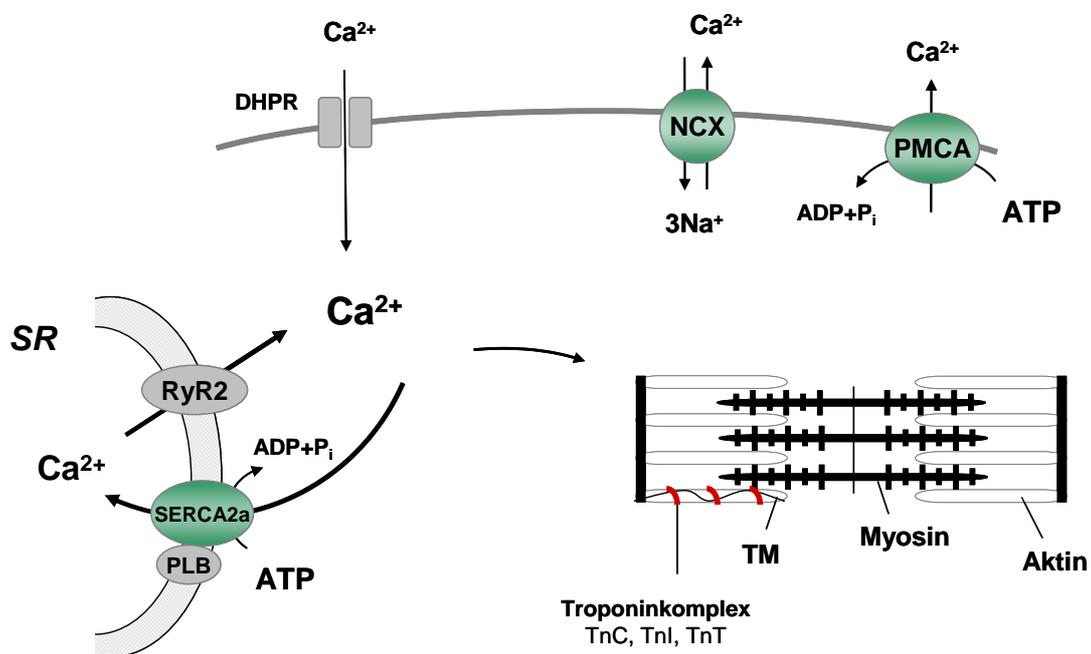


Abb. 1.6: Kontraktiler Mechanismus im Myokard.

Eine Depolarisation der Plasmamembran führt zur Öffnung von spannungsgesteuerten DHPR, die einen geringen Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle verursachen. Die Ca^{2+} -Ionen führen zur Aktivierung von RyR2 des SRs, die einen massiven Ca^{2+} -Einstrom ins Zytosol ermöglichen. Ca^{2+} bindet an die TnC, das daraufhin über Umlagerungen von TnI, TnT und TM die Bindestellen für Myosin am Aktin freilegt und die Kontraktion ermöglicht. Der Ca^{2+} -Rücktransport durch die PMCA, den NCX und insbesondere SERCA2a führt zur Relaxation. PLB fungiert als inhibitorisches Protein der SERCA2a (modifiziert nach Bers [118]).

Ca^{2+} bindet an Troponin C (TnC), was eine Umlagerung von Troponin I (TnI) und anschließende Konformationsänderung des tropomyosinbindenden Troponin T (TnT) hervorruft. Tropomyosin (TM) wird verschoben, sodass die Bindestellen am Aktin für Myosin freigegeben werden und den

Querbrückenzyklus und somit die Kontraktion ermöglichen [119,120]. Unter fortwährender ATP-Hydrolyse wird der Querbrückenzyklus repetitiv durchlaufen. Am Ende eines vollständigen Kontraktionszyklusses erfolgt die Relaxation, die durch eine rasche Reduktion der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration charakterisiert ist [121]. An diesem Prozess sind die Ca^{2+} -ATPasen des SRs (SERCA) und der Plasmamembran (PMCA) sowie der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) beteiligt. Während der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher und die PMCA nur geringe Mengen Ca^{2+} aus dem Zytosol exportieren, weist SERCA eine sehr hohe Ca^{2+} -Bindungsaffinität auf [122,123] und transportiert entgegen dem intrazellulären Gradienten Ca^{2+} unter ATP-Verbrauch zurück in das SR, sodass für die nächste Kontraktion ausreichend freies Ca^{2+} zur Verfügung steht [124,125]. SERCA bildet die zentrale Determinante muskulärer Kontraktilität und bestimmt die Relaxationsgeschwindigkeit der Myozyte [125-127]. Von SERCA sind bislang fünf Isoformen identifiziert worden, wobei SERCA2a die vorherrschende Isoform in Herzmuskelzellen darstellt [121]. Die Regulation der SERCA2a-Aktivität erfolgt über Phospholamban (PLB), das in dephosphorylierter Form SERCA2a bindet und die Ca^{2+} -Affinität reduziert [128]. Die Aktivität der Ca^{2+} -ATPasen und des kontraktilen Myosins sind streng ATP-abhängig. Der ANT1, der als Regulator für die intrazelluläre Energieversorgung im Herzen verantwortlich ist, könnte diese Prozesse entscheidend beeinflussen.

1.4 Zielsetzung

Zur Aufrechterhaltung der kontraktilen Funktion benötigt das Herz große Mengen an ATP, die in der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung produziert werden. Der ANT vermittelt den Austausch von ATP und ADP über der IMM und fungiert zudem als Regulator der oxidativen Phosphorylierung. Die myokardiale Ischämie und Hypoxie sind mit einer eingeschränkten oxidativen Phosphorylierung und ANT-Aktivität verbunden. Diese Schädigungen führen zum ATP-Mangel und zur Bildung von ROS, die Nekrose und Apoptose auslösen. Deshalb ist es von zentraler Bedeutung den ANT zu stabilisieren, um die Zellschädigungen zu reduzieren und Kardioprotektion zu fördern.

Studien unserer Arbeitsgruppe lieferten bereits erste Hinweise auf Kardioprotektion durch eine spezifische ANT1-Überexpression bei Hypertonie-induzierter Hypertrophie in transgenen Rattenherzen (ANT1-Ratten) [50] (Kapitel 1.1.5). Anhand dieser Vorarbeiten sollte nun untersucht werden, ob diese ANT1-Überexpression auch bei Hypoxie bzw. Ischämie kardioprotektiv wirkt und ein krankheitsübergreifendes Phänomen darstellt. Die intrazellulären Prozesse wurden in isolierten WT- und ANT1-transgenen neonatalen Rattenkardiomyozyten (ANT1-NRCM) analysiert. Die NRCM können im Vergleich zu adulten Rattenkardiomyozyten (ARCM) lange Zeit unter hypoxischen Bedingungen kultiviert werden und sind daher für Untersuchungen bei akuter Hypoxie (24 h) und chronischer Hypoxie (48 h) sehr gut geeignet (Kapitel 2.3.1.1). Die *in vivo* Experimente bei Ischämie wurden an WT- und ANT1-Ratten durchgeführt.

Die ANT1-Überexpression führte bei Hypertonie-induzierter Hypertrophie außerdem zur Stabilisierung der Myozytenstruktur und -funktion [50]. Daher war von besonderem Interesse, ob die ANT1-Überexpression schon unter basalen Bedingungen die Myozytenstruktur und das kontraktile System beeinflusst. Dazu wurde im zweiten Teil der Arbeit die Morphologie von ANT1-ARCM und die Expression der kontraktilen Proteine sowie der Ca^{2+} -ATPasen in ANT1-Ratten analysiert, die für die Kontraktion der Myozyten verantwortlich sind. Zusätzlich wurden entscheidende Parameter zur Bestimmung der Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit an isolierten ARCM gemessen. Isolierte ARCM sind von ihrer Zellgröße, Struktur und dem Metabolismus Zellen im Herzgewebe am ähnlichsten [129-131] und stellen für diese Untersuchungen das am besten geeignete Zellsystem dar.

Über die Genregulation des ANT1 ist bislang wenig bekannt. Im letzten Teil der Studie sollten Substanzen identifiziert werden, die die ANT1-Transkription regulieren und im Hinblick auf therapeutische Maßnahmen kardioprotektiv wirken.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Die Laborchemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma-Aldrich (München), Carl Roth (Karlsruhe) und Merck (Darmstadt) bezogen.

Tab. 2.1: Chemikalien und deren Bezugsquelle

Produkt	Hersteller
2, 4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH)	Sigma-Aldrich, München
2', 7'-Dichlorofluorescein-Diacetat (DCFH-DA)	Sigma-Aldrich, München
3-Amino-1,2,4-Triazol	Sigma-Aldrich, München
Agarose	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Ampicillin	Sigma-Aldrich, München
Bacto Agar, <i>Noble</i>	DIFCO Laboratories, Lawrence/USA
Braunol	Braun, Melsungen
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, München
Buprenorphin	Reckitt Benckiser/GB
<i>Cell Lysis Buffer</i> (10×)	Cell Signaling, Boston/USA
Claycomb-Medium	Sigma-Aldrich, München
<i>Complete Mini</i> Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche Applied Science
Coomassie-Blau (<i>Coomassie</i> [®] <i>Brilliant Blue</i> R-250)	Sigma-Aldrich, München
Diethylether	Roth, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser, RNase-frei	USB Corporation, Cleveland/USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, München
DMEM, <i>Low Glucose</i>	GIBCO/Invitrogen, Darmstadt
dNTP Mix	ABgene, Epsom/UK

Dulbecco's <i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS, ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	PAA, Pasching/A
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Fibronektin, 0,1% Lösung	Sigma-Aldrich, München
Formalin, 10% Lösung	Sigma-Aldrich, München
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching/A
Fötale Rinderserum (FBS)	Sigma-Aldrich, München
Fötale Rinderserum <i>Gold</i> (FBS Gold)	PAA, Pasching/A
FUDR (5-Fluoro-2'-desoxyuridine)	Sigma-Aldrich, München
Gelatine	Sigma-Aldrich, München
Glycerin	Sigma-Aldrich, München
<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> (HBSS)	GIBCO/Invitrogen, Darmstadt
Histidin	Sigma-Aldrich, München
Ionophore A23187	Sigma-Aldrich, München
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
Ketamin	Ratiopharm, Ulm
Laurylsulfat	Sigma-Aldrich, München
LB Broth, Miller	BD/Difco™, Sparks/USA
L-Glutamin	GIBCO/Invitrogen, Darmstadt
Lipofektamin™2000	Invitrogen, Darmstadt
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Medium 199 mit <i>Earl's Salts</i>	Biochrom, Berlin
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt
Norepinephrine (+)-bitartrate salt	Sigma-Aldrich, München
NuPAGE® LDS <i>Sample Buffer</i>	Invitrogen, Darmstadt
NuPAGE® MES/MOPS SDS <i>Running Buffer</i>	Invitrogen, Darmstadt
NuPAGE® <i>Transfer Buffer</i>	Invitrogen, Darmstadt
Opti-Mem®I	Invitrogen, Darmstadt

Penicillin (Kultivierung der ARCM)	Invitrogen, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin (Kultivierung der ARCM)	Invitrogen, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin (Kultivierung der NRCM)	Biochrom AG, Berlin
Penicillin-Streptomycin (100×) (Kultivierung der HL-1-Zellen)	GIBCO/Invitrogen, Darmstadt
peqGOLD 1 kb DNA-Leiter	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
peqGOLD 100 bp DNA-Leiter Plus	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pferdeserum (<i>Donor Horse Serum</i>)	Biochrom AG, Berlin
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, München
<i>PhosStop</i> Phosphatase-Inhibitor-Cocktail	Roche, Mannheim
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich, München
QIAzol [®]	Invitrogen, Darmstadt
Random Hexamers	Promega, Mannheim
RNase Away	Fisher Scientific, Schwerte
RNasin RNase-Inhibitor Gold	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Rutheniumrot	Sigma-Aldrich, München
<i>SeeBlue</i> Plus II Standard	Invitrogen, Darmstadt
Streptomycin (Kultivierung der ARCM)	Invitrogen, Darmstadt
Streptomycinsulfat	Sigma-Aldrich, München
Sucrose	Sigma-Aldrich, München
Szintillationsflüssigkeit (Irgasafe Plus)	Zinsser Analytic, Frankfurt
Tris (<i>Trizma</i> [®] Base)	Sigma-Aldrich, München
Tris-(2-Carboxyethyl)-phosphine-Hydrochlorid (TCEP×HCL)	Thermo Scientific, Erembodegem/B
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München
Trypan-Blau-Lösung (0,4%)	Sigma-Aldrich, München
Trypsin-Inhibitor, <i>Soybean</i>	Life Technologies, Darmstadt
Tween [®] 20	Merck, Darmstadt

Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth, Karlsruhe
Xylazin	Bayer, Leverkusen
Zytokine: IL-1 β , IFN γ , IL-4, IFN- β , TNF α , IL-6 TGF- β 1, TNF β	Immuno Tools, Friesoythe R&D Systems, Wiesbaden

2.1.2 Puffer und Stammlösungen

Die Puffer und Stammlösungen wurden je nach Bedarf mit bidestilliertem (bidest.) oder sterilem Wasser angesetzt.

Tab. 2.2: Puffer und Stammlösungen

Puffer/Stammlösung	Zusammensetzung
Ampicillin-Stammlösung	20 mg/ml wurden in sterilem Wasser gelöst, sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20 °C gelagert
ATP-Puffer	100 mM Tris, 4 mM EDTA-Na, pH 7,75
Blockpuffer für Immunfärbungen	5% Magermilchpulver bzw. BSA (w/v) in 1 \times TBS mit 0,1% Tween [®] 20
Ca ²⁺ -Reaktionspuffer	40 mM Imidazol (pH 7,0), 100 mM KCl, 5 mM MgCl ₂ , 5 mM Tris-ATP, 6 mM Phosphokreatin, 10 mM K-Oxalat, 0,2 mM EGTA, 10 mM NaN ₃ , 2 μ M synthetisches Protein Kinase A Inhibitor Peptid [PKI(6-22)amid] und jeweils 0,35 μ M oder 3,68 μ M freies ⁴⁵ CaCl ₂ (1,9 \times 10 ¹¹ Bq/mol)
Coomassie-Blau-Entfärbelösung	10% Essigsäure und 30% Ethanol
Coomassie-Blau-Färbelösung	0,2% Coomassie-Blau (w/v), 10% Essigsäure und 30% Methanol
DNA-Ladepuffer	50% Glycerin (v/v) und 0,1% Bromphenolblau (w/v) in sterilem Wasser
FUDR-Stammlösung	2 mM FUDR in sterilem Wasser
Guanidinhydrochlorid-Lösung	6 M Guanidinhydrochlorid, 20 mM KH ₂ PO ₄ , pH 2,3 mit HCl einstellen

Homogenisationspuffer	50 mM KH ₂ PO ₄ , 15 mM NaF, 1 mM EDTA, 250 mM Sucrose, 0,3 mM PMSF, 0,5 mM DTT, 10 mM Histidin, 1/100 Vol Protease-Inhibitor Cocktail, pH 7,4
Katalase-Puffer	50 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,0 und 0,036% (w/w) H ₂ O ₂ , die Absorption des Puffers muss zwischen 0,520 und 0,550 liegen
Laufpuffer	50 ml 20×NuPAGE [®] MES/MOPS SDS <i>Running Buffer</i> in 1 l Wasser bidest.
Proteinase K	10 mg/ml Proteinase K in 50mM Tris-HCl pH 8,0 und 10 mM CaCl ₂
Proteincarbonylierungs-Puffer	50 mM KH ₂ PO ₄ , 0,5% Triton X-100, 1 mM EDTA, 40 µg/ml PMSF gelöst in Ethanol und 1/100 Vol Protease-Inhibitor Cocktail, pH 7,4 mit KOH einstellen
Protein-Probenpuffer (2×)	50% NuPAGE LDS Sample Buffer (4×) und 10% 1 M DTT in Wasser bidest.
RNaseA-Stammlösung	4 mg/ml RNaseA in sterilem Wasser
Streptomycin-Lösung	10% Streptomycinsulfat in Proteincarbonylierungs-Puffer
<i>Stripping</i> -Puffer	15 g Glycin, 1% SDS, 0,001% Tween [®] 20, pH 3,2 in 1 l Wasser bidest.
TBS (10×)	0,5 mM Tris, 1,38 M NaCl und 27 mM KCl, pH 7,4
TBST	1×TBS und 0,1% Tween [®] 20
TCEP×HCl-Lösung	10 mM TCEP×HCl in Methanol
Transferpuffer	50 ml NuPAGE [®] <i>Transfer Buffer</i> und 20% Methanol in 1 l Wasser bidest.
Tris-Acetat (TAE) -Puffer (50×)	2 M Tris, 5,7% Essigsäure und 50 mM EDTA, pH 8,3
Zellysepuffer	100 µl <i>Cell Lysis Buffer</i> (10×), 100 µl <i>PhosStop</i> Phosphatase-Inhibitor (10×), 100 µl <i>Complete Mini</i> Protease-Inhibitor (10×) in 1 ml Wasser bidest.

Zytokine-Stammlösung	Zytokine wurden konzentrationsabhängig in sterilem Wasser gelöst, sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.
----------------------	---

2.1.3 Kommerzielle Test-Systeme

Die in der Arbeit zum Einsatz gekommenen Reaktionssysteme (Kits) wurden nach Herstellerangaben verwendet.

Tab. 2.3: verwendete Kits

Produkt	Hersteller
AlmarBlue® Cell Viability Reagenz	Invitrogen, Darmstadt
Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay	Promega, Mannheim
ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II	Roche, Mannheim
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford/USA
CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay	Promega, Mannheim
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega, Mannheim
E.Z.N.A® Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
High Pure PCR Cleanup Micro Kit	Roche, Mannheim
High Pure PCR Template Preparation Kit	Roche, Mannheim
<i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit, AP	Roche, Mannheim
PeroXOquant™ Quantitative Peroxide Assay Kits	Thermo Scientific, Erembodegem/B
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Rodeo ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham, München

2.1.4 Enzyme

Die Enzyme und entsprechenden Puffer wurden nach Herstellerangaben verwendet.

Tab. 2.4: Enzyme

Enzym	Hersteller
<i>AatII</i>	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
Alkalische Phosphatase, <i>Calf Intestinal</i> (CIP)	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
Ampli <i>Taq</i> DNA-Polymerase	Applied Biosystems, Darmstadt
<i>BamHI</i>	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
DNA-Polymerase I, <i>Large (Klenow) Fragment</i>	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
Kollagenase Typ 2 (230 Units/mg) (Isolierung der NRCM)	Worthington, Lakewood NJ/USA
Kollagenase Typ CLS II (Isolierung der ARCM)	Biochrom, Berlin
<i>KpnI</i>	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
MMLV Reverse Transkriptase	Invitrogen, Darmstadt
<i>NotI</i>	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
peqGold DNase I	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Platinum [®] <i>Taq</i> DNA-Polymerase, <i>High Fidelity</i>	Invitrogen, Darmstadt
Proteinase K	Roche, Mannheim
RNaseA	Serva, Heidelberg
<i>SalI</i>	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
TaqMan Universal PCR MasterMix UNG	Applied Biosystems, Darmstadt
Trypsin/EDTA (1:250) (Isolierung der NRCM)	GIBCO/Invitrogen, Darmstadt
Trypsin-EDTA (0,5%) (Kultivierung der HL-1-Zellen)	GIBCO/Invitrogen, Darmstadt

2.1.5 Antikörper

Die Antikörper wurden zur Verwendung in der Immunfärbung mit Puffer aus 5% Milchpulver bzw. 5% BSA in TBST angesetzt.

Tab. 2.5: Primärantikörper

Antikörper	Hersteller
Akt	Cell Signaling, Boston/USA
Aktin (C-2)	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Heidelberg
Anti-ANT	Antiserum, von Dr. Andrea Dörner zur Verfügung gestellt
Anti-Calcium channel L-type DHPR alpha 2 subunit [20A]	Abcam, Cambridge/UK
Anti-Calcium Pump pan PMCA ATPase [5F10]	Abcam, Cambridge/UK
Anti-heavy chain cardiac Myosin [3-48]	Abcam, Cambridge/UK
Anti-Hif1 alpha [H1alpha67]	Abcam, Cambridge/UK
Anti-Myosin (skeletal, slow), clon NOQ7.C.AD	Sigma-Aldrich, München
Anti-Phospholamban, clon A1	Millipore, Hamburg
Anti-Ryanodine Receptor (C3-33)	Calbiochem, Darmstadt
Anti-Superoxide Dismutase 2	Abcam, Cambridge/UK
Calsequestrin 2 (H-60)	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Heidelberg
Catalase	Novus, Cambridge/UK
Hsp90 α/β (F-8)	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Heidelberg
Ms \times GAPDH	Millipore, Hamburg
Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger	Swant, Bellizona, CH
p44/42 MAPK (ERK1/2)	Cell Signaling, Boston/USA
Phospho-Akt, Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (PathScan [®] Multiplex Western Cocktail I)	Cell Signaling, Boston/USA
SERCA2a	Antiserum, Schenkung von Dr. W. Dillmann, San Diego/USA
Troponin I (FL-210)	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Heidelberg

Tab. 2.6: Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-Mouse IgG HRP-Konjugat	Dako, Glostrup/DK
Anti-Rabbit IgG HRP-Konjugat	Dako, Glostrup/DK

2.1.6 Nukleinsäuren

2.1.6.1 Sequenzen der synthetischen Oligonukleotide

Die synthetischen Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma TibMolbiol (Berlin) bezogen und in DNA- und RNA-freiem sterilem Wasser gelöst.

Tab. 2.7: Genotypisierung der ANT1-Ratte

Primerbezeichnung	Nukleotidsequenz
ANT1 35-F (ANT1-PCR)	5'- GGA TGA TGA TGC AGT CTG G-3'
M A5 10-F (Mas-PCR)	5'- GTA CAG CTT CGA AGA ATG GCA GGC CC-3'
MAS 11-R (Mas-PCR)	5'- CTG GTT CCT CTG CTT CCG GAT GAG G-3'
POBGH3-R (ANT1-PCR)	5'- TAG AAG GCA CAG TCG AGG-3'

Tab. 2.8: Amplifizierung des ANT1-Promotors

Primerbezeichnung	Nukleotidsequenz
ANT1(2,5 <i>AatII</i>)-F	5'- CCC GAC GTC CAT CCC TGC AGA AAT CGT GT-3'
ANT1(2,5 <i>KpnI</i>)-R	5'- CCC GGT ACC TAC TAG AGC AGA GGT CAC TGG-3'
ANT1(<i>BamHI</i>)-R	5'- TAC TCA GGA TCC GCT GAA AGC CGG GCG CAC AC-3
ANT1(<i>KpnI</i>)-F	5'- TAC TCA GGT ACC GTC TTT AGG CTC TGA GCG AC-3'

Tab. 2.9: TaqMan™ Sonden

TaqMan™ Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Darmstadt)

mRNA	Assay
ANT1 (Ratte)	Rn00821477_g1
HPRT (Maus)	Mm00446968_m1

2.1.6.2 DNA-Template

Die genomische Maus-DNA (C57BL/6 Mausstamm) wurde von Dr. L. Ebermann für PCRs als DNA-Template zur Verfügung gestellt [24].

2.1.7 Plasmide

Tab. 2.10: verwendete Plasmide

Plasmide	Hersteller
pAd5TetO ₇ [HRE]AFP-luc	zur Verfügung gestellt von Dr. H. Fechner
pANT1Pro ^{1,5} -Luc	diese Arbeit
pANT1Pro ⁴ -Luc	diese Arbeit
pCR [®] 4-TOPO [®]	TOPO TA Cloning Kit [®] for Sequencing, Invitrogen
pEGFP-c1	zur Verfügung gestellt von Dr. H. Fechner
phRL-TK <i>Renilla</i> -Plasmid	zur Verfügung gestellt von Dr. H. Fechner
pLuc	diese Arbeit

2.1.8 Zelllinien und Medien

Tab. 2.11: Zelllinien und zu deren Isolation verwendete Medien und Lösungen

Zelllinie	Medium
ARCM (Primäre adulte Rattenkardiomyozyten)	<p>Powell-Medium (Carbogen[®] begast): 110 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 11 mM Glukose, 2,6 mM KCl, 1,2 mM KH₂PO₄ und 1,2 mM Mg₂SO₄×H₂O</p> <p>Kollagenase-Lösung: 20 mg Kollagenase Typ CLS II und 25 µM CaCl₂ in 50 ml Powell-Medium</p> <p>Medium zum Beschichten der Platten: CCT-Medium, 4% FCS</p> <p>CCT-Medium: Medium 199 mit <i>Earl's Salts</i>, 2 mM L-Karnitin, 5 mM Taurin, 5 mM Kreatin, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin and 10 µM Cytosin-β-D-Arabinofuranosid, pH 7,4</p> <p>Medium zum Ausplattieren: CCT-Medium, 0,1% Gentamycin, 2% Penicillin/Streptomycin</p>
HL-1-Zellen	<p>Claycomb-Medium: Claycomb-Medium, 10% FBS bzw. 2% FBS, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin (100×), 0,1 mM Norepinephrin (+)-Bitartratsalz und 2 mM L-Glutamin</p> <p>Fibronektin/Gelatine-Beschichtung: 2,5 µg/ml Fibronektin in 0,02% Gelatine</p> <p>Trypsin-Lösung: 1 ml Trypsin/EDTA in 10 ml sterilem H₂O</p> <p>Trypsin-Inhibitor: 25 mg Trypsin-Inhibitor, <i>Soybean</i> in 100 ml PBS, sterilfiltrieren</p> <p>Waschmedium: Claycomb-Medium, 5% FBS, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin (100×)</p>
NRCM (Primäre neonatale Rattenkardiomyozyten)	<p>Trypsin-Lösung: 15 mg Trypsin/EDTA in 25 ml HBSS</p> <p>Kollagenase-Lösung: 50 mg Kollagenase Typ 2 in 50 ml HBSS, sterilfiltrieren</p> <p>Fibroblasten-Medium: DMEM <i>low Glucose</i>, 20% FBS Gold, 1% Penicillin/Streptomycin</p> <p>NRCM-Medium: DMEM <i>low glucose</i>, 10% FBS Gold, 10% Pferdeserum, 1% Penicillin/Streptomycin und 2 µM FUDR</p>

	<p>NRCM-Medium ohne Serum: DMEM <i>Low Glucose</i>, 1% Penicillin/ Streptomycin und 2 μM FUDR</p> <p>Medium zum Beschichten der Platten: DMEM <i>Low Glucose</i>, 4% FBS Gold</p>
--	--

2.1.9 Bakterienstämme und Medien

2.1.9.1 Bakterienstämme

Die *Escherichia coli* (*E. coli*) - Stämme wurden zur Vermehrung und Klonierung von Plasmid-DNA eingesetzt.

Tab. 2.12: Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Hersteller
<i>E.coli</i> -TOP10	F { <i>lacIq Tn10</i> (TetR)} <i>mcrA</i> (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) F80 <i>lacZM15 lacX74 recA1 deoR araD139 (araleu) 7697 galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen, Mannheim
<i>E.coli</i> -XL-10-Gold	TetR Δ (<i>mcrA</i>)183 Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> Hte [F' <i>proAB lacIqZΔM15 Tn10</i> (TetR) Amy CamR]	Stratagene, La Jolla/USA

2.1.9.2 Nährmedien

Die verwendeten Nährmedien zur Anzucht von Bakterienkulturen wurden in Wasser bidest. angesetzt und im Autoklaven für 20 min sterilisiert. Um eine permanente Selektion sicherzustellen, wurde den Kulturmedien ein Antibiotikum (Ampicillin) beigefügt.

Tab. 2.13: Nährmedien zur Anzucht von Bakterienkulturen

Nährmedium	Zusammensetzung
LB-Agarplatte	25 g/l LB Broth, Miller und 15 g/l Bacto Agar in Wasser bidest. lösen und autoklavieren

LB-Agarplatte mit Ampicillin (LB/Amp-Platte)	25 g/l LB Broth, Miller und 15 g/l Bacto Agar in Wasser bidest. lösen, autoklavieren und 100 µg/ml Ampicillin zugeben
LB-Medium	25 g/l LB Broth, Miller in Wasser bidest. lösen und autoklavieren
LB-Medium mit Ampicillin (LB/Amp-Medium)	25 g/l LB Broth, Miller in Wasser bidest. lösen, autoklavieren und 100 µg/ml Ampicillin zugeben

2.1.10 Gebrauchswaren

Gebrauchswaren, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von handelsüblichen Firmen wie Eppendorf (Hamburg), BD Falcon (Heidelberg) und VWR International (Darmstadt) bezogen.

Tab. 2.14: Gebrauchswaren und deren Hersteller

Produkt	Hersteller
2,0 Prolene®-Faden, 7,0 Prolene®-Faden	Ethicon, Norderstedt
Braunüle 18 G	Braun, Melsungen
Feather Disposable Scalpel No 11, No 21	PfmMedical, Köln
ImmunBlot PVDF Membran	Bio-Rad Laboratories, München
MicroAmp 96well Optical Reaction Plate	Applied Biosystems, Darmstadt
Mullkompressen, steril	Fuhrmann Verbandstoffe, Much
NuPAGE® Novex Bis-Tris Gel 4-12%	Invitrogen, Darmstadt
Sterilfilter PharmAssure® 0,2µm	Pall GmbH, Dreieich
Whatman-Papier	GE Healthcare, München
Zellkulturflaschen	BD Biosciences, Heidelberg
Zellkulturplatten	BD Biosciences, Heidelberg
Zellkulturschalen	BD Biosciences, Heidelberg
Zellschaber	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen/CH
Zellulosemembranfilter ME 25 (0,45 µm)	Schleicher & Schuell, Dassel

2.1.11 Sonstige Materialien und Geräte

Tab. 2.15: verwendete Materialien und Geräte

Produkt	Hersteller
Beatmungsmaschine	Harvard Apparatus, Massachusetts/USA
Brinkmann Polytron PT 3000	Kinematica AG, Luzern/CH
CO ₂ -Inkubator CB 150	Binder, Tuttlingen
Dynabeads [®] Mx1 Mixer	Invitrogen, Darmstadt
Feinpinzette Dumont #5-45 Forceps [“]	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Feinschere „Iris Scissors 11,5 cm [“]	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Flourometer „Spektra Max Gemini [“]	Molecular Devices, Sunnyvale/USA
Fluoreszenz-Digitalmikroskop (CCD (<i>Charge-Coupled-Device</i>)-Kamera), BZ Analyzer 2008, BZ Observation 2008	KEYENCE, Essen
Gelelektrophoresekammer	OWL Separation Systems, Nottingham/UK
Genesys 6 UV-Spektrometer	Thermo Electron, Waltham/USA
HERAsafe Sterilbank	Thermo Electron, Waltham/USA
Hypoxiekammer (<i>Modular Incubator Chamber</i>)	Billups-Rothenberg, Del Mar/USA
ImageJ-Software	NIH Image, Bethesda/USA
Isofluran-Pumpe	Univentor Limited, Zejtun/Malta
Kreisschüttler Certomat [®] H	B. Braun, Melsungen
Kühlzentrifuge 5415R, Rotor F45-24-11	Eppendorf, Hamburg
Langendorff-Perfusionsanlage	Eigenbau, Physiologisches Institut der Justus-Liebig-Universität Giessen
LAS-4000 mini	Fujifilm, Düsseldorf
Lumat LB 9501	Berthold Technologies, Bad Wildbad

Magnetrührer lab disc	VWR International, Darmstadt
Mastercycler ep Gradient S	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop DMIL DCF 480	Leica, Wetzlar
Mikroskop Eclipse TS100	Nikon Instruments, Kingston/GB
Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad Laboratories, München
NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Neubauer Improved	LO-Laboroptik GmbH, Bad Homburg
NovexMini Cell	Invitrogen, Darmstadt
Nylonnetz	NeoLab, Heidelberg
Pinzette „Standard Pattern Forceps 14,5 cm“	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Primus 96 advanced® Thermocycler	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Schere „Surgical Scissors 14,5 cm“	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
SmartSpec™3000	Bio-Rad Laboratories, München
Szintillationszähler (Liquid Szintillation Analyzer TRI-CARB 2200CA)	Packard BioScience GmbH, Dreieich
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischinkubator	Thermo Scientific, Erembodegem/B
Transilluminator BioDoc Analyze	Biometra, Göttingen
TRIO Thermoblock	Biometra, Göttingen
Ultra Turrax T25basic	IKA Labortechnik, Berlin
Video-gesteuertes Zellgrenzenerkennungssystem	Firma Scientific Instruments, Heidelberg
Wasserbad TWB5	Julabo, Seelbach
Zentrifuge 5415D, 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Avanti™J-25	Beckman Coulter, Fullerton/USA

2.1.12 Sterilisation

Zur Sterilisation wurden die Lösungen, sofern die Bestandteile eine Hitzebehandlung erlaubten, für 20 min bei 120 °C und 10⁵ Pascal im Dampfdruckautoklaven autoklaviert. Ansonsten wurden hitzeempfindliche Lösungen steril filtriert (Porengröße der Filter: 0,2 µm). Gebrauchswaren wurden entweder autoklaviert oder ÜN bei 220 °C gebacken.

2.2 ANT1-Tiermodell

2.2.1 Identifizierung der ANT1-Ratten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ANT1-Ratten verwendet, die in unserer Arbeitsgruppe generiert und im Jahr 2007 erstmals grundcharakterisiert wurden [50]. Die Tiere besitzen sieben bis neun Kopien des ANT1-Konstrukts an einem Integrationsort im Genom. Entscheidend ist, dass die Tiere den ANT1 herzspezifisch unter Verwendung eines α -Myosin Heavy Chain (α MHC)-Promotors überexprimieren. Zur routinemäßigen Identifizierung der ANT1-Tiere, wurden Genotypisierungen aus Schwanzspitzenbiopsien durchgeführt. Dazu wurde genomische DNA isoliert (Kapitel 2.6.1) und ANT1 mit Hilfe der Primer ANT135-F und pOBGH3-R in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert (Kapitel 2.6.5). Die PCR ergab ein Produkt von ca. 340 bp. Bei der Verwendung von WT-DNA wurde keine Bande detektiert. Für Kontroll-PCRs wurden die Primer M A510-F und MAS 11-R eingesetzt, die zur Amplifizierung des ubiquitär exprimierten Gens Mas dienten. Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte ist in Abb. 2.1 A beispielhaft dargestellt. Eine Western-Blot-Analyse (Kapitel 2.4.5) bestätigte die erhöhte ANT-Proteinmenge in den ANT1-Rattenherzen ($23,7 \pm 7,3\%$; Abb. 2.1 B).

Die Versuchstiere wurden unter Beachtung der deutschen Tierschutzverordnung in der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin in Berlin gehalten. Die Haltung erfolgte in einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus. Nahrung und Wasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Behördliche Genehmigungen für die Durchführung der Ischämie-Experimente (G0158/08) und zur Präparation der neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRCM) (T0449/08) und adulten Rattenkardiomyozyten (ARCM) (T0148/08) lagen bei Versuchsbeginn vor.

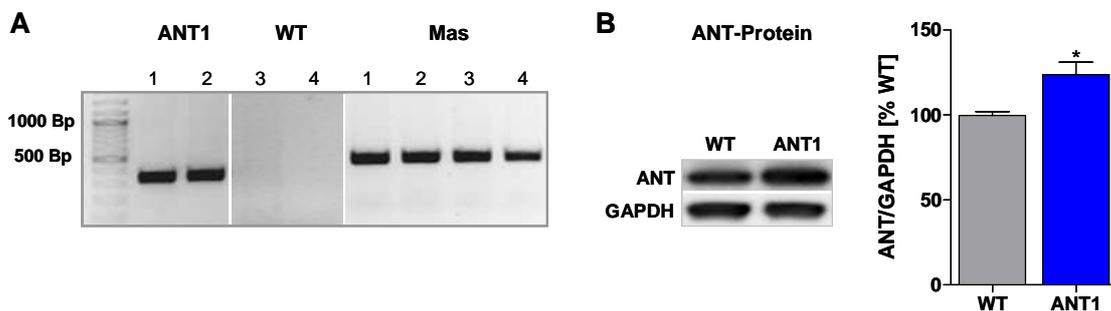


Abb. 2.1: Identifizierung der ANT1-Ratten. (A) Repräsentative Darstellung der gelelektrophoretischen Auftrennung einer Genotypisierungs-PCR. Genaue Beschreibung siehe Text. (B) Western-Blot-Analyse der ANT-Expression. Die Quantifizierung erfolgte in Relation zu GAPDH. * $p < 0,05$ vs. WT; $n = 11-12$.

2.2.2 Ischämie-Induktion im Myokard von WT- und ANT1-Ratten

Die Induktion der myokardialen Ischämie in vier bis sechs Monate alten Ratten erfolgte durch Dr. Konstantinos Savvatis nach Tschöpe *et al.* [132].

Zu Beginn der Durchführung wurden die Tiere gewogen, um eine genaue Dosierung der Narkose- und Schmerzmittel zu gewährleisten. Anhand des ermittelten Gewichts erfolgte die intraperitoneale Gabe von Ketamin (80 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (8 mg/kg Körpergewicht) zur Narkotisierung. Nach dem Eintreten der Narkose, wurden die Tiere auf dem Operationstisch fixiert und intubiert. Die Intubation erfolgte mit Hilfe einer 18G dicken Braunüle, welche unter direkter Sicht der Stimmbänder in die Trachea fortgeleitet wurde. Die anschließende Beatmung erfolgte mit 50-60 Atemzügen pro Minute und einem Atemzugvolumen von 1,5 ml/100 g Körpergewicht. Ferner wurde zur Narkoseerhaltung eine Inhalationsnarkose mit Isofluran in einer 0,8-1,5%igen Mischung mit Raumluft über eine Isofluran-Pumpe verwendet. Nach Enthaarung der linken Thoraxhälfte und Desinfektion mit Braunol, wurden die Haut und Muskulatur frei präpariert. Anschließend erfolgte die Öffnung des linken vierten Interkostalraums (ICR) durch Schneiden der Interkostalmuskulatur zwischen der vierten und fünften Rippe. Nach Eröffnung des darunterliegenden Herzbeutels, wurden der linke Vorhof und der linke Ventrikel des Herzens freigelegt.

Um die Ischämie zu induzieren wurde ein 7,0 dicker Prolene-Faden durch den Herzmuskel unterhalb der linksanterioren deszendierenden Arterie (LAD) und ca. 2-3 mm unterhalb des linken Vorhofs geführt und mit einem Knoten festgezogen.

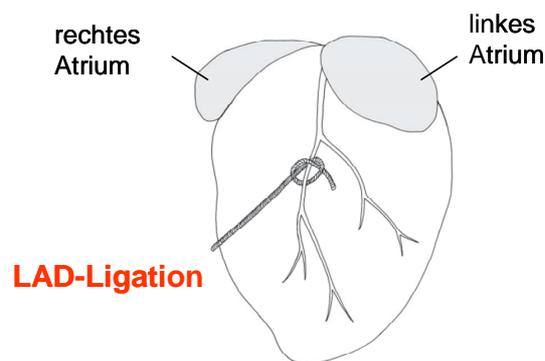


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der linken Koronararterien im Herzen. Position der LAD-Ligation (modifiziert nach Wang *et al.* [133]).

Das behandelte Gewebe im sichtbaren linken Ventrikel wurde anschließend deutlich blasser und diente als Beweis einer korrekt durchgeführten LAD-Ligatur und Infarktentstehung. Nach der Operation wurde der Herzbeutel wieder über dem Herzen platziert, die Rippen gelöst, diese mit zwei Nähten

geschlossen und die aus der Fixierung gelösten Muskeln reponiert. Um einen Pneumothorax möglichst zu vermeiden, erfolgte eine Überblähung der Lungen, indem der Luftausgang der Beatmungsmaschine für 1-2 s okkludiert wurde. Anschließend konnte die Haut mit einer fortlaufenden Naht (2,0 Prolene-Faden) verschlossen, die Isoflurannarkose beendet und die Beatmung deeskaliert werden, bis die Spontanatmung wieder einsetzte. Zur postoperativen analgetischen Behandlung wurde den Tieren Buprenorphin (0,05 mg/kg Körpergewicht) subkutan direkt nach der Operation und ein zweites Mal nach 12 h verabreicht. Die *Sham*-Operation der WT- und ANT1-Kontroll-Tiere erfolgte analog zur Ischämie-Induktion, bis auf das Ausbleiben der LAD-Ligation.

Alle Tiere wurden über einen Zeitraum von 24 h nach der Operation beobachtet. Der prozentuale Anteil der verstorbenen Tiere im Vergleich zu den lebenden Tieren pro Gruppe ergab die Mortalitätsrate.

2.2.3 Organentnahme

2.2.3.1 Herzentnahme aus ischämischen- und *Sham*-operierten Ratten und Bestimmung der Infarktgröße

24 h nach der Ischämie-Induktion bzw. *Sham*-Operation erfolgte die Herzentnahme und Bestimmung der Infarktgröße. Dafür wurden die WT- und ANT1-Ratten mittels CO₂ narkotisiert, durch Genickbruch getötet und der Thoraxraum geöffnet. Zur Serumanalyse wurde zunächst 1 ml Blut mit Hilfe einer heparinisierten Spritze entnommen, ins Eppendorfgefäß überführt, für 10 min bei 1000×g abzentrifugiert, das Serum abpipettiert und bis zur Bestimmung der Peroxidkonzentration bei -80 °C gelagert.

Nach schneller Entnahme der Herzen, wurden diese in kaltem PBS gewaschen und der linke Ventrikel von den Vorhöfen und dem rechten Ventrikel befreit. Zur Analyse der Infarktgröße, wurde die Infarktnarbe vom gesunden Ventrikel getrennt und beide Ventrikelteile auf Papier gelegt. Die eingezeichnete Gewebefläche konnte später mit Hilfe der *ImageJ-Software* (NIH Image) quantifiziert werden. Das Verhältnis von infarziertem zum gesamten Ventrikel ergab die Infarktgröße. Das Gewebe wurde bis zur Messung der Proteincarbonylierung bei -80 °C gelagert.

2.2.3.2 Herzentnahme aus unbehandelten Ratten

Zur Herzentnahme wurden die acht Monate alten Tiere mittels CO₂ narkotisiert und im Anschluss durch Genickbruch getötet. Nach Eröffnung des Thorax wurde das Herz entnommen und schnell in eine eiskalte Lösung aus 130 mM NaCl und 30 mM KCl überführt, das Herz gespült und das Blut ausgeschwemmt. Mit Hilfe zweier Skalpelle konnten anschließend die Vorhöfe und der rechte Ventrikel entfernt und der linke Ventrikel in mehrere Gewebestücke zerteilt werden. Diese wurden

zünftig in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Das Gewebe wurde später für die SERCA2a-Aktivitätsmessungen und für Proteinanalysen zum kontraktilen Mechanismus verwendet.

2.3 Zellkulturen

2.3.1 Primärkulturen von Kardiomyozyten

2.3.1.1 Unterschiede von neonatalen und adulten Rattenkardiomyozyten (NRCM/ARCM)

Kardiomyozyten von Säugern sind bereits zum Zeitpunkt der Geburt nahezu vollständig differenziert. Sie lassen sich als Primärkultur über eine begrenzte Zeitdauer kultivieren und für biochemische, molekularbiologische und physiologische Untersuchungen einsetzen [134]. Die Kardiomyozyten verfügen zunächst über spontane Kontraktilität, exprimieren kardiale Gene und Proteine und bilden die charakteristischen Sarkomerstrukturen. Ein großer Vorteil der NRCM ist die leicht zu etablierende Methode der Isolierung und Kultivierung. Auch können die NRCM im Vergleich zu ARCM lange unter hypoxischen Bedingungen existieren, da sie einen höheren glykolytischen Metabolismus aufweisen. Aus diesem Grund wurden NRCM für die Hypoxie-Experimente in dieser Arbeit verwendet (Abb. 2.3).

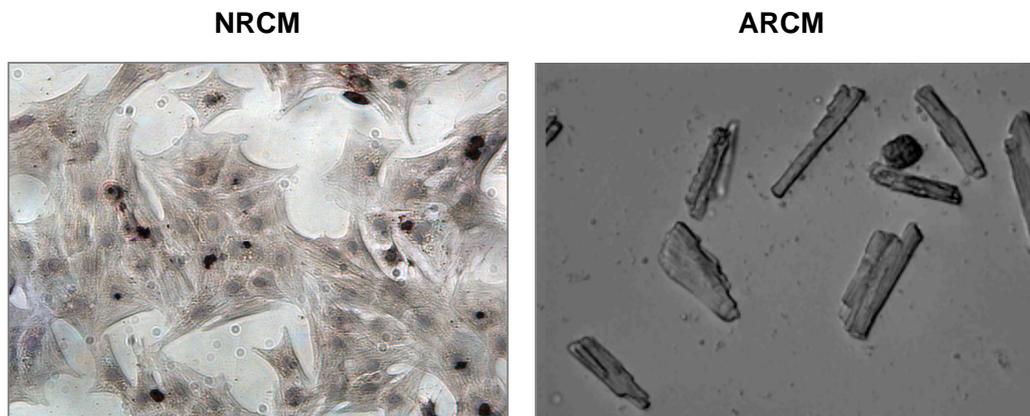


Abb. 2.3: Exemplarische mikroskopische Aufnahmen von NRCM und ARCM. NRCM: 40-fache Vergrößerung; ARCM: 20-fache Vergrößerung.

Für morphologische Untersuchungen und zur Bestimmung der kontraktilen Parameter wurden ARCM eingesetzt. Die Zellen sind von ihrer Zellgröße, Struktur, dem Metabolismus, der Genexpression und der Rezeptorkomposition den Zellen im Herzgewebe am ähnlichsten [129-131]. Sie stellen demzufolge für diese Untersuchungen das am besten geeignete Zellsystem dar. Da die Präparation sehr aufwendig

ist und die Kultivierung nur über wenige Tage erfolgen kann, sind die experimentellen Möglichkeiten in diesem Zellmodell jedoch begrenzt.

2.3.1.2 Präparation der NRCM

Die NRCM wurden aus dem ventrikulären Gewebe von ein bis drei Tage alten WT- und ANT1-Ratten isoliert (Kapitel 2.2.1). Die Präparation erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Vetter *et al.* [135]. Die Tiere wurden vor Beginn der Präparation in 70%igem Ethanol desinfiziert. Nach schneller Tötung durch Dekapitation, erfolgten ein Sternalschnitt bis zum Zwergfell und die Entnahme des Herzens. Dieses wurde in eine mit HBSS gefüllte Petrischale auf Eis gelegt. Das Präparierbesteck wurde nach jedem Tier mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Nach der Herzentnahme aller Tiere wurden die Vorhöfe der Herzen mit Hilfe zweier Skalpelle abgetrennt und die Ventrikel mit einer feinen Pinzette vorsichtig in frisches HBSS überführt. Die Ventrikel wurden noch zweimal geteilt und in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen mit Trypsin-Lösung (0,6 mg/ml) überführt. Der Verdau des Herzgewebes erfolgte ÜN für 18 Stunden bei 4 °C unter geringer Rotationsbewegung (ca. 5 rpm). Am darauf folgenden Tag erfolgte die Freisetzung der kardialen Zellen mittels Kollagenase Typ 2. Dazu wurden die Herzstücke aus der Trypsin-Lösung in 20 ml Fibroblasten-Medium (Kapitel 2.1.8) überführt und im Becherglas mit einem Rührfisch für 4 min bei 37 °C und niedriger Stufe gerührt. Das Medium wurde verworfen und 5 ml Kollagenase-Lösung (1 mg/ml) zugeführt. Nach erneuter Inkubation und langsamer Rotation, wurde der Überstand im 50 ml-Zentrifugenröhrchen auf Eis gesammelt. Der Kollagenase-Verdau erfolgte insgesamt 10-mal. Die gesammelten Überstände wurden danach durch eine sterile Mullkomresse gegossen und im Zentrifugenröhrchen gesammelt, wobei die groben Gewebereste abgetrennt wurden. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min und 1200 rpm, bei dem die gesamten Herzzellen pelletierten. Dieses Zellpellet konnte danach in 20 ml Fibroblasten-Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt werden. Nach 90-minütiger Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ waren die Fibroblasten vom NRCM-haltigen Überstand getrennt. Dieser wurde abgenommen, nochmals pelettiert und im NRCM-Medium resuspendiert. Nach der Zellzahlbestimmung in einer Neubauer-Zählkammer (Kapitel 2.5.1), wurden die NRCM auf Zellkulturplatten ausplattiert und ÜN bei 37 °C, 95% O₂ und 5% CO₂ kultiviert. Der Zusatz von Pferdeserum und FUDR im Kulturmedium verhinderte die Vermehrung der unerwünschten Fibroblasten. Am darauf folgenden Tag wurden die NRCM einmal mit HBSS gewaschen und in frischem NRCM-Medium aufgenommen. Um sicherzustellen, dass die Zellzahl der WT- und ANT1-NRCM zu Beginn der Experimente nicht variierte, wurden die lebenden Zellen in 96-Well-Platten mittels Zellviabilitätstest quantifiziert (Kapitel 2.5.2).

2.3.1.3 Hypoxie-Induktion in NRCM

Zur Hypoxie-Induktion wurden die WT- und ANT1-NRCM in sauerstoffhaltigem NRCM-Medium ausplattiert und für 4 min mit 25 l/min Gas in einer Hypoxiekammer gespült. Die Gaszusammensetzung betrug 94% N₂, 5% CO₂ und 1% O₂. Die Kammer wurde anschließend luftdicht verschlossen und bei 37 °C im Brutschrank für 24 h bzw. 48 h platziert. Der vollständige Gasaustausch des Kulturmediums war nach ca. 8 h abgeschlossen [98]. Die Zellen konnten sich langsam an die hypoxischen Bedingungen in der Kammer gewöhnen. Um eine Reoxygenierung zu vermeiden, wurden die Zellen nach der Inkubationszeit sofort auf Eis gestellt, 2-mal mit HBSS gewaschen und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Für die ROS- (Kapitel 2.5.7) und Caspase-Messungen (Kapitel 2.5.5) wurden die NRCM direkt aus der Kammer entnommen und mit entsprechenden Reagenzien behandelt. Die Kontrollgruppen wurden für gleiche Zeiträume unter normoxischen Bedingungen (95% O₂ und 5% CO₂) kultiviert.

2.3.1.4 Präparation der ARCM

Die Isolation der ARCM aus männlichen Sprague Dawley Rattenherzen (250-300 g) erfolgte mit Hilfe einer Langendorff-Perfusionsanlage nach dem Protokoll von Piper *et al.* [136]. Die methodische Durchführung wurde von Dr. Jacqueline Heger (Physiologisches Institut, Justus-Liebig Universität Gießen) übernommen und wird daher nur kurz beschrieben:

Die Langendorff-Perfusionsanlage wurde luftblasenfrei mit zirkulierendem Powell-Medium gefüllt, das während der gesamten Isolierungszeit auf 37 °C erwärmt und mit Carbogen begast wurde, um einen konstanten pH-Wert von 7,4 zu gewährleisten. Anschließend erfolgte die Narkotisierung der WT- und ANT1-Ratten mit Diethylether und nach Erreichen einer tiefen Bewusstlosigkeit die Tötung durch Genickbruch. Nach Fixierung der Tiere erfolgte die Eröffnung des Thorax und Entfernung des Zwergfells, um das Herz zugänglich zu machen. Mit einer groben Pinzette wurde das Herz angehoben, samt Lunge herauspräpariert und schnell in kalte physiologische Kochsalzlösung überführt. Danach konnten die anhängenden Gewebereste und die Lunge entfernt sowie die Aorta freipräpariert werden. Das Herz wurde über die Aorta an eine Perfusionskanüle der Langendorff-Apparatur angeschlossen und mit 50 ml Powell-Medium tropfenweise gespült. Im Anschluss erfolgte eine zirkulierende Perfusion mit 50 ml Kollagenase-Lösung (0,4 mg/ml) für 25 min. Dabei wurde eine Flussrate von 5 ml/min pro Herz eingestellt.

Nach erfolgter Perfusion wurden die Vorhöfe und die Aorta des Herzens abgetrennt und der Ventrikel mechanisch in Stücke zerteilt. Der weitere Gewebeverdau erfolgte durch Zugabe von 30 ml Kollagenase-Lösung (Kollagenase Typ CLS II) für 5 min bei 37 °C und ständiger Carbogen-Begasung. Um eine Vereinzelnung der Zellen zu bewirken, wurde die Zellsuspension jede Minute vorsichtig resuspendiert. Zur weiteren Behandlung erfolgte die Filtration der Zellen durch ein Nylonnetz

(Porengröße 200 μM) mit anschließender Zentrifugation für 3 min und 400 rpm. Das entstandene ARCM-haltige Pellet wurde in 10 ml Powell-Medium mit 200 μM CaCl_2 resuspendiert und nochmal für 2 min unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das dabei gewonnenen Zellpellet wurde danach in Powell-Medium mit 400 μM CaCl_2 und anschließend in Medium mit 1 mM CaCl_2 aufgenommen. Nach dem finalen Zentrifugationsschritt (1 min, 300 Ump) erfolgte das Resuspendieren der ARCM in CCT-Kulturmedium und das Ausplattieren der ARCM auf zuvor beschichtete Zellkulturplatten. Die Beschichtung erfolgte für 4 h bei 37 °C mit speziellem Medium bestehend aus CCT-Medium und 4% FCS [136]. Die ARCM wurden für zwei Stunden bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert und anschließend zweimal mit CCT-Medium gewaschen. Zu diesem Zeitpunkt lagen ca. 90% der ARCM als stabförmige Kardiomyozyten vor.

2.3.2 HL-1-Zelllinie

2.3.2.1 Kultivierung von HL-1-Zellen

Für die Transfektionsexperimente (Kapitel 2.5.12) wurden mausspezifische HL-1-Zellen gewählt, die von der atrialen Tumorzelllinie AT-1 abstammen und den genetischen Hintergrund der C57BL/6 Mäuse besitzen. Die Kultivierung erfolgte in Claycomb-Medium bei 37 °C und einer Begasung von 5% CO_2 im Brutschrank. Um optimales Wachstum der Zellen dauerhaft zu gewährleisten, wurden diese alle 2-3 Tage passagiert. Dabei wurden die HL-1-Zellen aus einer T75-Zellkulturflasche zunächst mit vorgewärmten PBS gewaschen und anschließend einer Trypsin/EDTA-Behandlung unterzogen. Die Zugabe von 6 ml Trypsin/EDTA und Inkubation bei 37 °C für 8 min, verursachte ein Abrunden der Zellen. Die anschließende Behandlung mit 3 ml frischem Trypsin/EDTA für weitere 5 min löste die HL-1-Zellen vom Flaschenboden, sodass diese nach Zugabe von 4 ml Trypsin-Inhibitor und 10 ml Claycomb-Medium abzentrifugiert werden konnten (5 min, 900 rpm). Das entstandene Zellpellet wurde in Claycom-Medium aufgenommen und im Verhältnis von 1:3 auf neue Zellkulturflaschen verteilt. Um ein adhärentes Wachstum der Zellen in Zellkulturflaschen und auf den Platten zu gewährleisten, wurden diese ÜN mit 6 ml bzw. 1 ml Fibronectin-Lösung (2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Fibronectin in 0,02% Gelatine) beschichtet. Ein Mediumswechsel erfolgte jeden zweiten Tag. Zum Ausplattieren wurde die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer bestimmt (Kapitel 2.5.1) und die HL-1-Zellen zu $1,5 \times 10^4$ Zellen/Well einer 24-Well Platte ausplattiert.

2.3.2.2 Einfrieren und Auftauen von HL-1-Zellen

Um HL-1-Zellen aus einer permanenten Kultur zu kryokonservieren, wurden diese, analog zur Kultivierung, mit Trypsin/EDTA behandelt und von der Zellkulturflasche abgelöst. Nach Zugabe von 3 ml Trypsin-Inhibitor konnten die HL-1-Zellen in 8 ml Waschmedium aufgenommen und für 5 min bei 900 rpm abzentrifugiert werden. Anschließend wurde das Pellet in 1,5 ml FBS (plus 5% DMSO)

resuspendiert und im Kryogefäß bei -80 °C in einem Isopropanol-Bad eingefroren. Die Temperatur wurde dabei um 1 °C pro Minute gesenkt. Nach 6 bis 12 h konnten die Kryogefäße in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Beim Auftauen der HL-1-Zellen wurden diese bei 37 °C im Wasserbad schnell erwärmt und in ein Falcon mit 10 ml Waschmedium überführt. Nach anschließender Zentrifugation (5 min, 900 rpm) wurde das Zellpellet in 15 ml Claycomb-Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

2.4 Biochemische Analysen

2.4.1 Herstellung von Proteinhomogenaten aus Herzgewebe

30-50 mg linksventrikuläres Herzgewebe wurden mit 30-fachem Volumen eiskaltem Homogenisationspuffer (Kapitel 2.1.2) versetzt und mit einem Homogenisator zerkleinert (5×10 s, 21000 rpm). Das entstandene Homogenat wurde anschließend mit Hilfe einer Spritze durch eine Filtermembran gepresst und so die gelösten Bestandteile von groben unzerkleinerten Geweberesten getrennt. Vor der Proteinbestimmung wurden 20 µl Probe mit 20 µl einer 1 M NaOH-Lösung versetzt, 30 min inkubiert und so das Homogenat denaturiert. Es folgte die Proteinbestimmung mit Hilfe des Bicinchoninsäure (BCA)-Tests (Kapitel 2.4.3). Die Proben wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert und für spätere Western-Blot-Analysen (Kapitel 2.4.5) und Ca²⁺-Transport-Messungen eingesetzt (Kapitel 2.4.10).

2.4.2 Herstellung von Zellextrakten aus NRCM

120 µl Zellysepuffer wurden auf die kultivierten Zellen einer 6-Well-Platte pipettiert und die NRCM für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die NRCM mittels Zellschaber gelöst, in ein Eppendorfgefäß überführt und für weitere 20 min auf Eis stehen gelassen. Nach einem Zentrifugationsschritt von 8 min bei 4 °C und 14000×g, wurde der proteinhaltige Überstand abgenommen und die Proteinmenge mittels BCA-Test (Kapitel 2.4.3) bestimmt.

2.4.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte mit Hilfe des BCA Protein Assay Kits. Dieser Test basiert auf einer Kombination des Biuret-Assays mit BCA als Detektionssystem. Dabei werden zweiwertige Kupferionen in der Reaktionslösung durch die Proteine zu einwertigen Kupferionen reduziert. Diese bilden mit BCA einen rotvioletten Farbkomplex, der einen kolorimetrischen Proteinnachweis bei einem Absorptionsmaximum von 562 nm ermöglicht. Für die Proteinbestimmung

wurde zunächst mittels BSA-Standard (2 µg/µl) eine Verdünnungsreihe angesetzt. Diese enthielt 0, 100, 200, 400, 600, 800 und 1000 ng/µl BSA in jeweils 25 µl Volumen. Parallel dazu wurden 3 µl Probe in 22 µl Wasser bidest. verdünnt. Zu beiden Reaktionsansätzen wurden 500 µl Reaktionslösung aus Puffer und Substrat hinzupipettiert und für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgten die Absorptionsbestimmung im Spektrophotometer und die Errechnung der Proteinkonzentration anhand des mitgeführten Standards.

2.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um die Expression bestimmter Proteine in Zellen oder im Gewebe nachzuweisen, wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angewandt. Dabei wandern Proteine im Polyacrylamid-Gel unter denaturierenden Bedingungen im elektrischen Feld in Richtung Anode und trennen sich anhand ihrer Molekularmasse auf. Das im Gel und Laufpuffer enthaltene SDS ist ein anionisches Detergens, das die Proteine denaturiert, zudem die Eigenladung der Proteine überdeckt und so ein konstantes Masse/Ladungsverhältnis schafft. Bei der Probenvorbereitung wurden 2-30 µg Protein mit Protein-Probenpuffer (Kapitel 2.1.2) versetzt und bei 95 °C bzw. 37 °C für 5 min erhitzt. Bei 95 °C werden Tertiär- und Sekundärstrukturen durch Aufspaltung der Wasserstoffbrücken aufgelöst und die Moleküle gestreckt. DTT im Probenpuffer spaltet die Disulfidbrücken der Cysteine im Protein. Zur Auftrennung der Proteine wurden kommerziell erhältliche NuPAGE® Novex Bis-Tris-Gele mit einem kontinuierlichen Acrylamidgradienten von 4-12% verwendet. Durch die Aufteilung der Gele in ein weitporiges Sammelgel und ein engporiges Trenngel, wird eine Protein-Aggregation beim Eintritt in das Gel verhindert und schafft zudem schärfere Banden. Als Proteinstandard dienen 7 µl *SeeBluePlusII* und als Laufpuffer wurde 1×NuPAGE®MES SDS *Running Buffer* verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei 100 V, bis die gewünschte Laufweite erreicht war.

2.4.5 Western-Blot

Im Western-Blot-Verfahren werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus der Polyacrylamidmatrix über ein dazu senkrecht angelegtes elektrisches Feld auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran übertragen. Mit dieser Methode lassen sich anschließend die Proteine bei der Immunfärbung direkt durch Antikörper auf der Membran nachweisen (Kapitel 2.4.6). In dieser Arbeit erfolgte der Proteintransfer mit Hilfe des Tankblottings. Dabei wurden vertikale Puffertanks eingesetzt, an deren Seitenwänden Platindrähte als Elektroden angebracht waren. An die Seite der Kathode wurden nacheinander in einer Gitterkassette ein Schwamm, ein Whatman-Filterpapier, das Gel, darauf die PVDF-Membran, wieder ein Filter und zuletzt ein Schwamm platziert. Die Filter und Schwämme wurden zuvor in frischem Transferpuffer getränkt, um eine Austrocknung des Gels und der Membran zu vermeiden. Die PVDF-Membran wurde zur Aktivierung für 15 s in

Methanol getränkt, für 2 min in Wasser bidest. gespült und anschließend in den Transferpuffer gelegt. Der Proteintransfer erfolgte in Transferpuffer und unter Verwendung eines vertikalen Kühleinsatzes für 90 min bei 200 mA.

2.4.6 Immunfärbung

Die Detektion von Proteinen auf einer PVDF-Membran erfolgte mittels spezifischer primärer und sekundärer Antikörper (Kapitel 2.1.5), wobei letztere mit einer *Horse Radish Peroxidase* (HRP) gekoppelt waren. Die PVDF-Membran wurde zunächst für 1 h bei RT in Blockpuffer (5% Magermilchpulver bzw. 5% BSA in TBST) inkubiert, um unspezifische Bindestellen der Membran abzudecken. Anschließend wurde der primäre Antikörper in entsprechender Konzentration in Blockpuffer zugegeben und für 1 h bei RT oder ÜN bei 4 °C inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit TBST für jeweils 10 min. Danach wurde der zweite Antikörper in Blockpuffer verdünnt und die Membran darin für 45 min bei RT geschüttelt. Nach drei weiteren Waschschrten mit TBST wurde die Feuchtigkeit von der Membran entfernt, 1 ml Rodeo ECL Western Blotting Detection Reagents auf die Membran pipettiert und für 5 min im Dunkeln inkubiert. Die Peroxidase des sekundären Antikörpers katalysierte die Chemilumineszenzreaktion. Die Chemilumineszenzsignale wurden mit Hilfe des Las 4000 mini-Imagers von Fujifilm in geschwärzte Areale umgewandelt, die densitometrisch mit dem Programm Multi Gauge (Version 3.2) ausgewertet werden konnten. Dabei war darauf zu achten, dass keine Sättigung der Schwärzung auftrat. Die Quantifizierung der spezifischen Proteinsignale erfolgte letztendlich in Relation zur Proteinmenge auf der Membran oder in Relation zur Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), da die untersuchten Gruppen in Bezug auf GAPDH keine Expressionsunterschiede zeigten. Um die Proteine auf der PVDF-Membran zu visualisieren, wurde diese für 1 min mit Coomassie-Blau gefärbt und anschließend für 20 min in Entfärber-Lösung entfärbt. Mindestens drei gefärbte Proteinbanden wurden quantifiziert, gemittelt und zur Auswertung herangezogen.

2.4.7 Katalaseaktivität

Die Katalase ist ein Enzym des antioxidativen Stress-Systems und beschleunigt die Umsetzung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu Wasser (H_2O) und Sauerstoff (O_2). Zur Aktivitätsmessung wurde die Methode von Beers und Sizer [137] angewandt, bei der die Katalase aus Proteinhomogenaten zugefügtes H_2O_2 umsetzt und dessen Abnahme photometrisch bestimmt werden kann. Für die Reaktion wurden 150 μ l Katalase-Puffer inklusive H_2O_2 und 4 μ l Proteinhomogenat der NRCM bei RT in einer Küvette gemischt und der H_2O_2 -Abbau über einen Zeitraum von 45 s bei 240 nm gemessen. Als Leerwert diente der Katalase-Puffer inklusive H_2O_2 . Um sicherzustellen, dass die H_2O_2 -Abnahme auf die Katalaseaktivität zurückzuführen war, wurden zur Kontrolle 50 mM Katalase-Inhibitor (3-Amino-

1,2,4-Triazol) zugefügt. Zur Berechnung der Aktivität wurde der millimolare Extinktionskoeffizient von H_2O_2 ($\epsilon = 0,0436 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes von $154 \mu\text{l}$ miteinbezogen. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte in Units pro mg Protein mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes. Dabei katalysiert das Enzym bei einer Aktivität von 1 Unit $1 \mu\text{mol}$ Substrat pro Minute unter den angegebenen Reaktionsbedingungen.

$$\text{Enzymaktivität [Units/mg]}: \frac{\Delta A/\text{min} \times V_{\text{Ges}}[\text{ml}]}{\epsilon [\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}] \times d [\text{cm}] \times V_{\text{Protein}}[\text{ml}] \times c [\text{mg/ml}]}$$

V_{Ges} : Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes [ml]

ϵ : spezifischer Extinktionskoeffizient [$\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]

d : Schichtdicke der Küvette [cm]

V_{Protein} : Volumen der eingesetzten Proteinsuspension [ml]

c : Proteinkonzentration der eingesetzten Proteinsuspension [mg/ml]

2.4.8 Proteincarboxylierungen im Gewebe

Sauerstoffradikale verursachen oxidative Proteinmodifikationen, die zur schnellen Proteindegradation beitragen. Eine Modifikation ist die Proteincarboxylierung, die durch metallkatalysierte Proteinoxidation entsteht. Dabei binden Kationen wie Fe^{+2} oder Cu^{2+} an Aminogruppen von Lysin, Arginin, Prolin und Histidin. Durch H_2O_2 oder O_2 werden diese Aminogruppen in Carbonylgruppen transformiert. Die Quantifizierung der Carbonylgruppen erfolgte mittels 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH), das an die Carbonylgruppen bindet, zu 2,4-Dinitrophenylhydrazon derivatisiert und mittels Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 370 nm gemessen werden kann [138].

Für die Messung wurden ca. 30 mg Herzgewebe mit $600 \mu\text{l}$ Proteincarboxylierungs-Puffer versetzt und mit Hilfe des Ultra-Turrax homogenisiert. Das Homogenat wurde 15 min bei RT stehen gelassen und bei $1000 \times g$ für 10 min abzentrifugiert. Um Nukleinsäurekontaminationen zu vermeiden, erfolgte eine Behandlung von $500 \mu\text{l}$ des Überstandes mit $50 \mu\text{l}$ Streptomycin-Lösung für 20 min bei RT. Nach erneuter Zentrifugation wurden jeweils $150 \mu\text{l}$ Überstand auf drei Reaktionsgefäße verteilt und in zwei davon $600 \mu\text{l}$ DNPH-Lösung pipettiert. Diese bestand aus 10 mM DNPH in 2,5 M HCl. Zur Behandlung der Referenzprobe wurden $600 \mu\text{l}$ 2,5 M HCl verwendet. Es folgte eine Inkubation der Reaktionsansätze für 1 h im Dunkeln bei RT, wobei jede Probe alle 15 min gevortext werden musste. Um nun die derivatisierten Proteine zu fällen, wurde $750 \mu\text{l}$ eiskalte 20%ige Trichloressigsäure (TCA) zugefügt, die Proteine für 45 min bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert und erneut für 10 min bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ und $16100 \times g$ abzentrifugiert. Im anschließenden Waschschritt wurden zunächst $600 \mu\text{l}$ TCA (10%) und danach 3-mal $600 \mu\text{l}$ Ethanol/Ethylacetat (1:1) zugefügt. Zuletzt wurde das Proteinpellet in $200 \mu\text{l}$

Guanidinhydrochlorid-Lösung resuspendiert, für 10 min bei 37 °C gelöst und für weitere 10 min bei 16100×g zentrifugiert.

Die Konzentrationsbestimmung von DNPH im Überstand erfolgte anhand der gemessenen Absorption bei 370 nm und dem molaren Extinktionskoeffizienten von DNPH (22,000 M⁻¹cm⁻¹). Zusätzlich wurde von allen Überständen eine Proteinbestimmung durchgeführt (Kapitel 2.4.3), um die ermittelten DNPH-Mengen auf die jeweiligen Proteinmengen der Proben zu übertragen. Dazu wurde auch der BSA-Standard in Guanidinhydrochlorid-Lösung angesetzt. Der Referenzwert wurde letztendlich von den beiden DNPH-behandelten Proben abgezogen und die Werte gemittelt.

2.4.9 Peroxidkonzentration im Blutserum

Die Messung der Peroxidkonzentration im Blutserum erfolgte mit Hilfe des PeroXOquantTM Quantitative Peroxide Assay Kits. Der Test detektiert Peroxide wie beispielsweise H₂O₂, das im Testsystem die Oxidation von Fe²⁺ zu Fe³⁺ in Anwesenheit des Farbstoffs Xylenorange initiiert. Unter schwefelsäurehaltigen Bedingungen komplexiert Fe³⁺ mit Xylenorange und bildet ein violettes Farbprodukt mit einem Absorptionsmaximum von 560 nm. Für die Reaktion wurde zunächst ein H₂O₂-Standard angesetzt, der in jeweils 32 µl Volumen sechs aufeinander folgende Konzentrationen von 1-200 µM H₂O₂ enthielt. Parallel dazu wurden 28,8 µl Serum mit 3,2 µl Methanol bzw. 3,2 µl einer TCEP×HCL-Lösung versetzt und für 30 min bei RT inkubiert. TCEP×HCL steht für Tris-(2-Carboxyethyl)-phosphin-Hydrochlorid und stellt eine reduzierende Substanz dar. Durch Zugabe von TCEP×HCL wird die endogene Fe³⁺-Konzentration im Serum jeder Probe ermittelt und kann anschließend von den eigentlichen Messwerten abgezogen werden. Die Proben wurden nach der Inkubationszeit mit 288 µl Reaktionslösung behandelt und für weitere 30 min bei RT stehen gelassen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 12000×g für 10 min mit anschließender Absorptionsmessung des Überstandes bei 560 nm im Spektrophotometer. Die Berechnung der Peroxidkonzentrationen erfolgte letztendlich anhand des mitgeführten H₂O₂-Standards.

2.4.10 Ca²⁺-Transport-Messung

Die Messung zur Ca²⁺-Aufnahme in das SR erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Solaro und Briggs [139] in Kooperation mit Dr. R. Vetter. Dafür wurden Proteinhomogenate aus kardialem Gewebe verwendet, die zuvor mit Homogenisationspuffer hergestellt wurden (Kapitel 2.4.1). Bei der Homogenisation entstanden aus zellulären Membranen einzelne Membranfragmente, die sich zu Membranvesikeln formierten und Ca²⁺-ATPasen, Transporter und PLB enthielten. Die Vesikelbildung ermöglicht grundsätzlich die Ca²⁺-Transport-Messung in Homogenaten von Herzwewebe, wobei in Abhängigkeit der gewählten Methode sowohl retikuläre als auch sarkolemmale Ca²⁺-Transporte selektiv untersucht werden können [140].

Die Abb. 2.4 beschreibt das Prinzip des Ca^{2+} -Transports in dem gewählten System: Die SR Ca^{2+} -ATPase SERCA2a transportiert unter ATP-Verbrauch radioaktiv markiertes $^{45}\text{Ca}^{2+}$ aus dem zugefügten Ca^{2+} -Reaktionspuffer (Kapitel 2.1.2) in das Lumen des SR-Vesikels (Membranvesikels). Dieses bildet zusammen mit Oxalatanionen, die über einen Anionenaustauscher in die Vesikel gelangen, schwer lösliches ^{45}Ca -Oxalat, was innerhalb der Vesikel präzipitiert. Dadurch wird die freie Ca^{2+} -Konzentration im Vesikel niedrig gehalten, sodass SERCA2a gegen einen verminderten Konzentrationsgradienten Ca^{2+} in die SR-Vesikel pumpt. Zudem kann somit der passive $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Efflux aus den Vesikeln minimiert und vernachlässigt werden. Die Oxalat-stimulierte Ca^{2+} -Aufnahme bewirkt eine 100-fache Steigerung der transportierten Ca^{2+} -Menge im Vergleich zum unstimulierten Transport. Demzufolge kann die Ca^{2+} -Transport-Messung aus Proteinhomogenaten erfolgen, ohne zuvor SR-Membranfragmente zu präparieren.

Da die Proteinhomogenate auch Membranfragmente des Sarkolemm und der Mitochondrien mit anderen Ca^{2+} -Transportsystemen enthielten, wurden die Pufferbedingungen so gewählt, dass nur der retikuläre SERCA2a-katalysierte Ca^{2+} -Transport gemessen wurde [139,141]. Dafür enthielt der Ca^{2+} -Reaktionspuffer, neben dem zu transportierenden $^{45}\text{CaCl}_2$, in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (3,68 μM und 0,35 μM) Natriumazid (NaN_3), das die mitochondriale Ca^{2+} -ATPase inhibiert. Die Hemmung des NCX erfolgte durch Arbeiten im Na^+ -freien Milieu. Die gewählten Reaktionsbedingungen gewährleisteten zudem, dass der Anteil der PMCA bei unter 5% lag [141].

Für die Messung der Oxalat-stimulierten Ca^{2+} -Aufnahme wurden zunächst 30 μg Proteinhomogenat zu 150 μl vorgewärmten Ca^{2+} -Reaktionspuffer pipettiert und für 2 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Daraus wurden anschließend 150 μl Probe entnommen, auf eine Zellulosemembran (0,45 μm) pipettiert und unter Verwendung einer Vakuumpumpe gefiltert. Dabei blieben die Vesikel auf der Membran haften, während überschüssiges Ca^{2+} und die weiteren Pufferbestandteile gefiltert wurden. Im Anschluss erfolgten zwei Waschschrte mit jeweils 3 ml eiskaltem Puffer, bestehend aus 100 mM KCl, 2 mM EGTA und 40 mM Imidazol (pH 7,0), bei denen extravesikuläres Ca^{2+} mit EGTA komplexiert und entfernt sowie noch andauernde Ca^{2+} -Transportvorgänge abgestoppt wurden. Um die verbliebene vesikuläre Ca^{2+} -Menge zu bestimmen, wurden die Membranen für 30 min in Szintillationsröhrchen bei 60 °C im Wärmeschrank getrocknet und anschließend 5 ml Szintillationsflüssigkeit zugefügt. Nach 12 h Inkubationszeit wurde die β -Strahlung als Maß für die membrangebundene $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Menge mit Hilfe eines Flüssigkeits-Szintillationszählers bestimmt.

Um die Ca^{2+} -Durchlässigkeit der RyR in den Vesikeln zu reduzieren, wurde dem Ca^{2+} -Reaktionspuffer 20 μM Rutheniumrot beigefügt. Rutheniumrot hemmt die RyR. In Kontrolleexperimenten mit 10 μM Ionophore A23187 wurde die Ca^{2+} -Aufnahme vollständig inhibiert. Die Ca^{2+} -Aufnahmerate wurde insgesamt in nmol Ca^{2+} pro mg Protein pro min angegeben.

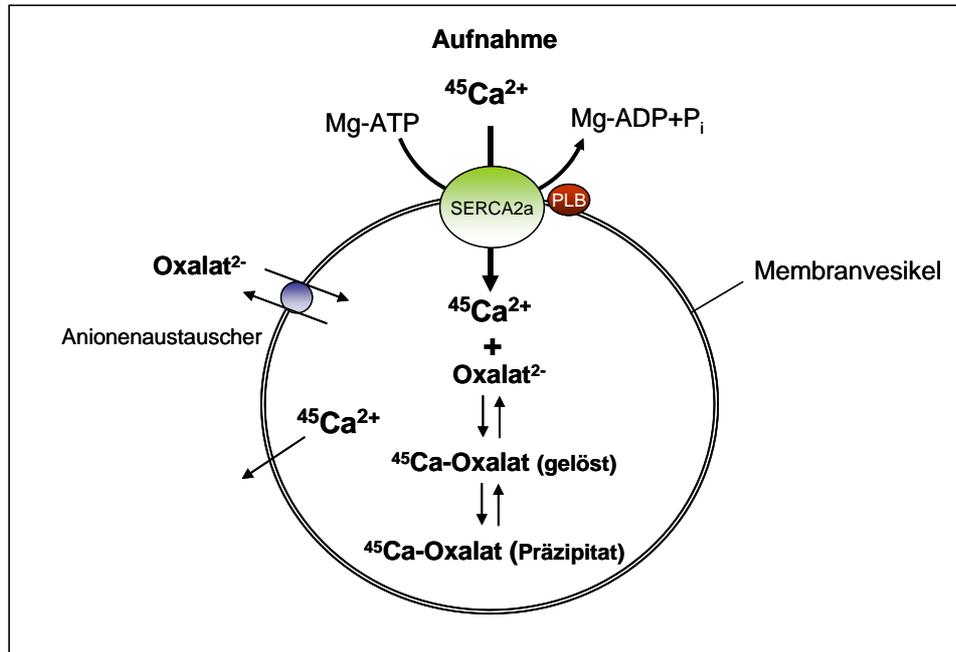


Abb. 2.4: Mechanismus der Oxalat-stimulierten Ca^{2+} -Aufnahme in SR-Vesikel. Die Vesikel aus Proteinhomogenaten enthalten Ca^{2+} -Transportproteine wie SERCA2a und das Regulatorprotein PLB. SERCA2a pumpt unter ATP-Verbrauch $^{45}\text{Ca}^{2+}$ in das Vesikellumen. Parallel dazu wird Oxalat über einen Anionenaustauscher in das Lumen transportiert und als $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Oxalat präzipitiert. Dadurch wird die intravesikuläre freie Ca^{2+} -Konzentration gering gehalten und ermöglicht die weitere Ca^{2+} -Aufnahme durch SERCA2a gegen einen niedrigen Konzentrationsgradienten (modifiziert nach Suckau [142]).

2.5 Zellbiologische Analysen

2.5.1 Zellzahlbestimmung

Der Anteil an lebensfähigen Zellen in einer Zellsuspension wurde durch Anfärben der Zellen mit Trypanblau-Lösung in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt. Trypanblau passiert die Zellmembran von toten Zellen und färbt diese an. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl (Zellen/ml)} = [(Q_1 + Q_2 + Q_3 + Q_4) / 4] \times \text{VF} \times 10^4$$

Q: Zellzahl in einem Großquadrat

VF: Verdünnungsfaktor

2.5.2 Zellviabilitätstest

Um die Zellzahl der lebenden ausplattierten NRCM zu Beginn der Experimente zu überprüfen, wurden 10 µl des almarBlue[®] Cell Viability Reagenz zu 100 µl Medium eines Wells (96-Well-Platte) pipettiert und für 1-4 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung mittels Fluorometer bei einer Extinktionswellenlänge von 570 nm und einer Emissionswellenlänge von 585 nm. Zur Auswertung wurden mindestens 4 Wells der WT und ANT1-NRCM herangezogen und die Mittelwerte gebildet.

2.5.3 ATP-Messung

NRCM wurden zu 5×10^5 Zellen/Well einer 12-Well-Platte ausplattiert und unter hypoxischen bzw. normoxischen Bedingungen kultiviert. Die Zellen wurden anschließend 2-mal mit HBSS gewaschen und eingefroren. Zu Beginn der Messung wurden die Zellen getaut, 300 µl PBS (eiskalt) auf jedes Well pipettiert, die Zellen abgekratzt und für 10 min bei 4 °C und 900×g zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 100 µl PBS resuspendiert und nach Zugabe von 600 µl ATP-Puffer (Kapitel 2.1.2) für 2 min bei 100 °C gekocht. Die Zellreste wurden bei 1000×g für 60 s abzentrifugiert und das Zelllysate bis zur Messung auf Eis gelagert. Zur ATP-Messung wurden 100 µl Überstand und 100 µl Luziferase Assay aus dem ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II gemischt und im Luminometer gemessen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte anhand des mitgeführten ATP-Standards. Der ATP-Gehalt wurde zur Lebendzellzahl normalisiert (Kapitel 2.5.1) und in Prozent zum normoxischen WT angegeben.

2.5.4 Laktatdehydrogenase-Aktivität im Zellmedium

Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist im Zytoplasma der Zellen lokalisiert und wird durch Zellyse ins umgebende Medium abgegeben, sodass die LDH-Aktivität als Maß für Zellschädigung verwendet werden kann. Die LDH-katalysiert die Oxidation von Laktat zu Pyruvat, wodurch bei gleichzeitiger Reduktion von NAD^+ eine äquimolare Menge NADH/H^+ entsteht. Die LDH-Aktivität wurde mittels CytoTox-ONE[™] Homogeneous Membrane Integrity Assay bestimmt. In dem Testsystem wird unter Verbrauch von NADH/H^+ Resazurin zu Resorufin umgewandelt, das fluorometrisch gemessen werden kann. Zur Durchführung der Analyse wurden 80 µl Zellkulturüberstand und 80 µl Reagenz (Puffer und Substrat) in einer Mikrotiterplatte gemischt und für 15 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend wurden 40 µl Stopp-Lösung hinzugefügt und die Menge an produziertem Resorufin bei einer Extinktionswellenlänge von 560 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm mittels Spektrofluorometer gemessen.

2.5.5 Caspase-3/7-Aktivität

Die Caspase ist ein Schlüsselenzym in der intrazellulären Apoptosekaskade. Ihre Aktivität diente daher als charakteristischer Apoptosemarker und wurde mit Hilfe des Apo-ONE[®] Homogeneous Caspase-3/7 Assays bestimmt. Für die Messungen wurden NRCM zu 5×10^4 Zellen/Well einer 96-Well-Platte ausplattiert und unter hypoxischen bzw. normoxischen Bedingungen oder in Gegenwart von H₂O₂ kultiviert (Kapitel 2.3.1.3 bzw. 2.5.8). Nach den verschiedenen Behandlungen erfolgte die Zugabe von 100 µl Medium und 100 µl APO-Reagenz auf die Zellen eines Wells. Das APO-Reagenz bestand aus Lysepuffer mit profluoreszierendem Substrat Z-DEVD-Rhodamin 110, das durch die Caspase-3/7 in fluoreszierendes Rhodamin 110 gespalten wurde. Die Fluoreszenz konnte nach drei- bis vierstündiger Inkubationszeit im Spektrofluorometer bei einer Extinktionswellenlänge von 499 nm und einer Emissionswellenlänge von 521 nm ermittelt werden.

2.5.6 TUNEL-Färbung

Am Ende einer intrazellulären Apoptosekaskade erfolgt die Aktivierung von Endonukleasen, die nukleare DNA fragmentieren [143]. Dabei entstehen niedermolekulare doppelsträngige DNA-Fragmente und Einzelstrangbrüche in hochmolekularer DNA. An deren Enden befinden sich freie 3'-OH-Gruppen, an die in einer enzymatischen Reaktion Fluoreszein-markiertes dUDP angehängt werden kann (TUNEL; *Terminal dUTP Nick End Labeling*). Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops können anschließend die apoptotischen Zellen sichtbar gemacht werden. Für die TUNEL-Färbung wurden $1,9 \times 10^5$ Zellen/Well einer 24-Well-Platte ausplattiert und unter hypoxischen bzw. normoxischen Bedingungen kultiviert. Vor dem Test wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und zur Fixierung mit 500 µl Formalin (10%) bedeckt. Nach einer Stunde Inkubationszeit folgten drei Waschschriffe mit PBS, um das Formalin komplett zu entfernen. Damit die Volumina der Reagenzien für die nachfolgenden Reaktionen gering gehalten werden konnten, wurde der zu untersuchende Bereich in jedem Well mit einem Fettstift markiert. Die darin befindlichen Kardiomyozyten wurden daraufhin mit Proteinase K (25 µg/ml in PBS) für 15 min bei 37 °C permeabilisiert und infolge 3-mal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine 60-minütige Inkubation der Zellen mit 50 µl TUNEL-Färbelösung (*In Situ Cell Death Detection Kit*, AP) bei 37 °C im Brutschrank. Nach drei finalen Waschschriffen konnten 350-550 Zellen pro Gruppe unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt werden.

2.5.7 Messung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Die Messung von intrazellulärer ROS in NRCM erfolgte mit Hilfe von 2', 7'-Dichlorfluorescein Diacetat (DCFH-DA) nach dem Protokoll von Wang *et al.* [144]. Für die Durchführung wurden 5×10^4 NRCM/Well einer 96-Well-Platte ausplattiert und unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen

inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 100 μ l HBSS gewaschen und 180 μ l Volumen DCFH-DA (5 μ g/ml) in HBSS zugefügt. Nach 30-minütiger Inkubation erfolgte die Fluoreszenzmessung im Spektrofluorometer bei einer Extinktionswellenlänge von 480 nm und Emissionswellenlänge von 540 nm.

2.5.8 Behandlung von NRCM mit H₂O₂

Zur Behandlung der NRCM mit H₂O₂ wurden diese zu 5×10^4 Zellen/Well einer 96-Well-Platte ausplattiert und am darauffolgenden Tag für 24 h mit 10 μ M H₂O₂ in serumfreiem Medium inkubiert. Die Kontrollzellen erhielten nur serumfreies Medium.

2.5.9 Zytokin-Stimulation von NRCM

Auf FBS-beschichtete 12-Well-Platten wurden 7×10^5 NRCM/Well in NRCM-Medium ohne Serum ausplattiert (Kapitel 2.1.8) und nach dem Absetzen stimuliert. Zur Stimulation wurden die Zytokine IL-1 β (30 ng/ml), TGF- β 1 (1 ng/ml) und TNF α (30 ng/ml) zum Medium hinzu pipettiert und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Zellen lysiert, die mRNA isoliert (Kapitel 2.6.2) und diese mittels *Real-Time* PCR (Kapitel 2.6.7) quantifiziert.

2.5.10 Morphologische Analysen von ARCM

Zur Bestimmung der Zellgröße wurden mikroskopische Phasenkontrastaufnahmen von ARCM mit Hilfe einer CCD (*Charge-Coupled-Device*)-Kamera erstellt. Für die Auswertung wurden fünf willkürlich ausgewählte Aufnahmen pro Zellpräparation herangezogen und alle stabförmigen Myozyten (insgesamt 60-100) in ihrer diastolischen Länge und Zellbreite gemessen (Software: Analysis from SIS). Aus der Zelllänge und Zellbreite der Kardiomyozyten wurden der Zellquerschnitt und das Zellvolumen errechnet: $(\text{Radius})^2 \times \pi$ bzw. $(\text{Radius})^2 \times \pi \times \text{Zelllänge}$. Die gesamte Durchführung erfolgte nach dem Protokoll von Schäfer *et al.* durch Dr. J. Heger vom Physiologischen Institut der Justus-Liebig Universität Gießen [145].

2.5.11 Elektrische Stimulation und Messung der kardialen Kontraktion von ARCM

Die Kontraktionsparameter wurden im Physiologischen Institut der Justus-Liebig Universität Gießen mit einem Video-gesteuerten Zellgrenzenerkennungssystem der Firma Scientific Instruments (Heidelberg) erfasst.

Dazu wurden kardiomyozytenhaltige Kulturschalen unter dem Mikroskop platziert und mit einem speziellen Deckel abgedeckt. Dieser enthielt zwei parallel angeordnete AgCl-Elektroden, die ins Zellmedium ragten. Zwischen den Elektroden wurde ein homogenes elektrisches Feld aufgebaut, das

einen gleichmäßigen Stromfluss durch die ARCM gewährleisten. Die Stimulation zur Kontraktion erfolgte mit biphasischen Stromstößen, die von zwei 60 V starken, entgegengesetzten Rechteckspannungen ausgelöst wurden und jeweils 0,5 ms andauerten. Dadurch wurden die ARCM mit der vorgegebenen Frequenz stimuliert und die gelegentlich auftretenden Spontankontraktionen vereinheitlicht. Durch eine Veränderung der Stimulationsfrequenz konnte die Kontraktionsfrequenz beliebig variiert werden.

Zur Messung der Kontraktionsparameter wurden zwei Kameras am Mikroskop befestigt: Eine Videokamera zur Beobachtung der Kontraktion auf dem angeschlossenen Monitor und eine Zeilenkamera, die durch Dokumentation von hell-dunkel Unterschieden, z.B. zwischen den ARCM und dem umgebenden Medium, die Zellgrenzen determiniert. Um eine Kontraktion mit der Zeilenkamera zu beobachten, wurde die Kamera so positioniert, dass beide Zellenden im Bild der eindimensionalen Zeile lagen. Dabei bewegte man die Kulturschale, sodass sich die Zelle genau in der Mitte des Okularbildes befand, und drehte dann die Zeilenkamera, bis im Videobild zu sehen war, dass beide Zellen im Erfassungsbereich der Zeilenkamera lagen. Die gemessenen Helligkeitsunterschiede und die damit verbundenen Bewegungen der Zellgrenzen wurden in Form von elektrischen Signalen von der Zeilenkamera auf einen Oszillographen übertragen. Anhand der entstehenden y-Auslenkungen konnten dann die Zelllängen und damit die Zellkontraktionen der ARCM gemessen werden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms Mucel, das Messdaten von fünf Kontraktionen mittelte. Die Messparameter umfassten die diastolische und systolische Zelllänge in μm , die fraktionelle Zellverkürzung (dL/L), *Time To Peak* (TTP) und die halbmaximale Relaxationszeit (RT50) der Zellen. dL/L entsprach der Differenz zwischen diastolischer und systolischer Zelllänge (dL), bezogen auf die diastolische Länge der Zelle (L). Die Angaben erfolgten in Prozent der Zellverkürzung. TTP beschrieb die Zeit von Beginn der Kontraktion bis zur maximalen Kontraktion der ARCM in Millisekunden. RT50 war die Zeit von maximaler Kontraktion bis zur Relaxation um 50% der gesamten Zellverkürzungsstrecke. Für die Kontraktionsmessungen wurden jeweils drei ARCM pro Kulturschale 4-mal im Abstand von 15 s mit drei verschiedenen Frequenzen (0,5 Hz, 1 Hz und 2 Hz) stimuliert. Aus den vier Messungen pro Frequenz wurde letztendlich ein Mittelwert gebildet. Insgesamt wurden 18 ARCM pro Gruppe aus sechs unabhängigen Präparationen eingesetzt.

2.5.12 Transfektion und Zytokin-Stimulation von HL-1-Zellen

Die zur Transfektion kultivierten HL-1-Zellen wurden zu $1,5 \times 10^5$ Zellen pro Well einer 24-Well-Platte ausplattiert, sodass 24 h später eine 70%ige Konfluenz erreicht war. Der eingesetzte Transfektionsansatz bestand aus 800 ng Plasmid-DNA (200 ng Zielploid, 20 ng pHRL-TK *Renilla*-Plasmid und 580 ng pEGFP-c1-Plasmid zur Transfektionskontrolle), 2 μl LipofektaminTM 2000 und Opti-Mem[®]I. Die DNA und das Lipofektamin wurden zunächst separat in 50 μl serumfreiem Opti-

Mem[®]I verdünnt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend konnten die Ansätze zusammengefügt und weitere 20 min bei RT stehen gelassen werden. Währenddessen wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und 500 µl Opti-Mem[®]I auf die Zellen pipettiert. Nach Zugabe der Transfektionslösung erfolgte die Transfektion für 4 h bei 37 °C im Brutschrank. Darauf folgte ein Waschschrift mit vorgewärmten PBS und anschließender Zugabe von 500 µl Claycomb-Medium mit 10% FBS pro Well. Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel auf 2% FBS für 24 h durchgeführt, damit sich die Zellen an geringere FBS-Konzentrationen adaptierten. Zur Stimulation der HL-1-Zellen wurden IL-1β (30 ng/ml), TGF-β1 (10 ng/ml), IL-4 (90 ng/ml), IFNγ (30 ng/ml), TNFα (40 ng/ml), IFN-β (30 ng/ml), TNFβ (100 ng/ml) und IL-6 (200 ng/ml) zum Medium dazu pipettiert und für 8 h bei 37 °C inkubiert.

2.5.13 Reportergenanalysen in HL-1-Zellen

Um das Transaktivierungspotential von ANT1-spezifischen Promotorbereichen zu analysieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit Plasmide konstruiert, die verschieden große Promotorabschnitte enthielten und mit einem Luziferase-Reportergen gekoppelt waren (Kapitel 2.6.18). Die Plasmide wurden in HL-1-Zellen transfiziert, die Zellen mit Zytokinen stimuliert (Kapitel 2.5.12) und anschließend die Luziferase-Aktivität ermittelt. Diese war proportional zur Aktivität des untersuchten Promotors. Für die Messungen wurde das Dual-Luciferase[®]Reporter Assay System eingesetzt. Dessen Messprinzip beruhte auf der *Firefly*-Luziferase und zusätzlichen *Renilla*-Luziferase auf den Plasmiden, wobei letztere konstitutiv exprimiert wurde. Die *Renilla*-Luziferase diente zur Normalisierung der gemessenen *Firefly*-Luziferase-Aktivität. Die zu analysierenden Zellen wurden nach der Kultivierung einmal mit PBS gewaschen und mit 100 µl des Lysepuffers für 15 min unter Schütteln lysiert. Nach dem Abkratzen der Zellen wurden diese in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 4 °C und 13200 rpm zentrifugiert. 10 µl des Überstandes wurden in Reaktionsröhrchen überführt und 50 µl der ersten Substratlösung zugefügt. Im Luminometer konnten nach 10 s die *Relative Light Units* der *Firefly*-Luziferase gemessen werden. Nach Zugabe von 50 µl *Stop and Glow*-Reagenz wurden die *Relative Light Units* der *Renilla*-Luziferase ermittelt.

2.6 Molekularbiologische Analysen

2.6.1 Isolierung von DNA aus Schwanzspitzenbiopsien zur Genotypisierung

Zur Genotypisierung von WT- und ANT1-Ratten wurde genomische DNA aus Schwanzspitzenbiopsien isoliert. Dazu wurde das High Pure PCR Template Preparation Kit verwendet. Die Lyse der Schwanzspitzenbiopsien (ca. 3 mm) erfolgte zunächst in 200 µl Lysepuffer und 40 µl

Proteinase K-Lösung (Substanzen aus dem Kit) bei 55 °C ÜN im Wasserbad. Die weitere Aufreinigung der DNA erfolgte am nächsten Tag nach Angaben des Herstellers. 1-2 µl der isolierten DNA wurden letztendlich in der Genotypisierungs-PCR (Kapitel 2.6.5) eingesetzt.

2.6.2 Isolierung von RNA aus NRCM

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus NRCM wurde die Methode von Chomczynski und Sacchi gewählt [146]. Das Prinzip basiert auf der Verwendung von TRIzol[®], welches Phenol und Guanidinisothiocyanat enthält. Durch das chaotrope Guanidinisothiocyanat werden Wasserstoffbrückenbindungen aufgelöst, Zellstruktur zerstört und RNasen inaktiviert. Mittels Phenol werden Proteine denaturiert und kleinere DNA-Fragmente aus dem Lysat entfernt.

Zu Beginn der RNA-Isolierung wurden 600 µl TRIzol[®] auf die Zellen eines 6-Well-Platten pipettiert, durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren die Zellen gelöst und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 60 µl Chloroform wurden die Proben für 15 s gevortext und für 5 min auf Eis inkubiert. Durch die anschließende Zentrifugation bei 12000×g für 15 min bei 4 °C erfolgte die Auftrennung der Lösung in 3 Phasen. Ca. 300 µl der farblosen, oberen Phase wurden sorgfältig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dazu wurden 300 µl eiskaltes Isopropanol gegeben, der gesamte Ansatz mehrfach invertiert und für mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation bei 12000×g für 15 min und 4 °C wurde das RNA-Pellet einmal mit 800 µl 75%-igem Ethanol gewaschen und bei RT für 15 min getrocknet. Das RNA-Pellet wurde danach in 30 µl RNase-freiem Wasser (DEPC-Wasser) aufgenommen, für 10 min bei 60 °C im Heizblock gelöst und die Konzentration der RNA mittels Spektrophotometer (NanoDrop[®] ND-1000) bestimmt. Die RNA-Qualität konnte mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese überprüft werden (Kapitel 2.6.8).

2.6.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* erfolgte im kleinen Maßstab mittels E.Z.N.A[®] Plasmid Miniprep Kit I und im großen Maßstab mittels Qiagen Maxi Kit nach Angaben des Herstellers. Diese Methode basiert auf der alkalischen Lyse von Bakterien, wobei durch NaOH auch die Plasmid-DNA und chromosomale DNA der Zellen denaturieren. Unter anschließenden Hochsalzbedingungen erfolgt eine reversible Renaturierung der Plasmid-DNA, während chromosomale DNA ausfällt. Die Plasmide werden anschließend auf eine Silica-Membran übertragen, mit 70% Ethanol gewaschen, in sterilem Wasser eluiert und in Klonierungsreaktionen eingesetzt.

2.6.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA und RNA wurde mit Hilfe eines Spektrophotometers (NanoDrop®ND-1000) ermittelt. Die Absorption der Nukleinsäuren wurde bei 260 nm gemessen und nach folgender Formel berechnet: Nukleinsäurekonzentration ($\mu\text{g/ml}$) = Faktor \times A₂₆₀.

Der Faktor bei Doppelstrang-DNA entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ und bei Einzelstrang-RNA oder -DNA 40 $\mu\text{g/ml}$. Diese Angaben beziehen sich auf RNA-freie DNA bzw. DNA-freie RNA. Verunreinigungen durch Proteine und Salze können bei 280 nm bzw. 230 nm detektiert werden, weshalb die Reinheit der Nukleinsäuren aus dem Quotienten von A₂₆₀/A₂₈₀ bzw. A₂₆₀/A₂₃₀ ermittelt wird. Die Quotienten für reine DNA sollten bei 1,8 und für RNA bei 2,0 liegen [147].

2.6.5 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur schnellen Amplifikation von Nukleinsäuren und zum Nachweis spezifischer DNA-Fragmente mittels thermostabiler DNA-Polymerase. In Abhängigkeit von den Primerlängen, der Basenzusammensetzung und Länge der zu amplifizierenden DNA, wurden die PCR-Reaktionen unter verschiedenen, optimierten Bedingungen durchgeführt. Für die Genotypisierungs-PCR wurde die *AmpliTaq* DNA-Polymerase verwendet. Zur Amplifikation von Fragmenten, die für spätere Klonierungsreaktionen bestimmt waren, wurde die *Platinum®Taq* DNA-Polymerase *High Fidelity* eingesetzt. Dieser Polymerasemix besteht aus rekombinanter *Taq* DNA-Polymerase und einer *Pyrococcus species* GB-D-Polymerase, die auf Grund ihrer 3'→5'-Exonukleaseaktivität eine Proof-Reading Funktion besitzt und daher eine sechsfach höhere Genauigkeit aufweist als die *Taq* DNA-Polymerase. Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes sowie die Reaktionsbedingungen sind in den Tabellen 2.16 und 2.17 angegeben.

Tab. 2.16: Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsansatzes

Reagenzien	25 μl Reaktionsvolumen
10 \times Polymerasepuffer	2,5 μl
dNTPs (20 mM)	0,5 μl
Forward-Primer (20 μM)	0,5 μl
Reverse-Primer (20 μM)	0,5 μl
DNA-Template (0,2-0,5 μg DNA)	\times μl
DNA-Polymerase (5 Units/ μl)	0,25 μl
steriles Wasser	auf 25 μl auffüllen

Das PCR-Programm enthielt eine initiale Denaturierung der DNA bei 94 °C für 2 min. Im Anschluss folgten 35 Zyklen nach folgendem Programm im Thermocycler von Peqlab.

Tab. 2.17 PCR-Reaktionsbedingungen

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	94 °C	30 s
Primeranlagerung	55 °C - 61 °C	30 s
Elongation	72 °C (Ampli <i>Taq</i> DNA-Polymerase) → Genotypisierungs-PCR	45 s - 60 s
	68 °C (Platinum [®] <i>Taq</i> DNA Polymerase <i>High Fidelity</i>) → Klonierungs-PCR	2-3 min

Die Temperatur der Primeranlagerung und die Dauer der Elongation wurden für alle Primer und jede DNA-Sequenz optimiert. Um eine vollständige Amplifikation der DNA-Sequenzen zu gewährleisten, wurde ein finaler Elongationsschritt von 10 min bei 72 °C bzw. 68 °C nach Beendigung des letzten Zyklus eingebaut. Zur Analyse der amplifizierten DNA-Produkte wurden 10 µl des Ansatzes mit 5 µl DNA-Ladepuffer versetzt, auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (Kapitel 2.6.8).

2.6.6 cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase

Die Herstellung von cDNA (*copy*-DNA) basiert auf der Umschreibung von einzelsträngiger RNA in doppelsträngige DNA mittels Reverser-Transkriptase, die eine RNA-abhängige DNA-Polymerase darstellt. Die synthetisierte cDNA wurde nachfolgend für die quantitative *Real-Time* PCR (Kapitel 2.6.7) eingesetzt.

Da die Primer der *Real-Time* PCR zum Teil auch genomische DNA-Sequenzen erkennen, wurde vor der Umschreibung der RNA ein DNA-Verdau mittels DNaseI durchgeführt. Hierzu wurden 1,25 µg RNA, 1,25 µl 10×DNaseI-Puffer, 2,5 µl DNaseI (1 Unit/µl) und DEPC-Wasser in einem 12,5 µl Ansatz zusammenpipettiert und im Heizblock bei 37 °C für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die DNaseI durch Zugabe von 1,25 µl 25 mM EDTA und Inkubation für 10 min bei 65 °C inaktiviert. Es folgte die cDNA-Synthese, bei der zunächst 10 µl RNA aus dem DNaseI-Verdau mit 1 µl Random Hexamers (500 µg/ml) gemischt und für 5 min bei 65 °C denaturiert wurden. Anschließend wurden 4 µl 5×*First Strand Buffer*, 2 µl 100 mM DTT, 1 µl 20 mM dNTPs, 1 µl RNasin (RNase-Inhibitor

Gold; 30 Units/ μ l) und 1 μ l der Reversen Transkriptase MMLV (200 Units/ μ l) zugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die synthetisierte cDNA wurde bei -20 °C gelagert. Um die erfolgreiche cDNA-Synthese und einen vollständigen DNA-Verdau zu bestätigen, wurde eine PCR (Kapitel 2.6.5) durchgeführt und die Amplifikate im Agarosegel (Kapitel 2.6.8) aufgetrennt.

2.6.7 Quantitative Real-Time PCR

Eine Möglichkeit zum quantitativen Nachweis verschiedener mRNAs stellt die TaqManTM-PCR dar, ein automatisierter PCR-Assay, bei dem das gebildete PCR-Amplifikat nach jedem Zyklus über ein Signal von fluoreszenzmarkierten Sonden (TaqManTM Gene Expression Assays) detektiert wird [148,149]. Zur Quantifizierung der Transkripte wurden 2-50 ng cDNA (in 4,5 μ l sterilem Wasser) pro Ansatz eingesetzt, sodass der C_T -Wert der Messung zwischen 20 und 35 lag. Dazu wurden im Gesamtvolumen von 10 μ l, 5 μ l TaqManTM Universal Master Mix UNG und 0,5 μ l der spezifischen Primer-Sonde-Kombination gegeben und nach dem Protokoll der Firma Applied Biosystems im Mastercycler amplifiziert. Im ersten Temperaturschritt (50 °C, 2 min) wurde die Uracil-N-Glykosylase (UNG) aktiviert, um Übertragungskontaminationen zu vermeiden. Anschließend erfolgten die Deaktivierung der UNG und Denaturierung der DNA-Stränge bei 95 °C für 10 min. Die Amplifizierung und Messung der Emission erfolgten in 40 Reaktionszyklen bei 95 °C für 15 s bzw. 60 °C für 1 min. Als interner Expressionsstandard wurde die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) mitgeführt und zur relativen Quantifizierung eingesetzt. Dabei wurden die C_T -Mittelwerte aus drei Messungen pro Probe ermittelt und mit dem C_T -Wert des HPRTs ins Verhältnis gesetzt ($\Delta C_T = C_{T(\text{Gen})} - C_{T(\text{HPRT})}$). Aus dem ΔC_T -Wert einer unbehandelten Probe (ΔC_{T1}) und einer behandelten Probe (ΔC_{T2}) wurde der $\Delta \Delta C_T$ -Wert ($= \Delta C_{T2} - \Delta C_{T1}$) gebildet. Der relative Expressionsunterschied (R) zwischen Probe 1 und 2 wurde letztendlich anhand der folgenden Formel berechnet: $R = 2^{-(\Delta C_{T2} - \Delta C_{T1})}$ [150].

R wurde in dieser Arbeit in Prozent zur Referenzprobe dargestellt. Zur qualitativen Analyse wurden 10 μ l des PCR-Ansatzes gelelektrophoretisch aufgetrennt (Kapitel 2.6.8), und anhand der Größe sowie der Menge der PCR-Produkte die Spezifität des Assays überprüft.

2.6.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die Elektrophorese dient zur Analyse von Nukleinsäuren (DNA- bzw. RNA-Fragmente), die größenabhängig im elektrischen Feld innerhalb eines Trägermaterials aufgetrennt werden. Die elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte in 1-2%igen Agarosegelen bei einer angelegten Spannung von 6-8 V/cm². Zur Herstellung der Agarosegele wurden 1-2 g Agarose mit 100 ml 1×TAE-Puffer gemischt, aufgeköcht und nach Zugabe von 2 μ l Ethidiumbromid (10 mg/ml) in den Gelträger gegossen. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der auf Grund seiner planaren Struktur in die

Nukleinsäuren interkaliert und deren Sichtbarmachung unter UV-Licht (254-366 nm) ermöglicht. Die Probe wurde im Verhältnis 2:1 mit DNA-Ladepuffer (Kapitel 2.1.2) versetzt und aufgetragen. Zusätzlich wurden 5 µl eines Größenstandards mitgeführt, um die Größe der DNA-Fragmente zu bestimmen.

Die Auftrennung von RNA erfolgte analog zur DNA, wobei 3%ige Gele zur Auftrennung eingesetzt wurden. Zudem wurde RNase-freies Wasser (DEPC-Wasser) zum Ansetzen des Puffers und des Standards eingesetzt. Diese Methode ermöglicht eine schnelle Analyse um die Intaktheit der RNA zu überprüfen. Die RNA wurde als nicht degradiert eingestuft, wenn die 28S- und 18S-rRNA deutlich scharf erkennbar waren und die Bande der 28S-rRNA stärker als die der 18S-rRNA war. Die Dokumentation der Gele erfolgte mittels Transilluminator.

2.6.9 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (Kapitel 2.6.8) erfolgte mittels High Pure PCR Cleanup Micro Kit. Dazu wurden die gewünschten DNA-Fragmente unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 300 µl *Binding Buffer* (Kit-Bestandteil) pro 100 mg Agarose und anschließender Erwärmung bei 56 °C für 10 min, wurde die DNA gelöst. Die Aufreinigung der DNA erfolgte durch Bindung an eine Silica-Membran und anschließendem Waschen mit 70% Ethanol. Zur DNA-Elution wurden 25 µl steriles Wasser eingesetzt.

2.6.10 Restriktion von DNA

Bei der Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen entstehen stumpfe Enden (*Blunt Ends*) oder kohäsive Enden (*Sticky Ends*) mit 3'- oder 5'-Überhängen. Für einen Reaktionsansatz von 1 µg DNA in 50 µl Reaktionsvolumen wurden 5-10 Units Restriktionsenzym, der entsprechende NEB-Puffer und gegebenenfalls BSA verwendet. Der gesamte Reaktionsansatz wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert und die geschnittene DNA zur Ligation (Kapitel 2.6.13) bzw. zur gelelektrophoretischen Analyse eingesetzt (Kapitel 2.6.8). Für anschließende Enzymreaktionen wurden die Restriktionsenzyme durch Hitze inaktiviert oder die DNA von überschüssigen Enzymen und Puffern gereinigt (Kapitel 2.6.12).

2.6.11 Herstellung von *Blunt End*-DNA-Molekülen

Zur Ligation von DNA-Fragmenten mit nicht kompatiblen Enden ist es notwendig *Blunt Ends* zu generieren. Dafür wurde die DNA-Polymerase I Large (Klenow) Fragment verwendet, die eine 5'→3'-Polymeraseaktivität und gleichzeitig eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität besitzt. Die Polymerase kann somit 5'-Überhänge auffüllen und 3'-Überhänge reduzieren. Für die Reaktion wurden 10 µl

Volumen aus der DNA-Gelextraktion (Kapitel 2.6.9), 400 μM dNTPs (je 100 μM dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 1 Unit DNA-Polymerase I Large (Klenow) Fragment und der entsprechende Enzympuffer eingesetzt. Der Ansatz wurde für 15 min bei 25 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 10 mM Na-EDTA zugegeben und die DNA-Polymerase I für 20 min bei 75 °C inaktiviert.

2.6.12 Reinigung von DNA

Um DNA aus enzymatischen Reaktionen oder PCR-Ansätzen von überschüssigen Enzymen, Puffern und Primern zu befreien, wurde das High Pure PCR Cleanup Micro Kit verwendet. Dieses Testsystem basiert auf der Adsorption von DNA an eine Silica-Membran, während überschüssige Substanzen die Membran passieren. Nach mehreren Waschschrinen erfolgte die DNA-Elution mit 30 μl sterilem Wasser.

2.6.13 Ligation von DNA mittels T4-DNA-Ligase

Bei der Ligation wurden geschnittene PCR-Produkte und Plasmide (Kapitel 2.6.10) bzw. *Blunt End*-DNA-Moleküle (Kapitel 2.6.11) mit Hilfe der T4-DNA-Ligase ligiert. Das Enzym katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen freien 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen der überhängenden DNA-Enden unter ATP-Verbrauch. Um die Ligation innerhalb eines Plasmids zu vermeiden, wurden diese gegebenenfalls 1 h mit einer alkalischen Phosphatase (CIP) behandelt, die die 5'-Phosphatgruppen entfernt. Ein Ligationsansatz enthielt 1 μl T4-DNA-Ligase, Ligationspuffer, 100 ng Plasmid-DNA und die dreifache molare Menge an Insert-DNA. Der Ansatz wurde auf ein Endvolumen von 10 μl eingestellt, ÜN bei 12 °C inkubiert und die Ligase anschließend durch Hitze inaktiviert. Nach erfolgter Ligation wurden 5-10 μl des Ansatzes in chemisch kompetente *E. coli*-XL-10-Gold transformiert (Kapitel 2.6.15).

2.6.14 Ligation von DNA in den TOPO[®]-Vektor

Für die Ligation von DNA in den Vektor pCR[®]4-TOPO[®] wurde das TOPO TA Cloning Kit[®] for Sequencing verwendet. PCR-Amplifikate, die mit überhängenden Adenosinen ausgestattet waren, konnten mittels vektorassoziierter Topoisomerase I ligiert werden. Für die Reaktion wurden 2 μl PCR-Amplifikat, 1 μl Salzlösung und 1 μl Vektor in 6 μl Gesamtvolumen für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation (Kapitel 2.6.15) in chemisch kompetente *E. coli*-TOP10-Zellen.

2.6.15 Transformation von kompetenten *E.coli*-Zellen

Die Aufnahme von freier DNA in kompetente Zellen wird als Transformation bezeichnet. Dafür wurden 100 µl chemisch kompetente *E. coli*-XL-10-Gold bzw. *E. coli*-TOP10 bei RT aufgetaut, bis der Eiskern gerade geschmolzen war und für 10 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden 5-10 µl Ligationsprodukt (Kapitel 2.6.13 bzw. 2.6.14) zugegeben und weitere 45 min inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 30-60 s im Wasserbad erfolgte das Abkühlen der Zellen für 2 min auf Eis. Die Zellsuspension wurde danach mit 900 µl LB-Medium versetzt und im quer gestellten Reaktionsgefäß für 60 min bei 37 °C und 140 rpm sanft geschüttelt. Nach anschließender Zentrifugation (5000×g, 5 min) wurden die Zellen in geeigneter Verdünnung auf Agarplatten mit Ampicillin (100 µg/ml; LB/Amp-Platten) ausplattiert und ÜN bei 37 °C inkubiert. Für spätere Klonierungsreaktionen erfolgte die Überführung einzelner Kolonien in 5 ml LB/Amp-Medium (100 µg/ml) und eine Inkubation ÜN mit darauf folgender Plasmidisolierung (Kapitel 2.6.3).

2.6.16 Herstellung von chemisch kompetenten *E.coli*

Kompetente Zellen können fremde lineare oder zirkuläre DNA aus ihrer Umgebung aufnehmen. Zur Herstellung der chemisch kompetenten Zellen (*E. coli*-XL-10-Gold) wurden diese zunächst auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und ÜN bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde eine Kolonie gepickt, in 5 ml LB-Medium überführt und bei 37 °C ÜN geschüttelt. 2 ml dieser Übernachtskultur wurden anschließend in 250 ml vorgewärmtes LB-Medium überführt und ca. 2-3 h bei 37 °C und 225 rpm bis zum Beginn der logarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀ von 0,5) vermehrt. Im Anschluss wurde die Bakterienkultur in vorgekühlte 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, für 10 min auf Eis inkubiert und für 5 min zentrifugiert (3000×g, 4 °C). Nach Resuspendierung des Pellets in 50 ml steriler, eiskalter 100 mM MgCl₂-Lösung, wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (5 min, 3000×g, 4 °C), in 50 ml eiskalte 100 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen und für 20 min auf Eis stehen gelassen. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt. Das daraus resultierende Zellpellet wurde in 5 ml eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung mit 15% Glycerin resuspendiert, im Volumen zu 100 µl in vorgekühlte Eppendorfgefäße aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.6.17 Kryokonservierung von *E.coli*-Kulturen

Um Bakterienkulturen zu konservieren, wurden diese ÜN bei 37 °C in LB/Amp-Medium angezogen. Davon wurden 800 µl entnommen, mit 70 µl DMSO versetzt, sofort gemischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.6.18 Plasmid-Konstruktion

2.6.18.1 pLuc

Zur Konstruktion des Kontrollplasmids pLuc wurde das Ausgangsplasmid pAd5TetO₇[HRE]AFP-Luc [151] verwendet (Abb. 2.5). Es enthielt bereits das benötigte Luziferasegen (Luc). Um die vorgeschalteten, unnötigen Sequenzen Ad5TetO₇[HRE]AFP zu eliminieren, wurde das Plasmid zunächst mit *Bam*HI geschnitten (Kapitel 2.6.10) und religiert (Kapitel 2.6.13). Dabei wurden die Sequenzen [HRE]AFP entfernt. Anschließend erfolgten weitere Restriktionen mit *Aat*II und *Kpn*I, um letztendlich Ad5TetO₇ zu eliminieren. Nach dem Verdau wurden mit Hilfe einer DNA-Polymerase I Large (Klenow) *Blunt Ends* generiert (Kapitel 2.6.11) und das Plasmid religiert. Eine Kontrollrestriktion mit *Bam*HI und *Not*I bestätigte die erfolgreiche Ligation. Das Kontrollplasmid wurde als **pLuc** bezeichnet.

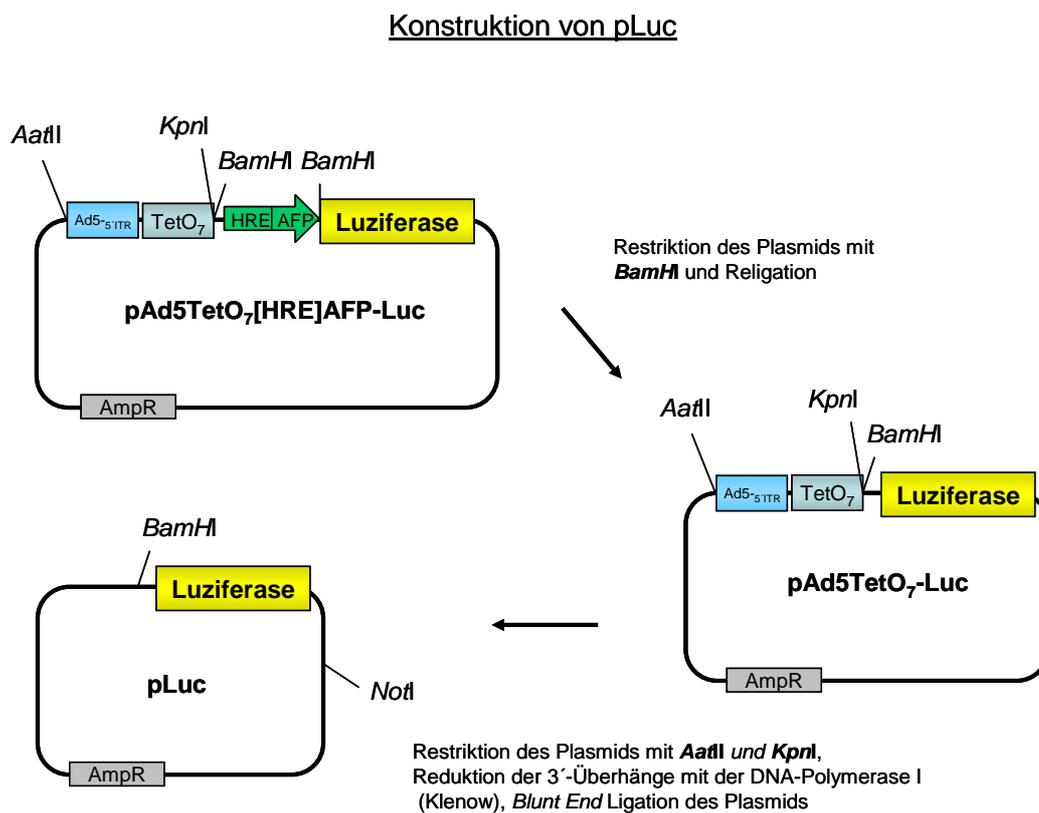


Abb. 2.5: Klonierungsschema für pLuc. Genaue Erklärungen siehe Text. Die Sequenzen Ad5-₅ITR, TetO₇ und [HRE]AFP waren im Ausgangsplasmid enthalten [151]. Sie wurden für die Experimente dieser Studie eliminiert. Luziferase: Luziferase-Reportergen, AmpR: Ampicillin-Resistenz.

2.6.18.2 pANT1Pro^{1.5}-Luc

Für die Konstruktion von pANT1Pro^{1.5}-Luc wurde mit Hilfe einer PCR (Kapitel 2.6.5) die Expressionskassette eines 1,5 kB-Fragments des ANT1-Promotors amplifiziert (Nukleotide -1391 bis +108 relativ zum Transkriptionsstart). Dafür wurden der Forward-Primer ANT1(*KpnI*)-F und Reverse-Primer ANT1(*BamHI*)-R eingesetzt, sowie genomische Maus-DNA als Template verwendet (Kapitel 2.1.6.1 und 2.1.6.2) (Abb. 2.6).

Konstruktion von pANT1Pro^{1.5}-Luc

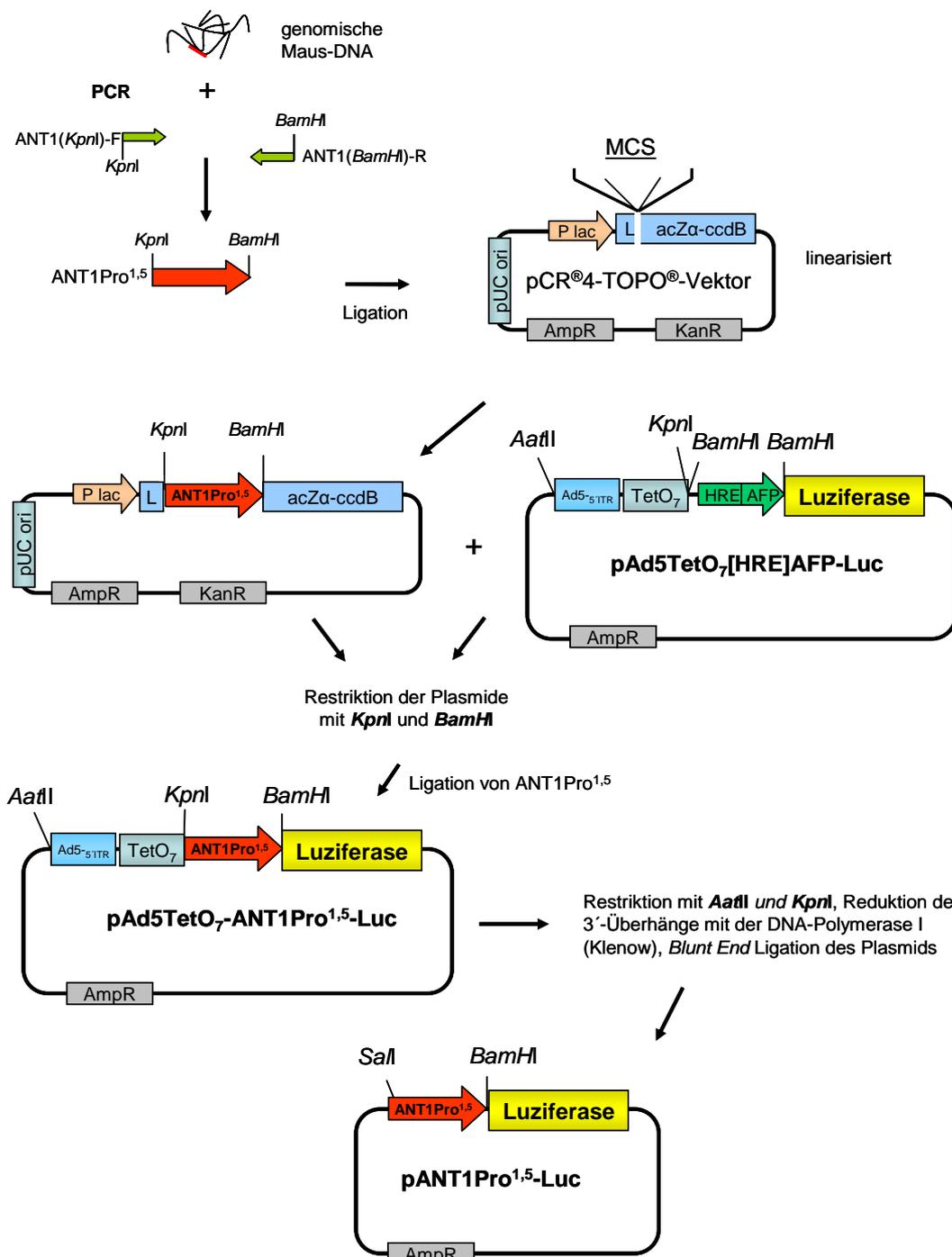


Abb. 2.6: Klonierungsschema für pANT1Pro^{1.5}-Luc. Genaue Erklärungen siehe Text. Die Sequenzen Ad5-₅TTR, TetO₇ und [HRE]AFP waren im Ausgangsplasmid enthalten [151] und wurden für die Experimente dieser Studie eliminiert. *P lac*: Lac-Promotor mit dem Fusionsgen LacZα-ccdB, KanR: Kanamycin-Resistenz, MCS: *Multiple Cloning Site*.

Das PCR-Produkt wurde anschließend in den pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor ligiert (Kapitel 2.6.14), in *E.coli* amplifiziert, die Plasmide isoliert und vorab mit den PCR-Primern ANT1(*KpnI*)-F und ANT1(*BamHI*)-R sequenziert (Kapitel 2.6.19). Anschließend wurde sowohl der TOPO[®]-Vektor mit inseriertem ANT1-Promotorfragment, als auch das Ausgangsplasmid pAd5TetO₇[HRE]AFP-Luc mit *KpnI* und *BamHI* geschnitten. Die darauf folgende Ligation ergab das Plasmid pAd5TetO₇-ANT1Pro^{1.5}-Luc. Um nun die Sequenz Ad5TetO₇ zu eliminieren, erfolgte eine Restriktion mit *AatII* und *KpnI*, wobei inkompatible DNA-Enden entstanden. Mit Hilfe der DNA-Polymerase I Large (Klenow) wurden *Blunt Ends* generiert (Kapitel 2.6.11) und die Plasmidenden religiert (Kapitel 2.6.13). Eine Kontrollrestriktion mit *BamHI* und *SalI* sowie die abschließende Sequenzierung bestätigten die Richtigkeit des Plasmids **pANT1Pro^{1.5}-Luc**.

2.6.18.3 pANT1Pro⁴-Luc

Zur Herstellung des Plasmids pANT1Pro⁴-Luc, der 4 kB des murinen ANT1-Promotors enthielt, wurde mittels PCR ein 2,5 kB-Promotorfragment amplifiziert (Nukleotide -2488 bis -1389 relativ zum Transkriptionsstart) und vor den bereits vorhandenen 1,5 kB-ANT1-Promotor des Plasmids pAd5TetO₇-ANT1Pro^{1.5}-Luc ligiert (Kapitel 2.6.18.2). Zur Amplifikation des Promotorfragments wurden der Forward-Primer ANT1(2,5 *AatII*)-F, Reverse-Primer ANT1(2,5 *KpnI*)-R sowie genomische Maus-DNA eingesetzt (Kapitel 2.1.6.1 und 2.1.6.2).

Das PCR-Produkt wurde zunächst in den pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor ligiert (Kapitel 2.6.14) und mit Hilfe der verwendeten PCR-Primer sequenziert (Kapitel 2.6.19). Anschließend wurden die Plasmide pAd5TetO₇-ANT1Pro^{1.5}-Luc und der TOPO[®]-Vektor mit inseriertem 2,5 kB-ANT1-Fragment einer Restriktion mit *AatII* und *KpnI* unterzogen (Kapitel 2.6.10). Dabei wurde die Sequenz Ad5TetO₇ aus dem Zielpasmid eliminiert. Nach erfolgter Ligation des Inserts entstand das Plasmid pANT1Pro⁴-Luc. Eine Kontrollrestriktion mit *AatII* und *KpnI* sowie die abschließende Sequenzierung des kompletten Inserts bestätigten die Richtigkeit des Plasmids **pANT1Pro⁴-Luc**.

Konstruktion von pANT1Pro⁴-Luc

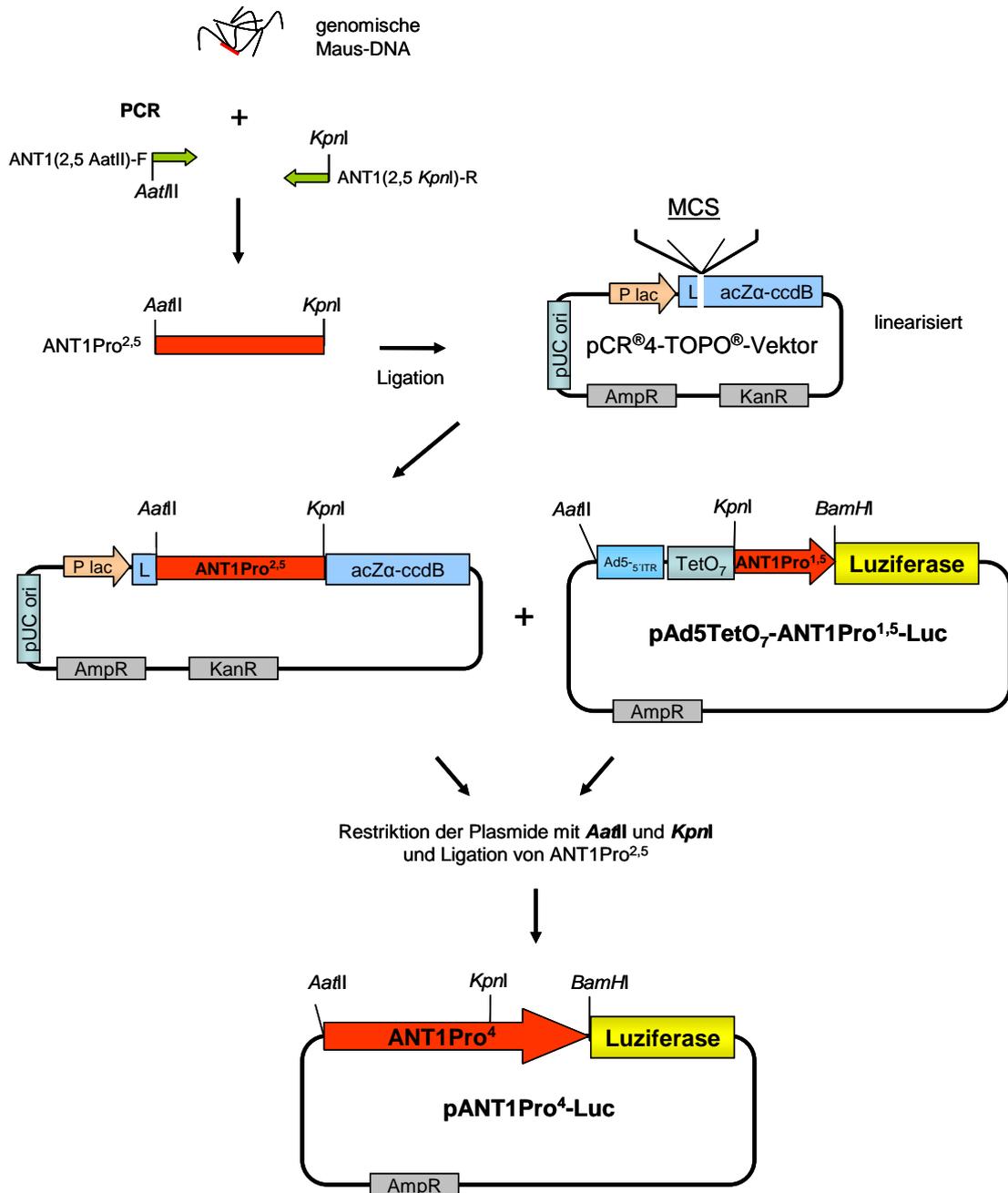


Abb. 2.7: Klonierungsschema für pANT1Pro⁴-Luc. Genaue Erklärungen siehe Text.

2.6.19 Sequenzierung

Sequenzanalysen der konstruierten Plasmide wurden von der Firma SeqLab aus Göttingen durchgeführt. Die Proben enthielten 600 ng Plasmid-DNA, 20 pmol der zur Klonierung verwendeten Primer und steriles Wasser im Volumen von 7 μ l. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte unter Verwendung des Programms Chromas Lite 2.01 und der Datenbank GenBank.

2.7 Statistische Evaluierungen

Der statistische Vergleich zweier Gruppen erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney U-Tests. Sind mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen worden, so wurde der einfaktorielle ANOVA-Test bzw. der Kruskal-Wallis-Test angewandt (Programm Graphpad Prism). Bei der Überprüfung von Häufigkeitsverteilungen wurde der Chi-Quadrat-Test eingesetzt. Statistische Signifikanz wurde bei p-Werten, die kleiner als 0,05 waren, angenommen. Alle Angaben erfolgten als Mittelwert \pm SEM.

3. Ergebnisse

3.1 Kardioprotektive Wirkung von ANT1 bei Hypoxie

Hypoxie führt zu zahlreichen Veränderungen in der Zelle. In eigenen Vorversuchen wurde festgestellt, dass NRCM nach 24 h bzw. 48 h Hypoxie (akuter bzw. chronischer Hypoxie) gravierende Regulationsunterschiede auf Protein- und Aktivitätsebene aufwiesen, sodass diese Zeitpunkte für die folgenden Hypoxie-Experimente gewählt wurden.

3.1.1 Intrazellulärer ATP-Gehalt

Hypoxie vermindert die Funktionalität der mitochondrialen Atmungskette und reduziert dadurch die ATP-Produktion. Wie in Abb. 3.1 zu sehen ist, nahm der ATP-Gehalt in den WT-NRCM nach 24 h und 48 h Hypoxie, im Vergleich zum normoxischen WT, stetig ab. In den ANT1-NRCM blieb der ATP-Gehalt, im Vergleich zum normoxischen ANT1, nach 24 h Hypoxie unbeeinflusst und wurde erst nach 48 h reduziert. Nach 48 h war ein signifikanter Unterschied zwischen der WT- und ANT1-Gruppe erkennbar. Generell waren zwischen WT_{Normoxie 24 h} und WT_{Normoxie 48 h} bzw. ANT1_{Normoxie 24 h} und ANT1_{Normoxie 48 h} in den gemessenen Parametern keine Unterschiede zu beobachten, sodass die Gruppen jeweils als eine Kontrollgruppe dargestellt wurden.

Insgesamt zeigten die Ergebnisse, dass ANT1-NRCM zwar basal einen niedrigeren ATP-Gehalt besaßen, der jedoch über 24 h Hypoxie konstant blieb und nur langsam reduziert wurde.

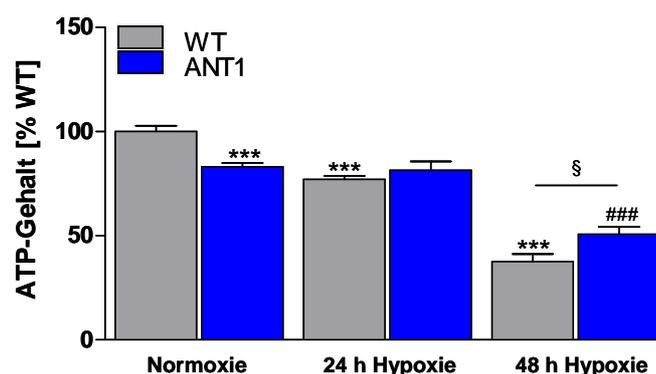


Abb. 3.1: ATP-Gehalt in NRCM bei Hypoxie. WT- und ANT1-NRCM wurden unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen für 24 h bzw. 48 h kultiviert. Die ATP-Messungen im Zelllysat erfolgten mit Hilfe eines Lumineszenz-Assays. Die Daten zeigen den ATP-Gehalt in Prozent zum normoxischen WT. *** $p < 0,001$ vs. WT (Normoxie); ### $p < 0,001$ vs. ANT1 (Normoxie); § $p < 0,05$ vs. entsprechender Hypoxie-Bedingung; $n = 6-12$.

3.1.2 Expression von ANT

Um zu überprüfen inwieweit die Expression von ANT bei Hypoxie beeinflusst wird, wurden die ANT-Proteinmengen mittels Western-Blot-Analyse bestimmt. Die ANT1-NRCM besaßen durchschnittlich 25,0% mehr ANT-Protein bei Normoxie und 24 h Hypoxie im Vergleich zum jeweiligen WT (Abb. 3.2). Nach 48 h Hypoxie stieg der ANT-Gehalt in den ANT1-NRCM, im Vergleich zum normoxischen ANT1, um weitere 37,5% an. Auch die WT-NRCM wiesen nach 48 h Hypoxie eine signifikante ANT-Erhöhung um $86,0 \pm 12,0\%$ auf.

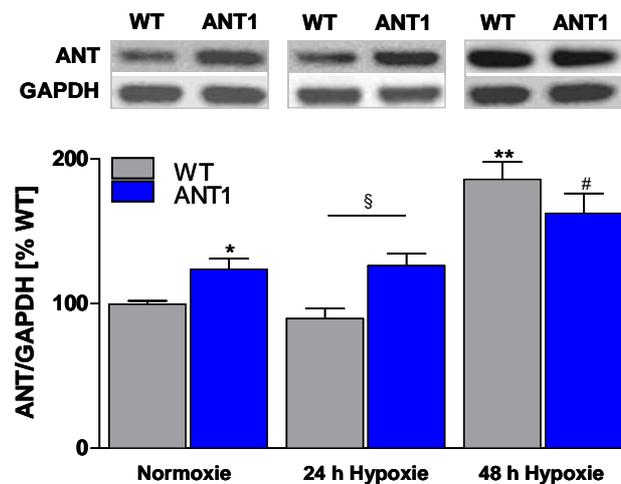


Abb. 3.2: Expression von ANT bei Hypoxie. WT- und ANT1-NRCM wurden unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen für 24 h bzw. 48 h kultiviert. ANT wurde im Zellextrakt der NRCM mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen. Im oberen Teil der Abb. sind exemplarisch Western-Blots dargestellt. Die Grafik im unteren Teil zeigt die Proteinmengen in Prozent zum normoxischen WT. Die Quantifizierung von ANT erfolgte in Relation zu GAPDH. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. WT (Normoxie); # $p < 0,05$ vs. ANT1 (Normoxie); § $p < 0,05$ vs. entsprechender Hypoxie-Bedingung; $n = 5-12$.

3.1.3 Bildung von ROS

Mitochondriale Dysfunktionen und andere intrazelluläre Schädigungen verstärken die Bildung von ROS, die mit Hilfe des Fluoreszenzindikators DCFH-DA gemessen wurden. Die WT-NRCM verfügten bei Hypoxie insgesamt über mehr ROS, als die gleichbehandelten ANT1-NRCM (Abb. 3.3). Letztere zeigten, im Vergleich zum normoxischen ANT1, erst nach 48 h Hypoxie eine signifikante ROS-Erhöhung.

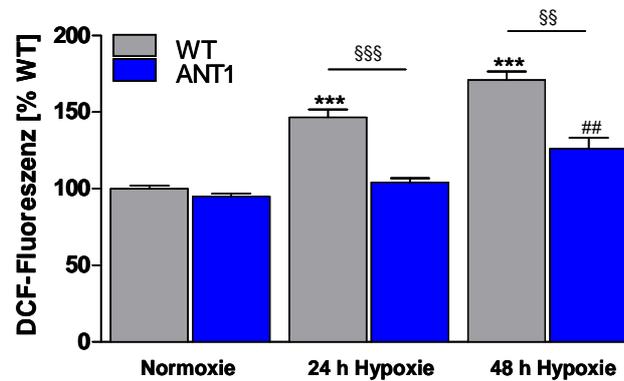


Abb. 3.3: ROS-Produktion bei Hypoxie. WT- und ANT1-NRCM wurden unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen für 24 h bzw. 48 h kultiviert. Nach Zugabe des Fluoreszenzindikators DCFH-DA, wurde die Menge an gebildetem ROS fluorometrisch ermittelt. Die Daten zeigen die DCF-Fluoreszenz in Prozent zum normoxischen WT. *** $p < 0,001$ vs. WT (Normoxie); ## $p < 0,01$ vs. ANT1 (Normoxie); §§ $p < 0,01$, §§§ $p < 0,001$ vs. entsprechender Hypoxie-Bedingung; $n = 5-10$.

3.1.4 Aktivierung des antioxidativen Stress-Systems

Um zu ermitteln, inwieweit das antioxidative Stress-System bei erhöhter ROS-Produktion aktiviert wird, wurden die Katalase und MnSOD2 mittels Western-Blot-Analyse quantifiziert (Abb. 3.4 A und B). Beide Enzyme wurden in den WT-NRCM nach 48 h Hypoxie um 40,2% hochreguliert. In den ANT1-NRCM war zu keinem Zeitpunkt der Hypoxie eine höhere Expression messbar.

Ob neben den Enzymexpressionen auch veränderte Enzymaktivitäten auftraten, wurde anhand der Katalaseaktivität gemessen (Abb. 3.4 C). Diese war in den WT-NRCM nach 24 h Hypoxie um $9,5 \pm 3,3\%$ und nach 48 h um $51,5 \pm 4,0\%$ erhöht. Demzufolge wurde zunächst die spezifische Enzymaktivität gesteigert und erst später die Proteinmenge erhöht. Die Katalaseaktivität der ANT1-NRCM war nicht verändert.

Zusammenfassend war zu beobachten, dass hypoxische WT-NRCM, parallel zur erhöhten ROS-Produktion, die Aktivität und Expression der antioxidativen Stress-Enzyme steigerten. In den hypoxischen ANT1-NRCM war die ROS-Produktion sehr gering und das antioxidative Stress-System nicht aktiviert.

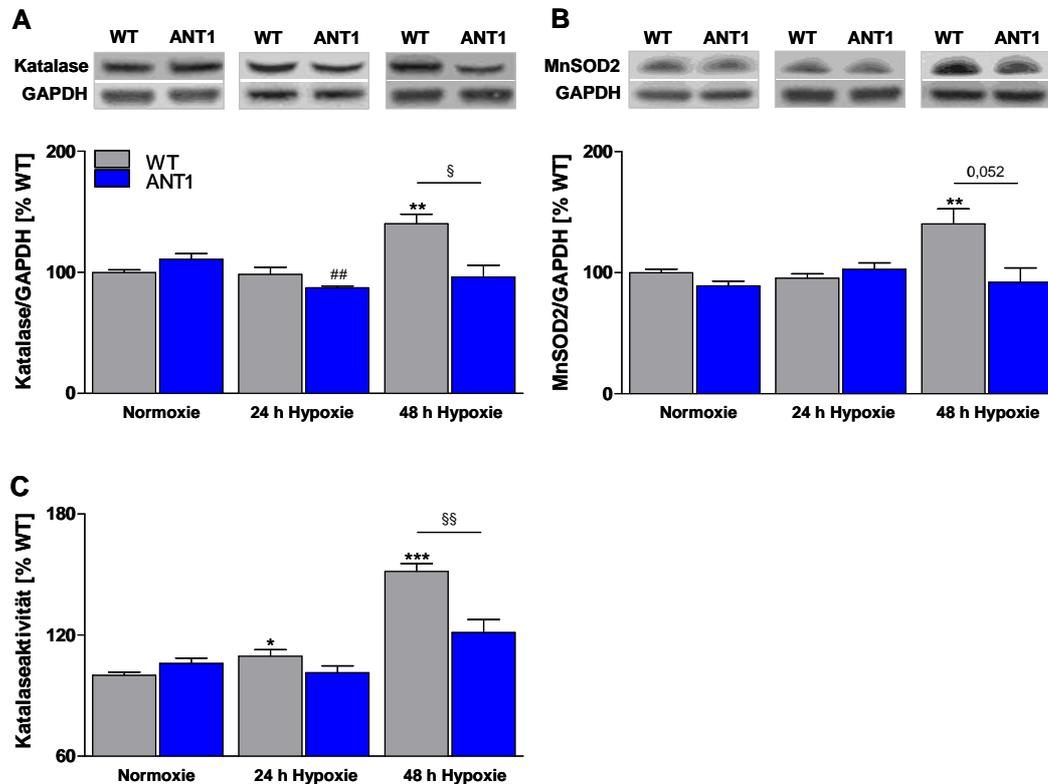


Abb. 3.4: Expression und Aktivität von antioxidativen Stress-Enzymen bei Hypoxie. WT- und ANT1-NRCM wurden unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen für 24 h bzw. 48 h kultiviert. Die Expression von (A) Katalase und (B) MnSOD2 wurden im Zellextrakt der NRCM mittels Western-Blot analysiert. Im oberen Teil der Abb. sind exemplarisch Western-Blots dargestellt. Die Grafik im unteren Teil zeigt die Proteinmengen in Prozent zum normoxischen WT. Die Quantifizierung erfolgte in Relation zu GAPDH; n=5-12. (C) Bestimmung der Katalaseaktivität im Zellextrakt der NRCM; n=6-18. * p<0,05, ** p<0,01, *** p≤0,001 vs. WT (Normoxie); ## p<0,01 vs. ANT1 (Normoxie); § p<0,05, §§ p<0,01 vs. entsprechender Hypoxie-Bedingung.

3.1.5 Nekrotische Zellerstörung

Eine erhöhte ROS-Produktion und ATP-Mangel führen zur Zellerstörung. Um das Ausmaß der nekrotischen Zellschädigung zu analysieren, wurde die LDH-Aktivität, als Maß der LDH-Freisetzung, im Zellmedium gemessen. Insgesamt wiesen die ANT1-NRCM wesentlich weniger nekrotische Zellerstörungen auf, als die gleichbehandelten WT-NRCM. Schon bei Normoxie war die Nekroserate der ANT1-NRCM um 31,5% reduziert (100,0±5,4% vs. 68,5±2,2%; Abb. 3.5). Nach 24 h Hypoxie stieg die nekrotische Zellerstörung der ANT1-NRCM um das Doppelte an, während die WT-NRCM eine 3,5-fache Erhöhung aufwiesen. Nach 48 h Hypoxie zeigten die WT-NRCM eine weitere

Steigerung der nekrotischen Zellzerstörung um 39,9%. Die Nekroserate der ANT1-NRCM blieb dagegen unverändert.

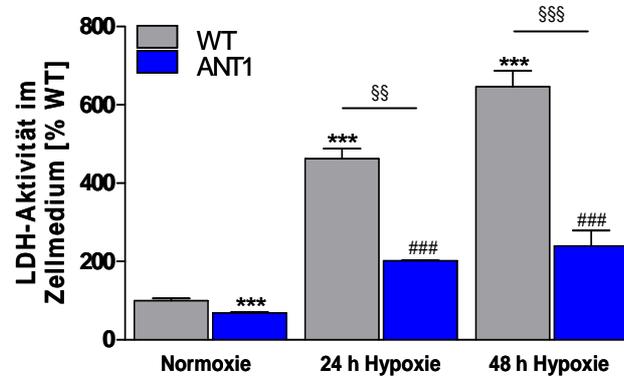


Abb. 3.5: Nekrotische Zellzerstörung bei Hypoxie. WT- und ANT1-NRCM wurden unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen für 24 h bzw. 48 h kultiviert. Die Messung der LDH-Aktivität im Medium, als Marker für nekrotische NRCM, erfolgte mittels fluorimetrischem Test. Angegeben ist die LDH-Aktivität im Medium in Prozent zum normoxischen WT. *** $p < 0,001$ vs. WT (Normoxie); ### $p < 0,001$ vs. ANT1 (Normoxie); §§ $p < 0,01$, §§§ $p < 0,001$ vs. entsprechender Hypoxie-Bedingung; $n = 6-18$.

3.1.6 Apoptotische Zellzerstörung

Ob apoptotische Prozesse bei der Zellzerstörung eine Rolle spielen, wurde zunächst anhand der Caspase-3/7-Aktivität ermittelt. Für die WT-NRCM konnte zu beiden Hypoxiezeitpunkten ein signifikanter Aktivitätsanstieg von durchschnittlich 34,7% gemessen werden. Die Aktivitätserhöhung in den hypoxischen ANT1-NRCM betrug im Durchschnitt 13,2% im Vergleich zum normoxischen ANT1 (Abb. 3.6). Diese Werte zeigten deutlich, dass die Caspasen der ANT1-NRCM wesentlich inaktiver waren, als die der WT-NRCM.

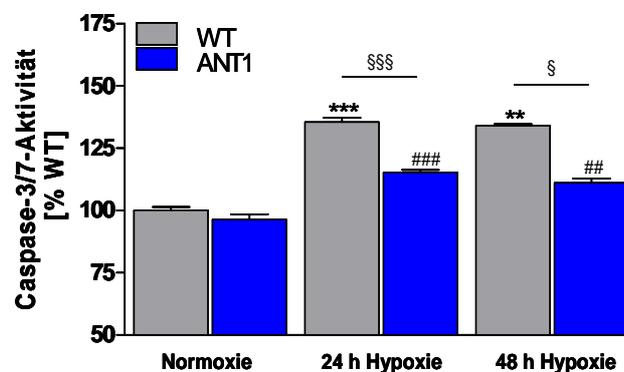


Abb. 3.6: Caspase-3/7-Aktivität in NRCM bei Hypoxie. WT- und ANT1-NRCM wurden unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen für 24 h bzw. 48 h kultiviert. Die Messung der intrazellulären Caspase-3/7-

Aktivität als Marker für apoptotische Zellzerstörung erfolgte mit Hilfe von fluorimetrischen Tests. Angegeben ist die Aktivität in Prozent zum normoxischen WT. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. WT (Normoxie); ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs. ANT1 (Normoxie); § $p < 0,05$, §§§ $p < 0,001$ vs. entsprechender Hypoxie-Bedingung; $n = 4-12$.

Aktivierte Caspasen leiten über DNasen die Fragmentierung von nuklearer DNA ein. Diese wurde mit Hilfe der TUNEL-Färbung detektiert, um dadurch apoptotische Nuklei der NRCM zu visualisieren. Die Apoptoserate der WT- und ANT1-NRCM lag bei Normoxie jeweils bei 17,3% bzw. 17,8% (Abb. 3.7 A und B). Nach 24 h Hypoxie stieg die Anzahl an apoptotischen WT-NRCM signifikant auf 36,7% an, während die ANT1-NRCM noch keine Zunahme zeigten. Nach 48 h blieb die Apoptoserate der WT-NRCM unverändert hoch, die der ANT1-NRCM stieg auf 23,8% an. Auch diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass hypoxische ANT1-NRCM insgesamt wesentlich weniger Apoptose auslösen.

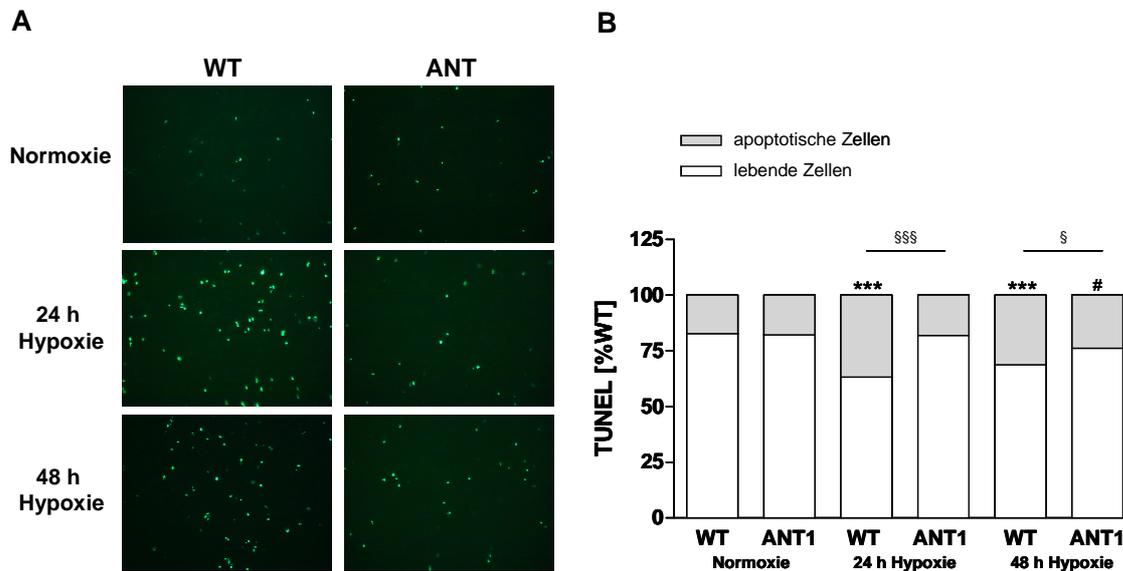


Abb. 3.7: Detektion von apoptotischen Nuklei mittels TUNEL-Färbung. WT- und ANT1-NRCM wurden unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen für 24 h bzw. 48 h kultiviert. (A) Fragmentierte DNA im Nukleus wurde mit Fluoreszein markiert und im Fluoreszenzmikroskop bei 20-facher Vergrößerung sichtbar gemacht. (B) Ausgezählt wurden $n = 350-550$ NRCM pro Gruppe. Die Anteile der apoptotischen und lebenden NRCM wurden in Prozent zum normoxischen WT angegeben. *** $p < 0,001$ vs. WT (Normoxie); # $p < 0,05$ vs. ANT1 (Normoxie); § $p < 0,05$, §§§ $p < 0,001$ vs. entsprechender Hypoxie-Bedingung.

3.1.7 Nekrotische und apoptotische Zellzerstörung in Gegenwart von H₂O₂

Um zu überprüfen, ob die ANT1-NRCM auch bei direktem oxidativen Stress weniger Nekrose und Apoptose aufweisen, wurden die Zellen für 24 h mit 10 µM H₂O₂ inkubiert und die zelluläre Caspase-3/7-Aktivität und LDH-Aktivität im Zellmedium gemessen. Beide Ergebnisse zeigten deutlich, dass WT-NRCM in Gegenwart von H₂O₂ eine höhere Nekrose- und Apoptoserate aufwiesen, als die gleichbehandelten ANT1-NRCM (Abb. 3.8 A und B). Diese reagieren somit wesentlich unempfindlicher auf oxidative Einflüsse wie H₂O₂. Die ANT1-Kontrollgruppe zeigte parallel zu den normoxischen ANT1-NRCM eine signifikant niedrigere Nekrose- und Apoptoserate (vgl. Abb. 3.5).

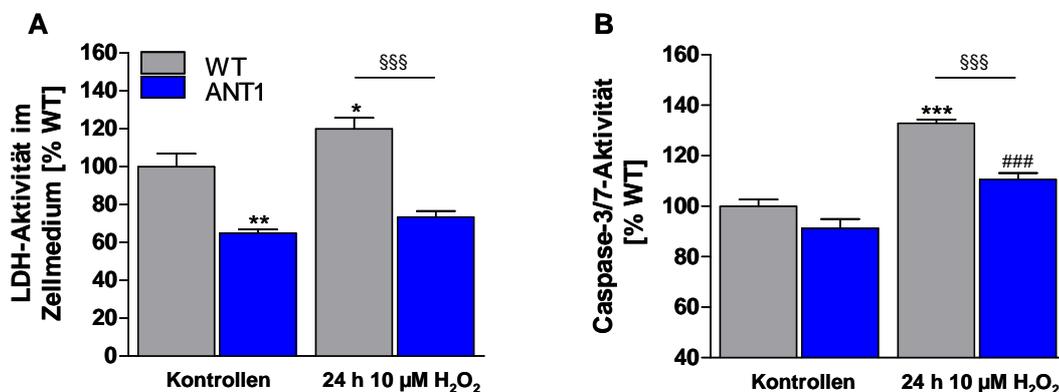


Abb. 3.8: Nekrotische und apoptotische Zellschädigungen in Gegenwart von H₂O₂. WT- und ANT1-NRCM wurden für 24 h mit 10 µM H₂O₂ inkubiert. Anschließend erfolgten die Messungen der LDH-Aktivität im Zellmedium und der Caspase-3/7-Aktivität in den NRCM. Angegeben sind die Aktivitäten in Prozent zum unbehandelten WT. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 vs. WT (Kontrolle); ### p<0,001 vs. ANT1 (Kontrolle); §§§ p<0,001 vs. H₂O₂-Bedingung; n=8-10.

3.1.8 Aktivierungen von ERK1/2

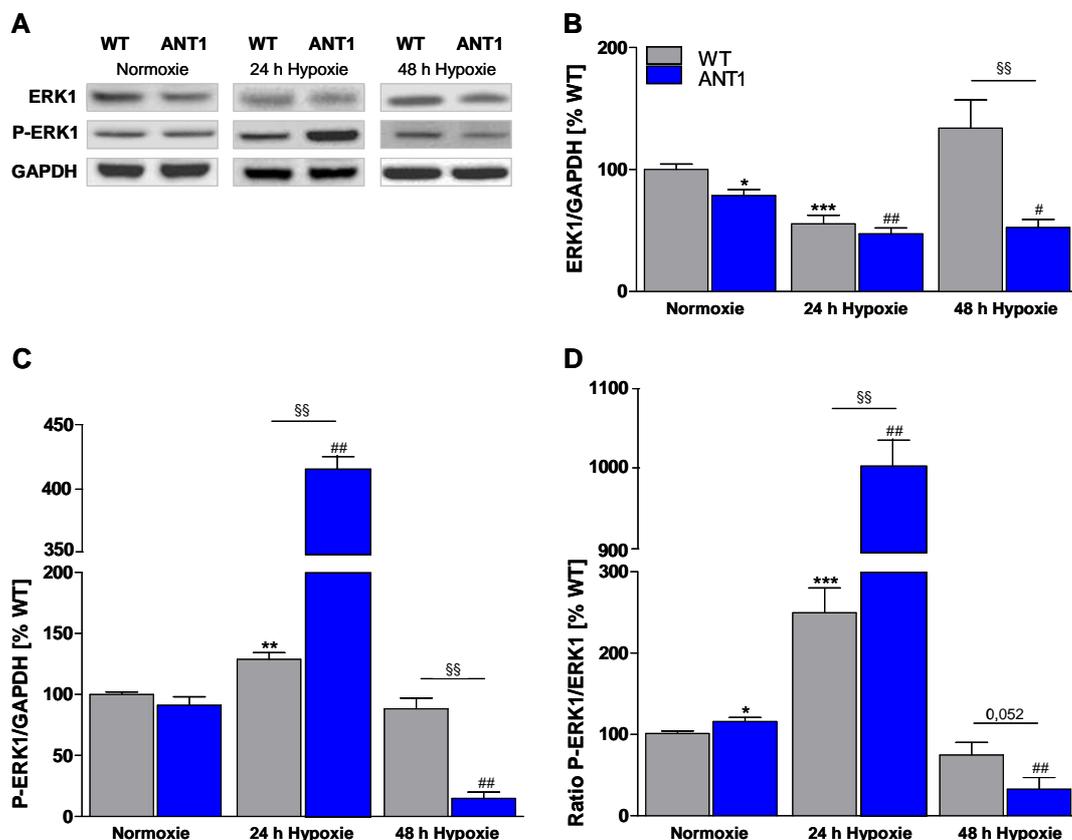
Die Untersuchungen haben bislang ergeben, dass ANT1-NRCM bei Hypoxie und in Gegenwart von H₂O₂ wesentlich besser geschützt sind und weniger Nekrose und Apoptose aufweisen als die gleichbehandelten WT-NRCM. Da die ERK1/2- und Akt-Signalwege eine entscheidende Rolle in diesen Prozessen spielen, wurden die Aktivierungen dieser Kinasen im Folgenden untersucht.

Die Aktivierungen der ERK1/2-Kinasen erfolgen durch übergeordnete MEK1/2-Kinasen, die ERK1/2 an Thr²⁰² und Tyr²⁰⁴ phosphorylieren. Die Phosphorylierungen von ERK1/2 (P-ERK1/2), sowie die gesamte ERK1/2-Proteinmenge, konnten mit Hilfe von spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Insgesamt war zu beobachten, dass die Aktivierungen der beiden Kinasen ERK1 und ERK2 ähnlich verliefen (Abb. 3.9).

Die Gesamt-ERK1-Proteinmenge, dargestellt in Abb. 3.9 B, nahm nach 24 h Hypoxie in den WT- und ANT1-NRCM, im Vergleich zur jeweiligen Normoxiegruppe, signifikant ab, normalisierte sich in den WT-NRCM nach 48 h und blieb in den ANT1-NRCM signifikant erniedrigt. Die ANT1-NRCM besaßen auch bei Normoxie weniger Gesamt-ERK1. Im Unterschied dazu blieb die Gesamt-ERK2-Proteinmenge in den ANT1-NRCM bei Normoxie und 24 h Hypoxie unverändert (Abb. 3.9 F).

Die Aktivierungen der ERK1/2-Kinasen (P-ERK1/2) erfolgten hauptsächlich in den ANT1-NRCM. Diese wiesen nach 24 h Hypoxie eine Zunahme von $341,1 \pm 24,2\%$ bzw. $298,4 \pm 17,8\%$ auf (Abb. 3.9 C und G). Nach 48 h Hypoxie nahmen die Phosphorylierungen beider Proteine drastisch ab. In den WT-NRCM war nur eine geringe Aktivierung von ERK1 nach 24 h Hypoxie messbar ($28,7 \pm 5,6\%$).

Die gebildeten Verhältnisse aus P-ERK1 zu Gesamt-ERK1 bzw. P-ERK2 zu Gesamt-ERK2 spiegeln den jeweiligen Phosphorylierungsstatus von ERK1 und ERK2 in der Zelle wieder (Abb. 3.9 D und H). Besonders auffällig waren erneut die starken Erhöhungen in den ANT1-NRCM nach 24 h Hypoxie. Die geringe Zunahme an aktiviertem ERK1 in normoxischen ANT1-NRCM war nicht durch eine Erhöhung von P-ERK1 zu erklären, sondern kam aufgrund der reduzierten Gesamt-ERK1-Proteinmenge zustande. Dies wurde auch für ERK2 in den WT-NRCM nach 24 h Hypoxie beobachtet.



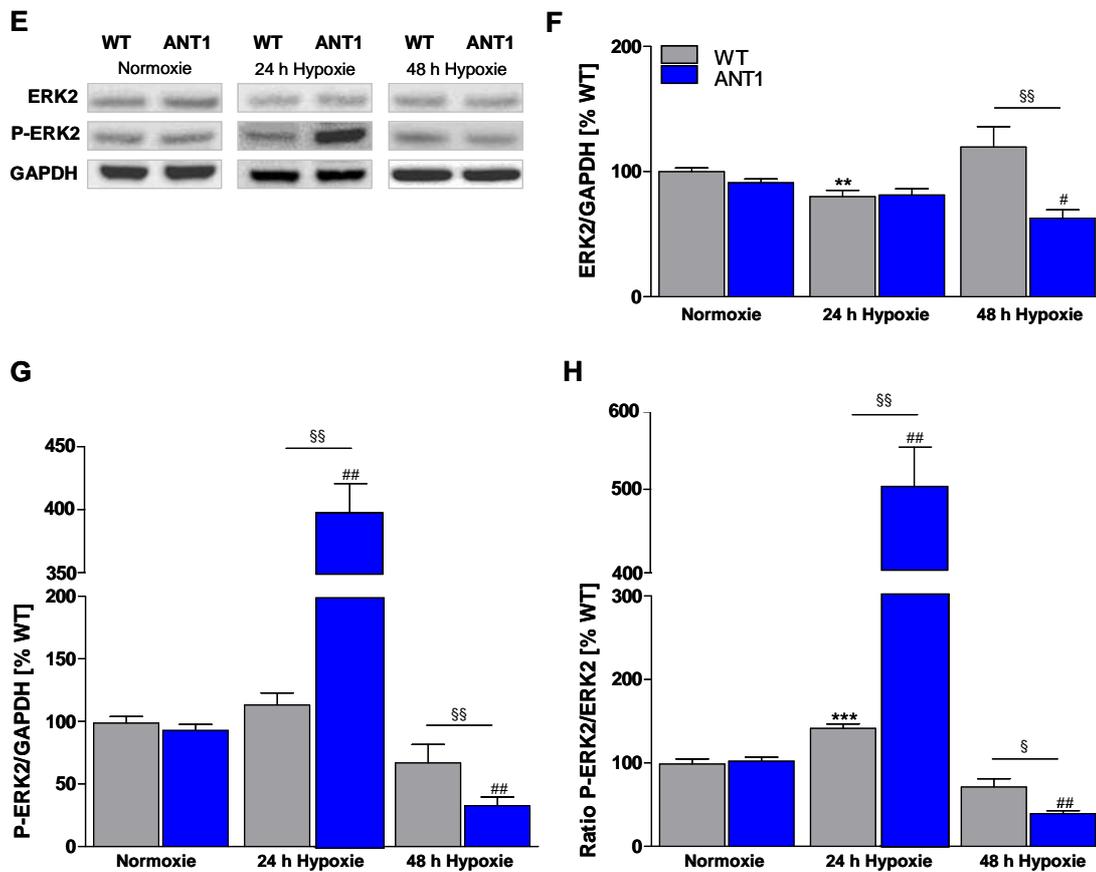


Abb. 3.9: Ausmaß der ERK1/2-Aktivierungen bei Hypoxie. WT- und ANT1-NRCM wurden unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen für 24 h bzw. 48 h kultiviert. Die Proteine wurden im Zellextrakt der NRCM mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen. (A und E) Exemplarisch dargestellte Western-Blots. (B und F bzw. C und G) Graphische Darstellung der Proteinmengen von Gesamt-ERK1/2 bzw. P-ERK1/2 in Prozent zum normoxischen WT. Die Quantifizierung erfolgte in Relation zu GAPDH. (D und H) Ermitteltes Verhältnis von P-ERK1/2 zu Gesamt-ERK1/2. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p \leq 0,001$ vs. WT (Normoxie); # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ vs. ANT1 (Normoxie); § $p < 0,05$, §§ $p < 0,01$ vs. entsprechender Hypoxie-Bedingung; $n = 5-11$.

3.1.9 Aktivierung von Akt

Um die Aktivierung von Akt zu untersuchen, wurde auch hier Gesamt-Akt und phosphoryliertes Akt (P-Akt) mittels Western-Blot-Analyse bestimmt.

Die Gesamt-Akt-Proteinmenge, dargestellt in Abb. 3.10 B, nahm in den WT-NRCM im Verlauf der Hypoxie kontinuierlich ab. In den ANT1-NRCM war das Akt-Level bei Normoxie signifikant reduziert, blieb jedoch nach einer weiteren Abnahme bei 24 h Hypoxie konstant.

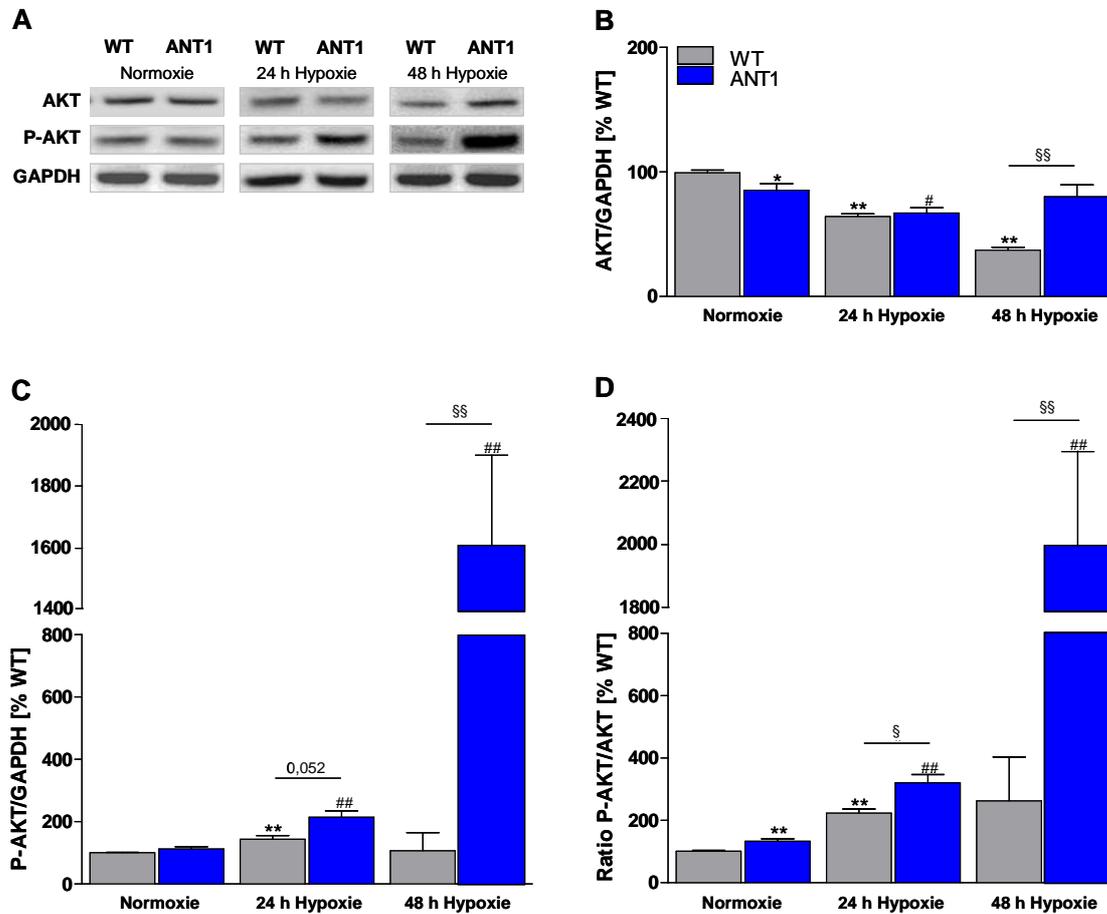


Abb. 3.10: Ausmaß der Akt-Aktivierung bei Hypoxie. WT- und ANT1-NRCM wurden unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen für 24 h bzw. 48 h kultiviert. Die Proteine wurden im Zellextrakt der NRCM mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen. (A) Exemplarisch dargestellte Western-Blots. (B) Graphische Darstellung der Proteinmengen von Gesamt-Akt und (C) P-Akt in Prozent zum normoxischen WT. Die Quantifizierung erfolgte in Relation zu GAPDH. (D) Ermitteltes Verhältnis von P-Akt zu Gesamt-Akt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. WT (Normoxie); # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ vs. ANT1 (Normoxie); § $p < 0,05$, §§ $p < 0,01$ vs. entsprechender Hypoxie-Bedingung; $n = 4-11$.

Die Aktivierung von Akt wird auch über Phosphorylierungen gesteuert. Wie in Abb. 3.10 C gezeigt, war das P-Akt-Level in den WT-NRCM nach 24 h Hypoxie leicht erhöht, während die ANT1-NRCM zu diesem Zeitpunkt eine Erhöhung von $114,1 \pm 2,1\%$ aufwiesen, die nach 48 h sogar auf das 16-fache anstieg. Das Verhältnis, gebildet aus P-Akt zu Gesamt-Akt für jede Gruppe, ist in Abb. 3.10 D dargestellt. Es verdeutlicht insgesamt, dass ANT1-NRCM nach 48 h Hypoxie eine enorme Steigerung an P-Akt aufwiesen. Die geringe Zunahme in den normoxischen ANT1-NRCM war nicht auf eine

veränderte Phosphorylierung von Akt zurückzuführen, sondern kam aufgrund der reduzierten Gesamt-Akt-Proteinmenge zustande.

Beim Vergleich der Aktivierungen von ERK1/2 und Akt in den ANT1-NRCM im Verlauf der Hypoxie zeigt sich, dass ERK1/2 und Akt nicht synchron reguliert werden. Die ERK1/2-Kinasen werden nach 24 h Hypoxie verstärkt aktiviert, während die Aktivierung von Akt hauptsächlich nach 48 h erfolgt.

3.1.10 HIF-1 α -Expression

Aktivierte ERK1/2- und Akt-Kinasen können Transkriptionsfaktoren aktivieren, die das Zellüberleben sichern. Ein Beispiel ist HIF-1 α . HIF-1 α wird darüber hinaus sauerstoffabhängig reguliert und dient daher als charakteristischer Hypoxiemarker. Die WT- und ANT1-NRCM zeigten nach 24 h Hypoxie einen signifikanten Anstieg der HIF-1 α -Proteinmenge im Vergleich zur jeweiligen Normoxiegruppe, wobei der Anstieg in den ANT1-NRCM wesentlich höher ausfiel ($121,1 \pm 2,4\%$ vs. $39,1 \pm 5,6\%$; Abb. 3.11). Nach 48 h sank der HIF-1 α -Gehalt der WT-NRCM auf Normniveau, während die ANT1-NRCM noch eine signifikant erhöhte Expression aufwiesen. Insgesamt war die HIF-1 α -Proteinmenge in den ANT1-NRCM zu beiden Hypoxiezeitpunkten wesentlich höher als in den WT-NRCM.

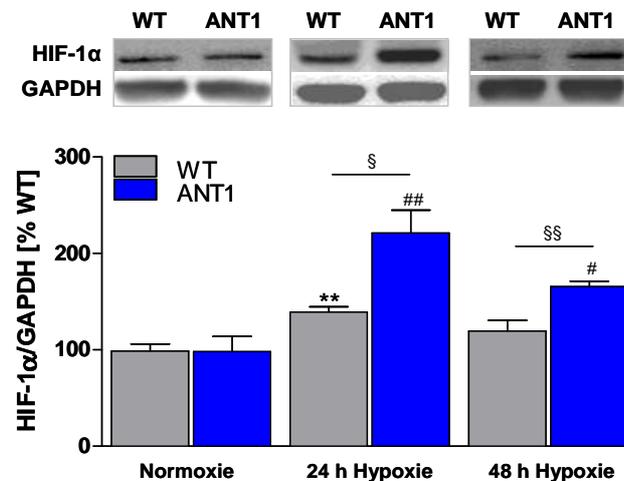


Abb. 3.11: Expression von HIF-1 α bei Hypoxie. WT- und ANT1-NRCM wurden unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen für 24 h bzw. 48 h kultiviert. HIF-1 α wurde im Zellextrakt der NRCM mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen. Im oberen Teil der Abb. sind exemplarisch Western-Blots dargestellt. Die Grafik im unteren Teil zeigt die Proteinmengen in Prozent zum normoxischen WT. Die Quantifizierung von HIF-1 α erfolgte in Relation zu GAPDH. ** $p < 0,01$ vs. WT (Normoxie); # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ vs. ANT1 (Normoxie); § $p < 0,05$, §§ $p < 0,01$ vs. entsprechender Hypoxie-Bedingung; $n = 4-11$.

3.1.11 Hsp90-Expression

Hsp90 stabilisiert als Chaperon essentielle Komponenten der ERK1/2- und Akt-Signalwege. Western-Blot-Analysen bestätigten eine erhöhte Hsp90-Expression in den ANT1-NRCM nach 24 h und 48 h Hypoxie im Vergleich zur ANT1-Normoxiegruppe, bzw. zu den hypoxischen WT-NRCM (Abb. 3.12). In den WT-NRCM blieb Hsp90 nach 24 h unverändert und sank nach 48 h Hypoxie um 43,0%.

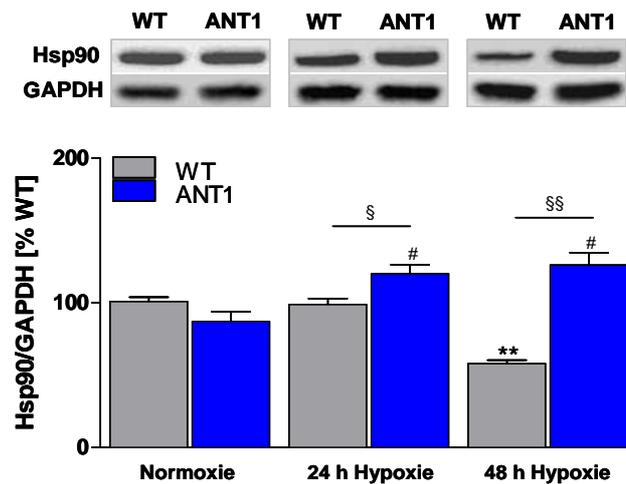


Abb. 3.12: Expression von Hsp90 bei Hypoxie. WT- und ANT1-NRCM wurden unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen für 24 h bzw. 48 h kultiviert. Hsp90 wurde im Zellextrakt der NRCM mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen. Im oberen Teil der Abb. sind exemplarisch Western-Blots dargestellt. Die Grafik im unteren Teil zeigt die Proteinmengen in Prozent zum normoxischen WT. Die Quantifizierung von Hsp90 erfolgte in Relation zu GAPDH. ** p<0,01 vs. WT (Normoxie); # p<0,05 vs. ANT1 (Normoxie); § p<0,05, §§ p<0,001 vs. entsprechender Hypoxie-Bedingung; n=5-11.

3.2 Kardioprotektive Wirkung von ANT1 bei Ischämie

Die spezifische ANT1-Überexpression führte bei Hypoxie *in vitro* zu protektiven Effekten. Um zu überprüfen, ob diese Effekte auch *in vivo* zu beobachten waren, wurden adulte WT- und transgene ANT1-Ratten für 24 h einer LAD-Ligation im Herzen unterzogen. Diese führte zur Ischämie, die im Gewebe Hypoxie auslöste und letztendlich zum Myokardinfarkt führte.

3.2.1 Mortalitätsrate und myokardiale Infarktgröße bei Ischämie

Wie in Abb. 3.13 A gezeigt, verstarben deutlich weniger ANT1-Tiere als WT-Tiere (42,9% vs. 72,1%) an den Folgen der Ischämie. Parallel dazu war die Infarktgröße im ANT1-Herzen um 22,4% erniedrigt

(Abb. 3.13 B). Somit wird schon hier deutlich gezeigt, dass die gezielte Hochregulation von ANT1 im Herzen bei Ischämie kardioprotektiv wirkt.

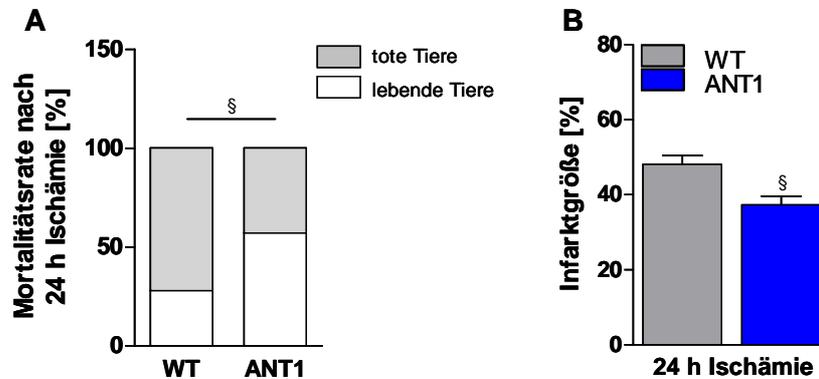


Abb. 3.13: Mortalitätsrate und myokardiale Infarktgröße bei Ischämie. WT- und ANT1-Ratten wurden für 24 h einer LAD-Ligation unterzogen und die Herzen somit ischämischen Bedingungen ausgesetzt. (A) Mortalitätsrate nach 24 h Ischämie. ANT1: n=21; WT: n=43; § p<0,05 vs. WT. (B) Myokardiale Infarktgröße (Verhältnis von infarziertem Gewebe zum gesamten linken Ventrikel in Prozent); ANT1: n=9; WT: n=8; § p<0,05 vs. WT (Ischämie).

3.2.2 Oxidativer Stress bei Ischämie

Bei myokardialer Ischämie werden ebenfalls ROS gebildet. Dazu gehören Peroxide wie H₂O₂, die im Blutserum nach Gewebeschädigung nachgewiesen werden können. Bei der Analyse zeigten die WT-Tiere mit myokardialer Ischämie eine deutlich höhere Peroxidkonzentration im Serum, als die WT-Kontrollen (182,6±25,4% vs. 100,0±13,2%; Abb. 3.14 A). Der Peroxidanteil im Serum der ANT1-Ratten mit myokardialer Ischämie war im Vergleich zur ANT1-Kontrolle nicht verändert.

Parallel dazu wurden oxidative Schädigungen in Form von Proteincarbonylierungen direkt im infarzierten Herzgewebe der Tiere untersucht. Die Messung ergab, dass WT-Tiere signifikant mehr Proteincarbonylierungen im Herzen besaßen, als die ischämischen ANT1-Tiere (Abb. 3.14 B).

Zusammenfassend war festzustellen, dass ANT1-Ratten nach 24 h Ischämie eine geringere Mortalitätsrate und myokardiale Infarktgröße aufwiesen als die gleichbehandelten WT-Ratten. Parallel dazu waren die Peroxidkonzentrationen im Blutserum der ANT1-Ratten und damit verbunden die Proteinmodifikationen im infarzierten Herzgewebe nicht erhöht. Somit konnten diese *in vivo*-Studien kardioprotektive Effekte von ANT1 nachweisen.

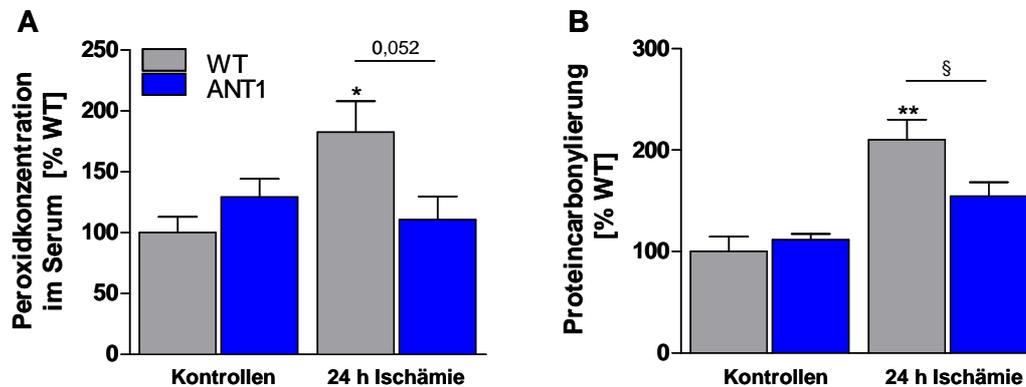


Abb. 3.14: Oxidativer Stress in WT- und ANT1-Ratten bei Ischämie. (A) Peroxidkonzentration im Blutserum; n=8-12. (B) Proteincarbonylierungen im unbehandelten und infarzierten Herzgewebe; n=6-10. Die Messparameter wurden prozentual zum unbehandelten WT angegeben. * p<0,05, ** p<0,01 vs. WT (Kontrolle); § p<0,05 vs. WT (Ischämie).

3.3 Kontraktiler Mechanismus im Herzen der ANT1-Ratten

Neben der kardialen Protektion war von besonderem Interesse, ob eine ANT1-Überexpression auch basal das Herz beeinflusst und möglicherweise die kontraktile Funktion steigert. Daher wurden im Folgenden die Expression der kontraktile Proteine und der Ca^{2+} -transportierenden Komponenten in ANT1-Rattenherzen untersucht, die für die Initiation der Kontraktion und Relaxation verantwortlich sind. Außerdem wurden die Morphologie sowie die Kontraktions- und Relaxationsparameter von ANT1-ARCM unter basalen Bedingungen analysiert.

3.3.1 Expression kontraktile Proteine und Ca^{2+} -transportierender Komponenten

Western-Blot-Analysen zeigten, dass die kontraktile Proteine Myosin (*Myosin Heavy Chain* (MHC); $51,8 \pm 12,8\%$), die β -Isoform des Myosins (β MHC; $22,9 \pm 5,0\%$), Aktin ($23,8 \pm 8,8\%$) und TnI ($51,5 \pm 13,7\%$) in den ANT1-Rattenherzen im Vergleich zum WT verstärkt exprimiert wurden (Abb. 3.15 A-D).

Auch war zu beobachten, dass die essentiellen Ca^{2+} -ATPasen PMCA ($23,8 \pm 4,8\%$) und SERCA2a ($22,2 \pm 4,7\%$) in den ANT1-Herzen vermehrt auftraten (Abb. 3.16 A und B). Die Proteinmengen des NCX hingegen blieben zwischen den WT und ANT1-Herzen unverändert. Des Weiteren wurde die Expression von PLB analysiert, das als inhibitorisches Protein SERCA2a reguliert. PLB zeigte keine veränderte Expression (Abb. 3.16 B), sodass das Verhältnis von PLB zu SERCA2a in den ANT1-

Herzen deutlich reduziert war ($29,0 \pm 5,6\%$; Abb. 3.16 C). Eine Reduktion dieses Verhältnisses kann die SERCA2a-Aktivität positiv beeinflussen und somit die Muskelkontraktion steigern. Weiterführende Untersuchungen ergaben, dass sich die Proteinmengen der RyR2 und DHPR, die in der SR- bzw. Plasmamembran der Zellen lokalisiert sind, nicht änderten. Auch die Expression des SR- Ca^{2+} -Bindeproteins Calsequestrin war in den WT- und ANT1-Herzen nicht verändert (Daten nicht gezeigt).

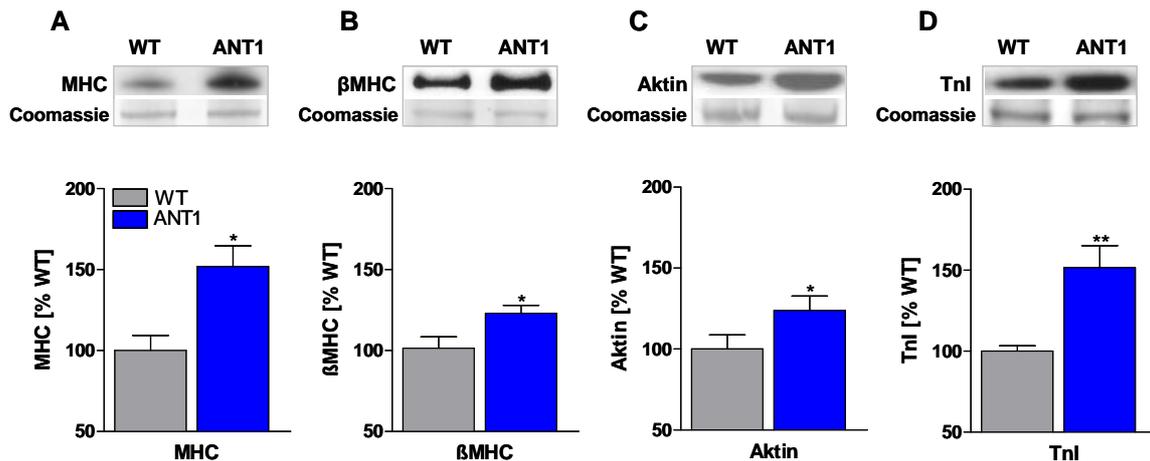


Abb. 3.15: Expression kontraktile Proteine. Die einzelnen Komponenten (A) MHC, (B) β MHC, (C) Aktin und (D) TnI wurden in Proteinhomogenaten aus WT- und ANT1-Herzen mittels Western-Blot analysiert. Der obere Teil der Abb. zeigt exemplarische Western-Blots, der untere Teil repräsentiert die Proteinmengen in Prozent zum WT. Die Quantifizierung erfolgte relativ zur aufgetragenen Proteinmenge. Die Proteine wurden dafür mit Coomassie-Blau gefärbt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. WT; $n = 7-12$.

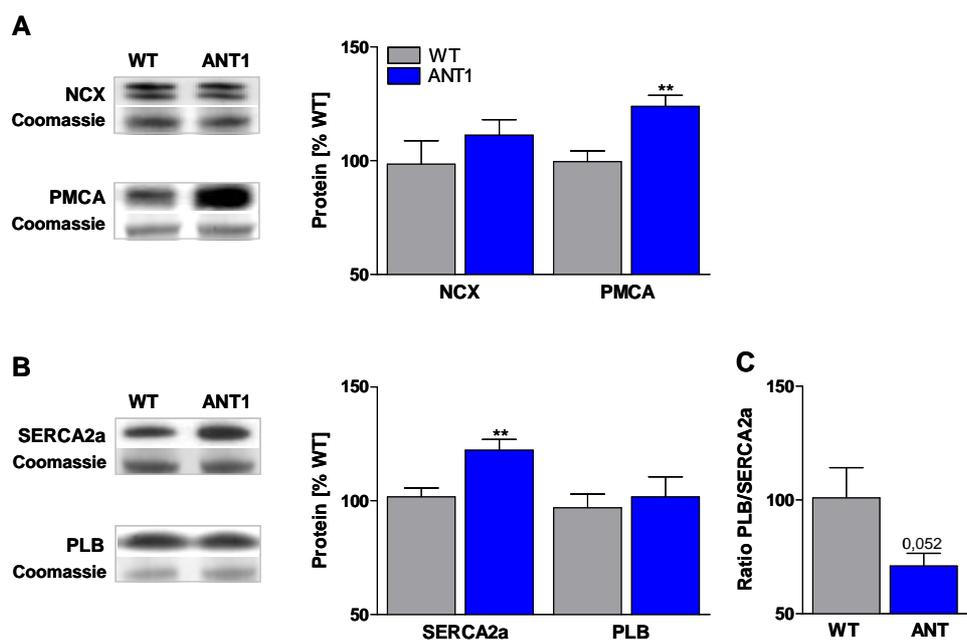


Abb. 3.16: Expression der Ca²⁺-transportierenden Komponenten. Die dargestellten Proteine (A) NCX und PMCA sowie (B) SERCA2a und PLB wurden in Proteinhomogenaten aus WT- und ANT1-Herzen mittels Western-Blot analysiert. (C) Ermitteltes Verhältnis von PLB zu SERCA2a. Die linke Bildhälfte zeigt exemplarische Western-Blots, die rechte Seite repräsentiert die Proteinmengen in Prozent zum WT. Die Quantifizierung erfolgte relativ zur aufgetragenen Proteinmenge. Die Proteine wurden dafür mit Coomassie-Blau gefärbt. ** p<0,01 vs. WT; n=8-12.

3.3.2 Bestimmung der SERCA2a-Aktivität

Da eine erhöhte SERCA2a-Proteinmenge häufig mit einer gesteigerten SERCA2a-Aktivität einhergeht, wurde die Aktivität anhand der Aufnahme von Oxalat-stimuliertem Ca²⁺ in SR-Vesikel gemessen. In Abb. 3.17 wird deutlich, dass ANT1-Herzen im Vergleich zum WT, sowohl bei submikromolarer (0,35 µmol/L) als auch gesättigter (3,68 µmol/L) freier Ca²⁺-Konzentration, eine höhere SR-Ca²⁺-Aufnahmerate von durchschnittlich 33,5% aufwiesen. Um sicherzustellen, dass die signifikanten Unterschiede zwischen den Tieren nicht auf Grund von unterschiedlichen Membrandurchlässigkeiten über die RyR zustande kamen, wurden die Messungen in Gegenwart von 20 µmol/L Rutheniumrot (RR) vollzogen. RR ist ein RyR-Inhibitor. Die Inhibierung verursachte eine höhere netto Ca²⁺-Aufnahme von ca. 65% in beiden Gruppen und bestätigte somit, dass die Unterschiede auf der SERCA2a-Aktivität beruhen.

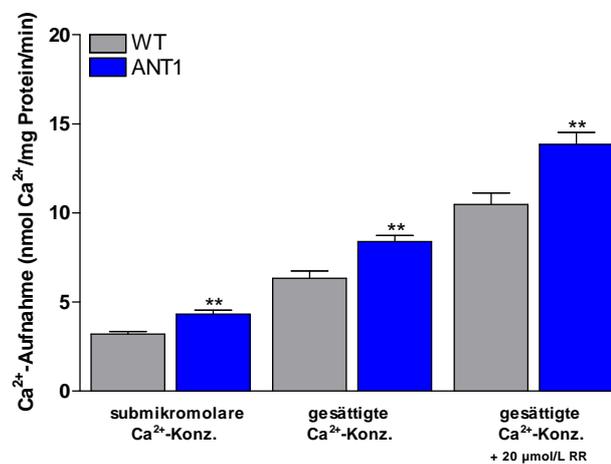


Abb. 3.17: Bestimmung der SERCA2a-Aktivität. Die Messung der Oxalat-stimulierten Ca²⁺-Aufnahme ins SR erfolgte in Proteinhomogenaten aus WT- und ANT1-Herzen. Dafür wurden zwei unterschiedliche freie ⁴⁵CaCl₂-Konzentrationen mit 0,35 µmol/L (submikromolar) und 3,68 µmol/L (gesättigt) eingesetzt. Zusätzlich wurden 20 µmol/L RR zugefügt, um die Durchlässigkeit der RyR zu überprüfen. Die Ca²⁺-Aufnahmerate wird in Nanomol Ca²⁺ pro Milligramm Protein pro Minute angegeben. ** p<0,01 vs. WT; n=7-8.

3.3.3 Morphologische Veränderungen der ANT1-ARCM

Eine Zunahme an kontraktilen Proteinen war mit strukturellen und morphologischen Zellveränderungen verbunden. Mikroskopische Analysen von ARCM zeigten eine signifikante Zunahme der diastolischen Zelllänge ($6,3 \pm 2,0\%$) und Zellbreite ($19,3 \pm 4,8\%$) in den ANT1-ARCM im Vergleich zum WT (Abb. 3.18 B und C). Die zunehmende Zellbreite führte zur Vergrößerung der Zellquerschnittsfläche um $43,8 \pm 14,1\%$ und steigerte das Zellvolumen um $52,6 \pm 12,0\%$ (Abb. 3.18 D und E). Die ANT1-ARCM wiesen somit eine zelluläre Hypertrophie auf.

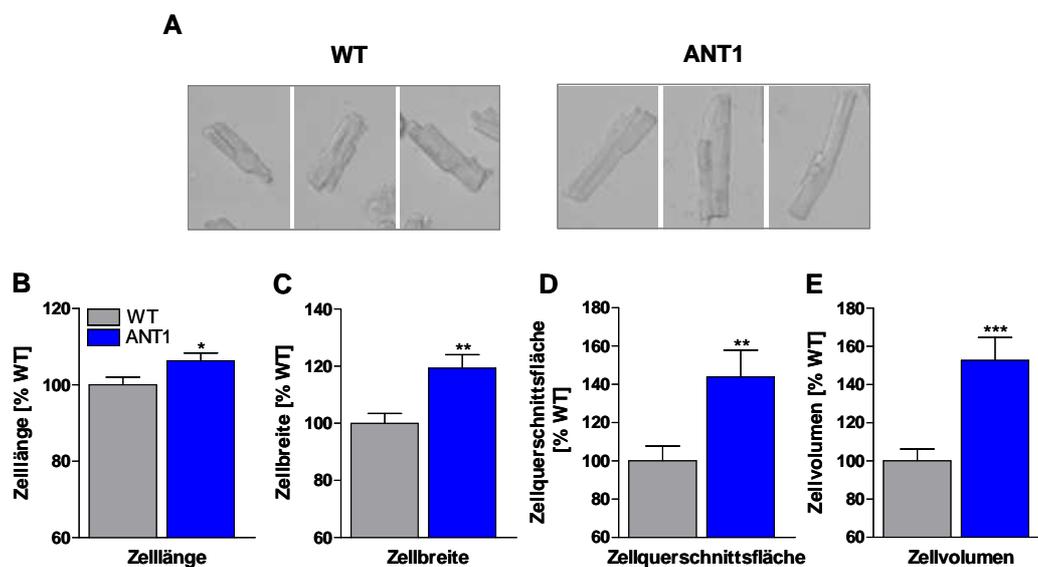


Abb. 3.18: Morphologische Veränderungen der ANT1-ARCM. (A) Mikroskopische Aufnahmen von exemplarisch dargestellten WT- und ANT1-ARCM (20-fache Vergrößerung). (B) Die diastolische Zelllänge und (C) Zellbreite einzelner ARCM wurden im Bereich des größten Durchmessers bestimmt. (D) Die Zellquerschnittsfläche und (E) das Zellvolumen wurden anhand des Zellradius und der Zelllänge berechnet. Für die Auswertung wurden $n=120$ WT-ARCM und $n=96$ ANT1-ARCM verwendet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. WT.

3.3.4 Kontraktile Funktion der ANT1-ARCM

Um die kontraktile Funktion der hypertrophierten ANT1-ARCM *in vitro* zu untersuchen, wurden die Kardiomyozyten mit zunehmenden elektrischen Frequenzen stimuliert und die kontraktile Parameter dL/L, TTP und RT50 gemessen (Kapitel 2.5.11). Die ARCM besaßen unter gegebenen Kulturbedingungen bei der Stimulation mit Frequenzen von 0,5 Hz, 1 Hz und 2 Hz die charakteristische negative Zellverkürzungs-/Frequenz-Beziehung (Abb. 3.19 A). Die Amplitude von dL/L war zwischen den WT- und ANT1-ARCM nicht verändert. Im Gegensatz dazu waren die

ladungsunabhängigen Zeitparameter TTP und RT50 in den ANT1-ARCM signifikant reduziert, was auf eine beschleunigte Kontraktion und Relaxation zurückzuführen ist (Abb. 3.19 B und C).

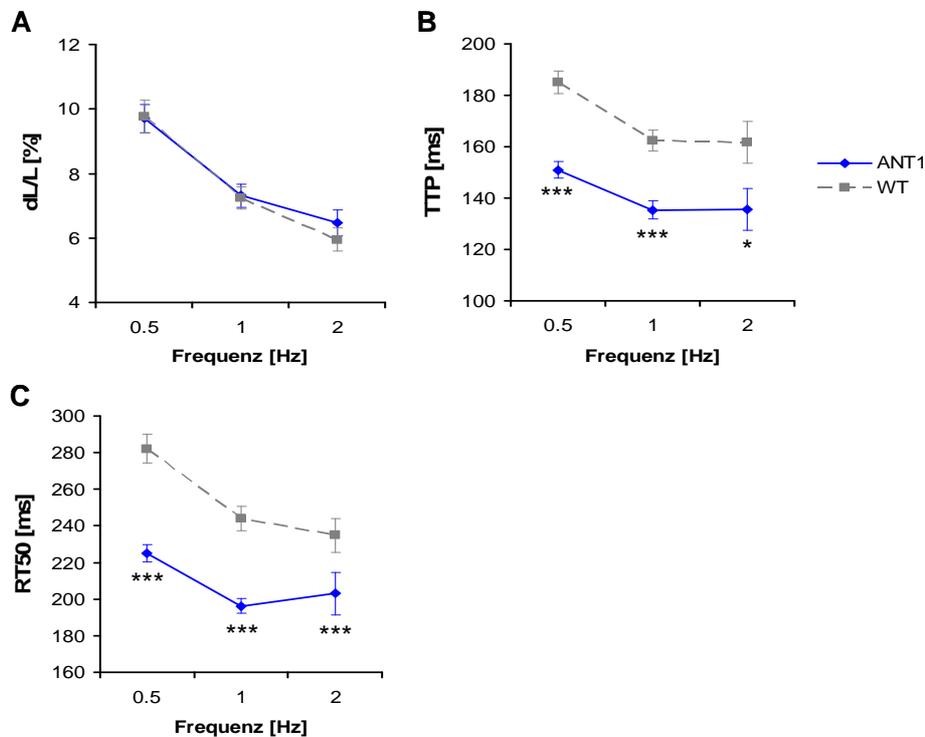


Abb. 3.19: Kontraktion von WT- und ANT1-ARCM. ARCM wurden für eine Minute mit zunehmenden elektrischen Frequenzen stimuliert (0,5 Hz, 1 Hz und 2 Hz) und die kontraktile Parameter (A) dL/L, (B) TTP und (C) RT50 mit Hilfe eines Video-gesteuerten Zellgrenzenerkennungssystems gemessen. Es wurden 18 ARCM pro Gruppe aus 6 unabhängigen Präparationen eingesetzt. * p < 0,05, *** p < 0,001 vs. WT.

Insgesamt zeigten die Ergebnisse, dass ANT1-Rattenherzen die kontraktile Proteine sowie die Ca^{2+} -ATPasen PMCA und SERCA2a verstärkt exprimierten. Zusätzlich stieg die SERCA2a-Aktivität signifikant an. Diese Protein- und Aktivitätsänderungen waren mit einer beschleunigten kontraktile Funktion der ANT1-ARCM verbunden und resultierten in einer physiologischen zelluläre Hypertrophie.

3.4 Identifizierung von ANT1 regulierenden Substanzen

Im letzten Teil der Studie sollten intrinsische Substanzen identifiziert werden, die ANT1 auf transkriptioneller Ebene regulieren. Für diese Analysen wurden zunächst Plasmidkonstrukte hergestellt, die unterschiedlich große murine ANT1-Promotorbereiche enthielten und mit einem Luziferase-Reportergen gekoppelt waren. Die Stimulation der Promotoren führte zur Modulation der *Firefly*-Luziferase-Expression. Als Expressionssystem für die Plasmide wurden mausspezifische HL-1-Zellen gewählt. Diese wiesen im Vergleich zu NRCM eine ausreichende Transfektionseffizienz auf (ca. 30-35%). Die Transfektionseffizienz von NRCM betrug lediglich 5-10%.

3.4.1 Stimulation des ANT1-Promotors

Die Generierung der Plasmide pANT1Pro^{1.5}-Luc und pANT1Pro⁴-Luc, die mit 1,5 kB bzw. 4 kB des murinen ANT1-Promotors und dem *Firefly*-Luziferasegen ausgestattet waren, wurden in Kapitel 2.6.18 beschrieben. In Abb. 3.20 A sind die Plasmidsequenzen schematisch dargestellt: Die 1,5 kB-ANT1-Promotorsequenz umfasst die ANT1-Nukleotide -1370 bis +130 relativ zum Transkriptionsstart. Direkt im Anschluss folgt das *Firefly*-Luziferasegen. Der 4 kB-Promotor beinhaltet zusätzlich weiter distal gelegene Sequenzen, die für die Regulation der Transkription essentiell sein können. Das Plasmid pLuc besitzt keinen Promotor und wurde als Negativkontrolle eingesetzt.

Um die basale Transkriptionsaktivierung der einzelnen Plasmidkonstrukte zu untersuchen, wurden konfluente HL-1-Zellen transfiziert und die Luziferase-Aktivität gemessen. Die Ergebnisse zeigten, dass pANT1Pro^{1.5}-Luc im Vergleich zu pLuc unter basalen Bedingungen transkriptionelle Aktivierung vermittelte (900,1±34,5% vs. 100,0±6,3%; Abb. 3.20 B). Die Verlängerung des ANT1-Promotors auf 4 kB (pANT1Pro⁴-Luc) erhöhte die Aktivierung und damit die basale Luziferaseaktivität noch um weitere 63,6% auf 1473±62,6%. Die Unterschiede in der Transkriptionsinduktion zwischen pANT1Pro^{1.5}-Luc und pANT1Pro⁴-Luc könnten durch fehlende Transkriptionselemente zu Stande kommen, die weiter distal lokalisiert sind. Daher wurde pANT1Pro⁴-Luc für die Stimulationsversuche eingesetzt.

Die Zellstimulation mit TGF-β1, TNFα und IL-4 für 8 h führte nicht zur veränderten ANT1-Promotoraktivierung. Auch führten weitere Zytokine wie IFN-β, IFNγ, TNFβ und IL-6 nicht zur Regulation des ANT1-Promotors (Daten nicht gezeigt). IL-1β induzierte hingegen eine signifikante Reduktion der Luziferase-Aktivität um 19,0% (1193±55,3%), die aus der Hemmung des ANT1-Promotors resultierte. Somit konnte im HL-1-Zellsystem IL-1β als Substanz identifiziert werden, die die murine ANT1-Promotoraktivität herunterregulierte.

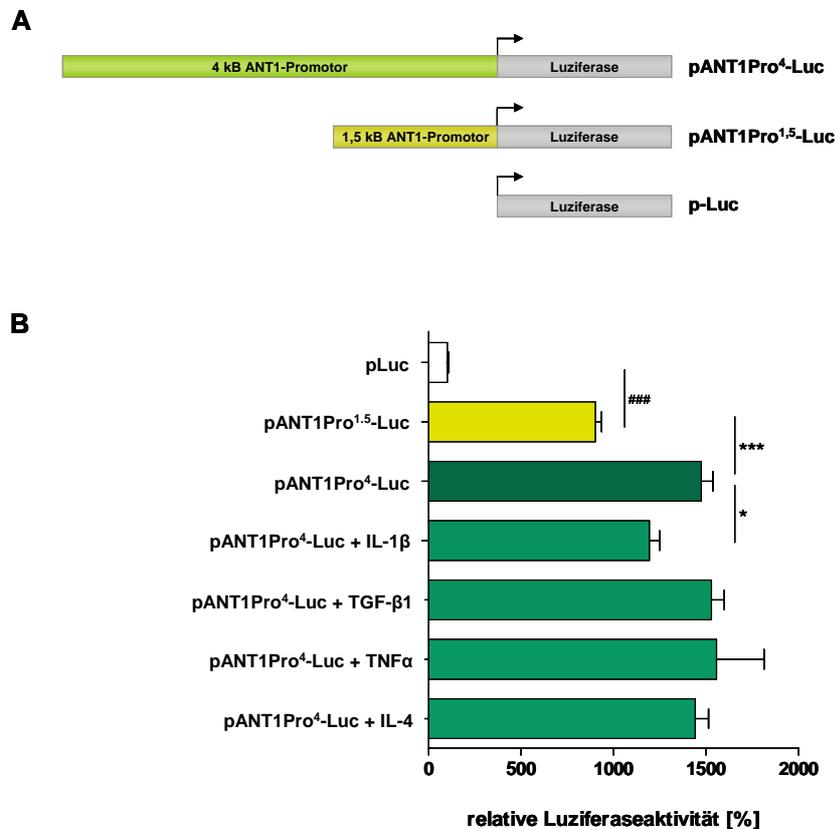


Abb. 3.20: Stimulation des ANTI1-Promotors in HL-1-Zellen. (A) Schematische Darstellung der Plasmidsequenzen. Eine 4 kB- bzw. 1,5 kB-Promotorsequenz von ANTI1 wurde im Plasmid pANT1Pro⁴-Luc bzw. pANT1Pro^{1.5}-Luc vor ein *Firefly*-Luziferasegen kloniert. Das Plasmid pLuc enthielt keine ANTI1-Promotorsequenz. (B) HL-1-Zellen wurden mit den Plasmiden pLuc, pANT1Pro^{1.5}-Luc und pANT1Pro⁴-Luc transfiziert und stimuliert. Die hinter die ANTI1-Promotoren geschaltete *Firefly*-Luziferase diente als Detektionssystem (zur *Renilla*-Luziferaseaktivität normalisiert). ### $p < 0,001$ vs. pLuc, *** $p < 0,001$ vs. pANT1Pro^{1.5}-Luc, * $p < 0,05$ vs. pANT1Pro⁴-Luc; $n = 3-11$.

3.4.2 ANTI1-Genregulation in NRCM

Um zu überprüfen, ob die Zytokine den endogenen ANTI1-Promotor in NRCM regulieren, wurden die NRCM stimuliert und ANTI1-mRNA mittels *Real-Time* PCR quantifiziert (Abb. 3.21). Auch in diesen Experimenten konnte eine Regulation von ANTI1 durch IL-1 β beobachtet werden (100,0 \pm 4,1% vs. 59,0 \pm 5,1%). Die Zytokine TGF- β 1 und TNF α sowie IFN- β (Daten nicht gezeigt) hatten auf die endogene ANTI1-Regulation keinen Einfluss.

Insgesamt zeigten die Experimente, dass IL-1 β in transfizierten HL-1-Zellen und in NRCM als ANT1-Regulator fungierte. Eine Hochregulation konnte nicht gezeigt werden und bleibt ein Ziel weiterer Untersuchungen.

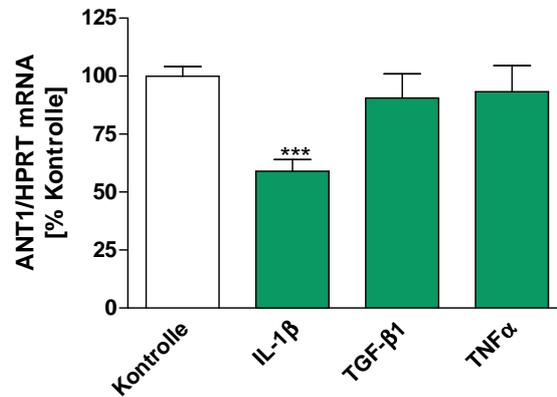


Abb. 3.21: ANT1-Genregulation in NRCM nach Zytokin-Stimulation. NRCM wurden für 24 h mit den Zytokinen IL-1 β , TGF- β 1 und TNF α stimuliert und mRNA isoliert. Die ANT1-mRNA und HPRT-mRNA zur Normalisierung wurden mittels *Real-Time* PCR quantifiziert. *** p<0,001 vs. Kontrolle; n=4-8.

4. Diskussion

Der ANT ist ein multifunktionales Protein, das in der IMM lokalisiert ist und den Austausch von ATP und ADP vermittelt. Darüber hinaus spielt der ANT eine essentielle Rolle bei der Regulation der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung und der Apoptose.

Der ANT1 ist die vorherrschende Isoform im Herzen. Mutationen oder Dysfunktionen des ANT1 haben schwere intrazelluläre Schädigungen zur Folge [43,44]. Bei der myokardialen Ischämie wird beispielsweise die ANT1-Aktivität reduziert, was mit einer Fehlfunktion der Atmungskette, ATP-Mangel, einer vermehrten ROS-Produktion und Zellzerstörung verbunden ist [58-61]. In dieser Studie wurde zuerst untersucht, ob eine transgene herzspezifische ANT1-Überexpression bei Hypoxie bzw. Ischämie vor Zellschädigungen schützt. Die Analysen demonstrierten, dass die herzspezifische Überexpression des ANT1 im Mitochondrium [50] sowohl zur Zell- als auch Kardioprotektion führte.

Im zweiten Teil der Studie wurde untersucht, ob die spezifische ANT1-Überexpression unter basalen Bedingungen den kontraktile Mechanismus des Herzens beeinflusst. Die ANT1-Rattenherzen zeigten eine vermehrte Produktion von kontraktile Proteinen und essentiellen Ca^{2+} -ATPasen. Auch war die Kontraktilität der ANT1-ARCM gesteigert.

Die Regulation des ANT1 spielt in vielen kardialen Prozessen eine essentielle Rolle. Im letzten Teil der Studie wurde nach Substanzen gesucht, die ANT1 regulieren. Dabei wurde IL-1 β identifiziert, das die ANT1-Expression in Kardiomyozyten senkt.

4.1 Kardioprotektive Wirkung von ANT1 bei Hypoxie

4.1.1 Die ANT1-Überexpression beeinflusst den intrazellulären ATP-Gehalt

Hypoxie verursacht Dysfunktionen der mitochondrialen Atmungskette, die zum ATP-Mangel führen [52,60]. Die Analysen dieser Studie zeigten entsprechend, dass der ATP-Gehalt der WT-NRCM bei akuter (24 h) und chronischer (48 h) Hypoxie stetig abnahm. In den ANT1-NRCM hingegen blieb der ATP-Gehalt bei akuter Hypoxie konstant und war erst bei chronischer Hypoxie leicht reduziert. Somit verfügen die ANT1-NRCM bei chronischer Hypoxie über höhere ATP-Mengen, die für essentielle energieabhängige Prozesse eingesetzt werden können.

Erstaunlicherweise konnte bei Normoxie ein leicht, aber signifikant, geringerer ATP-Gehalt von 17% in den ANT1-NRCM beobachtet werden. Dies könnte auf eine milde Entkopplung von mitochondrialer Respiration und ATP-Synthese durch ANT1 zurückzuführen sein [152-154]. Bei der Entkopplung werden die Atmungskettenfunktion und der Elektronentransport aufrechterhalten, die Protonen indessen an langkettige Fettsäuren gebunden und mittels ANT über die IMM transportiert. Dies

reduziert den Protonen-Rückstrom durch die ATP-Synthase und senkt die ATP-Produktion [152]. Somit könnte der niedrigere ATP-Gehalt mit einer milden Entkopplung zusammenhängen. Zweitens zeigten Loers *et al.*, dass der ANT1 in der Plasmamembran von Neuronen ATP nach außen transportiert, um dort für extrazelluläre Prozesse zur Verfügung zu stehen [155]. Eine vermehrte ANT1-Expression könnte diesen Vorgang verstärken und die ATP-Menge in der Zelle reduzieren. Allerdings wurde die intrazelluläre Homöostase und Zellviabilität (Kapitel 4.1.3) der ANT1-NRCM von der ATP-Reduktion nicht negativ beeinflusst, was für eine effizientere Nutzung der zur Verfügung stehenden Energie spricht.

Eine Senkung des ATP-Gehalts war an eine Zunahme von ANT gekoppelt. Die Messung des ANT-Gesamtproteins ergab, auf Grund der transgenen Überexpression von ANT1, eine signifikante Proteinerhöhung von 25% bei Normoxie und akuter Hypoxie in den ANT1-NRCM. Bei chronischer Hypoxie stieg die ANT-Proteinmenge in den ANT1-NRCM um weitere 38% an, während sie bei den WT-NRCM um 86% zunahm. Es ist bekannt, dass diese Erhöhung durch eine Expressionszunahme der ANT2-Isoform zustande kommt [156]. Der ANT2 wird beim Übergang von oxidativem zu glykolytischem Metabolismus hochreguliert, um in entgegengesetzter Richtung zytosolisches ATP aus der anaeroben Glykolyse ins Mitochondrium zu pumpen. Dieses soll als Gegenregulation die Aufrechterhaltung der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung und anderer energieabhängiger Prozesse gewährleisten [17], die bei Hypoxie beeinträchtigt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei Hypoxie der ATP-Gehalt der NRCM drastisch reduziert wird und parallel dazu die ANT-Proteinmengen ansteigen. Somit spielt der ANT bei der Regulation des Energiemetabolismus eine entscheidende Rolle. Insgesamt besitzen ANT1-NRCM zwar basal weniger ATP als die WT-NRCM, können dieses jedoch bei akuter Hypoxie konstant halten und weisen bei chronischer Hypoxie sogar höhere ATP-Mengen auf, die letztendlich für lebensnotwendige Prozesse eingesetzt werden können.

4.1.2 Die ANT1-Überexpression schützt bei Hypoxie vor erhöhter Radikalbildung

Hypoxie und mitochondriale Dysfunktionen führen zur Bildung von ROS. Die Messdaten zeigten, dass ANT1-NRCM bei Hypoxie wesentlich weniger ROS aufwiesen, als die gleichbehandelten WT-NRCM. Letztere besaßen bei akuter und chronischer Hypoxie eine erhöhte ROS-Menge, während die ANT1-NRCM nur bei chronischer Hypoxie vermehrt ROS bildeten.

ROS entstehen hauptsächlich durch einen gestörten Elektronentransport in der mitochondrialen Atmungskette, der zur unkontrollierten Übertragung von Elektronen auf Sauerstoff führt. Wie oben bereits erwähnt, agiert der ANT als milder Entkoppler der mitochondrialen Respiration und ATP-Synthese. Bei diesem Prozess wird der Protonentransport entkoppelt und der Elektronentransport aufrechterhalten, was zur Senkung des elektrochemischen Gradienten und des Membranpotentials führt

[152]. Ein reduziertes Membranpotential vermindert die ROS-Produktion und schützt vor den Folgen wie Apoptose [157]. Somit wäre die Entkopplung mittels ANT1, die ein reduziertes Membranpotential hervorruft, ein möglicher Mechanismus zum Schutz vor ROS bei Hypoxie. Experimentelle Vorversuche unterstützen diese Annahme, da ANT1-NRCM bei Normoxie und Hypoxie ein geringeres Membranpotential aufwiesen. Dies steht allerdings im Widerspruch zu Befunden, die an isolierten Mitochondrien von adulten ANT1-Rattenherzen erhoben wurden [50]. ANT1-Rattenherzen besitzen unter basalen Bedingungen eine höhere respiratorische Kontrollrate, die als Parameter für eine effektivere energetische Kopplung gilt und eine höhere funktionelle Integrität der Mitochondrien angibt. NRCM und Mitochondrien adulter Rattenherzen besitzen jedoch völlig unterschiedliche energetische Systeme, die nicht immer vergleichbar sind. Dies wird auch anhand des intrazellulären ATP-Gehalts deutlich: Die ANT1-NRCM besitzen basal weniger ATP als die WT-NRCM, während sich zwischen den adulten ANT1-Rattenherzen und den WT-Herzen keine Unterschiede ergaben [50]. Parallel zur ROS-Entstehung werden Enzyme des antioxidativen Stress-Systems aktiviert, um als Schutzmechanismus zu fungieren [158,159]. Dazu gehören vor allem die Katalase und die mitochondriale MnSOD2. Die Katalase wurde lange Zeit als peroxisomales Enzym angesehen. Radi *et al.* identifizierten indessen die Katalase im Mitochondrium von Rattenherzen, wo sie als Schlüsselenzym der antioxidativen Abwehr agiert [160]. In den WT-NRCM stieg die Katalaseaktivität bei akuter und chronischer Hypoxie, zusammen mit der ROS-Produktion, signifikant an. Die Proteinmengen von Katalase und MnSOD2 nahmen insgesamt langsamer zu, waren aber bei chronischer Hypoxie signifikant erhöht. Somit stieg in den WT-NRCM zunächst die spezifische Aktivität der Katalase und wurde anschließend durch die Expressionszunahme der antioxidativen Enzyme unterstützt.

In den ANT1-NRCM waren bei akuter und chronischer Hypoxie die ROS-Mengen signifikant niedriger als in den WT-NRCM und die Aktivität und Expression der antioxidativen Stress-Enzyme nicht verändert. Das der ANT1 bei der Regulation von oxidativem Stress eine essentielle Rolle spielt, zeigten bereits mehrere Studien anhand von ANT1-Inhibition oder -Mutation: ANT1-*Knock-Out* Mäuse weisen beispielsweise im Herzen und im Skelettmuskel unter basalen und pathophysiologischen Bedingungen eine stark erhöhte H₂O₂-Produktion auf und aktivieren die antioxidativen Enzyme MnSOD2 und Glutathion-Peroxidase 1 [46]. Auch belegten Won *et al.*, dass eine Herunterregulation des ANT1 mittels siRNA zur erhöhten ROS-Bildung führt und die Proteinmengen von Katalase und MnSOD ansteigen [59].

Interessanterweise waren auch bei chronischer Hypoxie die Aktivität und Expressionen der antioxidativen Enzyme trotz geringer ROS-Entstehung nicht erhöht. Dies bedeutet, dass die Zellen offensichtlich weitere Mechanismen besitzen, um geringe ROS-Vorkommen zu kompensieren und Zellschädigungen abzuf puffern, ohne das antioxidative Stress-System zu aktivieren.

4.1.3 Die ANT1-Überexpression wirkt bei Hypoxie zellprotektiv

ATP-Mangel, oxidativer Stress und unzureichende antioxidative Stressmechanismen führen zu intrazellulären Schädigungen [52,66,70,98,161]. ROS können beispielsweise Proteine modifizieren und mehrfach ungesättigte Fettsäuren der Phospholipide von Membranen oxidieren, was die Membranpermeabilität der Mitochondrien und der Zelle erhöht. Dieses resultiert letztendlich in zellulärer Apoptose und Nekrose. Um das Ausmaß der nekrotischen Zellzerstörung zu analysieren, wurde die Aktivität der freigesetzten LDH im Zellmedium erfasst. Die Messdaten zeigten insgesamt, dass WT-NRCM bei zunehmendem ATP-Mangel und erhöhter ROS-Produktion eine dazu parallel ansteigende Nekroserate aufwiesen. Das bedeutet, dass ATP-Mangel und ROS sowie ein unzureichendes antioxidatives Stress-System zur Zellzerstörung beitragen.

Die ANT1-NRCM wiesen zu beiden Hypoxiezeitpunkten und sogar bei Normoxie, trotz geringerem ATP-Gehalt, wesentlich weniger Nekrose auf, als die WT-NRCM, was die höhere Zellstabilität und Viabilität dieser Zellen erklärt. Auffällig war, dass die Nekroserate der ANT1-NRCM bei akuter Hypoxie zwar um das Doppelte anstieg, aber bei chronischer Hypoxie konstant blieb. Die ATP-Reduktion und Erhöhung von ROS waren erst bei chronischer Hypoxie messbar. Demnach können ANT1-NRCM ATP-Mangel und ROS besser kompensieren und aktivieren andere intrazelluläre Mechanismen, die die Zellen vor Zerstörung schützen. Eine direkte Behandlung der NRCM mit H₂O₂ bestätigte, dass ANT1-NRCM wesentlich unempfindlicher auf ROS reagieren und oxidativem Stress effektiver entgegenwirken.

Neben der Nekrose ist auch die Apoptose am Zelltod bei Hypoxie beteiligt. Im extrinsischen Apoptoseweg können so genannte Todesliganden die Trimerisierung von Todesrezeptoren induzieren und über die Caspase-8 Effektorcaspasen-3/6/7 aktivieren. Die intrinsische Apoptose ist unter anderem durch die Öffnung der MPTP charakterisiert. Die Porenöffnung wird durch ein vermindertes Membranpotential, ROS und ATP-Mangel induziert und führt zur Freisetzung von Cyt *c*, das schließlich die Effektorcaspasen-3/6/7 aktiviert. Diese leiten die DNA-Fragmentierung und Zellzerstörung ein [162]. Da sich bei den Effektorcaspasen-3/6/7 beide Apoptosewege kreuzen, wurden die Caspase-3/7-Aktivität und die anschließende DNA-Fragmentierung als charakteristische Apoptosemarker verwendet. Die WT-NRCM wiesen bei akuter und chronischer Hypoxie einen signifikanten Anstieg der Caspase-3/7-Aktivität um 35% auf und zeigten zu beiden Hypoxiezeitpunkten eine vermehrte DNA-Fragmentierung. Die erhöhte Apoptoserate ging mit reduziertem ATP-Gehalt und erhöhter ROS-Produktion einher.

Die ANT1-NRCM zeigten hingegen eine signifikant niedrigere Caspase-3/7-Aktivität und wesentlich weniger nukleare DNA-Fragmentierung im Zellkern als die hypoxischen WT-NRCM. Auffällig war, dass die Caspase-3/7-Aktivität zunächst bei akuter Hypoxie anstieg, jedoch bei chronischer Hypoxie

auf gleicher Höhe blieb. Somit wird auch hier deutlich, dass ANT1-NRCM effektive Schutzmechanismen einschalten, die der weiteren Apoptose-Induktion entgegenwirken. Die DNA-Fragmentierung charakterisiert ein spätes Apoptose-Ereignis und findet nach der Caspase-Aktivierung statt. Die geringe Erhöhung an fragmentierter DNA in den ANT1-NRCM bei chronischer Hypoxie ist vermutlich auf die bereits aktivierten Caspasen bei akuter Hypoxie zurückzuführen.

Insgesamt wurde deutlich, dass hypoxische ANT1-NRCM über eine höhere Zellviabilität und -stabilität verfügten und weniger Apoptose auslösten als die WT-NRCM. Die Befunde werden durch die Studie von Heger *et al.* unterstützt, in der ANT1-ARCM nach apoptotischer Stimulation mit TGF- β 1 eine reduzierte Caspase-3/7-Aktivität und weniger apoptotische Nuklei aufweisen als WT-ARCM [163]. Auch zeigten Walther *et al.* weniger Apoptose-Induktion in hypertrophen ANT1-Rattenherzen als in gleichbehandelten WT-Herzen [50]. Diese Beispiele machen deutlich, dass die ANT1-vermittelte Zellprotektion stimulusübergreifend ist und in isolierten Kardiomyozyten sowie im Herzgewebe stattfindet.

Der ANT spielt eine essentielle Rolle in der Apoptose, da er als regulatorische Komponente die Öffnung der MPTP kontrolliert. Heger *et al.* demonstrierten, dass ANT1-ARCM nach apoptotischer TGF- β 1-Stimulation eine geringere Senkung des mitochondrialen Membranpotentials aufweisen als WT-ARCM, und dass Bcl-2 in ANT1-ARCM signifikant erhöht ist [163], was die Öffnung der MPTP verhindert [87,88,164]. Zudem konnte an isolierten Mitochondrien von ANT1-Ratten gezeigt werden, dass die Porenöffnung unter Calciumstimulation deutlich verzögert stattfindet. Die TGF- β 1-Untersuchungen demonstrierten, dass die Stabilisierung der MPTP bei der Zellprotektion in den ANT1-ARCM und ANT1-Herzen eine Rolle spielt und dabei die intrinsische Apoptose blockiert wird. Dieses scheint auch in hypoxischen ANT1-NRCM zur Blockade der Apoptose beizutragen, da das Membranpotential bei akuter Hypoxie stabil bleibt (Daten nicht gezeigt). Überdies ist eine Verbindung zum rezeptorvermittelten extrinsischen Signalweg möglich. Zum einen zeigten Bouwmeester *et al.*, dass der ANT mit dem TNF-Rezeptor 2 interagiert [165] und dadurch die Signaltransduktion des extrinsischen Apoptosewegs blockieren könnte. Zum anderen demonstrierten eigene Vorversuche, dass der intrinsische Marker Bax in den ANT1-NRCM bei Hypoxie unverändert war. Somit kann die Zellprotektion des ANT1 sowohl über die Blockierung des extrinsischen als auch intrinsischen Wegs erfolgen.

Im Gegensatz zu den beschriebenen Effekten der ANT1-Überexpression, demonstrierten Studien in HeLa-Zellen bei erhöhtem ANT1 und ANT3 Apoptose-Induktion [86,166,167]. HeLa-Zellen sind proliferierende Krebszellen, die hauptsächlich ANT2 exprimieren. Daher sind die protektiven Eigenschaften von ANT1 wahrscheinlich zelltyp- und isoformspezifisch und nicht auf jedes Modell übertragbar [168]. Im Übrigen führt auch die spontane Überexpression von ANT1 mittels viraler Vektoren in NRCM zur Apoptose [169]. Die Protektion durch eine ANT1-Überexpression ist

demzufolge von einer Adaptation des Gesamtsystems abhängig. In unseren Studien wurde gezeigt, dass eine transgene ANT1-Überexpression in verschiedene Prozesse wie Energiestoffwechsel [50], Kontraktion (Kapitel 4.3; [170]) und die intrazelluläre Kommunikation [163] eingreift, was zellstabilisierend wirkt und die Zellen schützt. Der ANT1 ist somit Teil eines kardioprotektiven Programms und trägt zusammen mit anderen Faktoren zur Kardioprotektion bei.

4.1.4 Die ANT1-Überexpression führt zur Aktivierung von zellprotektiven Signalwegen

Obwohl die ANT1-NRCM bei chronischer Hypoxie geringen ROS-Mengen und ATP-Mangel ausgesetzt waren, wurden sie effektiv vor weiterer Apoptose- und Nekrose-Induktion geschützt. In diesen Zellen müssen somit Schutzmechanismen existieren, die diese Zellschädigungen verhindern. Diese Studie konnte zeigen, dass die protektiven Kinasen ERK1/2 und Akt aus intrazellulären Signalwegen, sowie Hsp90 und HIF-1 α in den ANT1-NRCM bei Hypoxie massiv aktiviert bzw. exprimiert wurden und dadurch die Zellprotektion förderten.

Die Aktivität von ERK1/2 und Akt wird über Phosphorylierungen reguliert. Vergleicht man insgesamt die ERK1/2- und Akt-Phosphorylierungen im Verlauf der Hypoxie, so wird deutlich, dass diese zu unterschiedlichen Zeitpunkten stattfanden. Bei akuter Hypoxie traten überwiegend ERK1/2-Phosphorylierungen auf, die bei chronischer Hypoxie drastisch abnahmen. Akt hingegen war vor allem bei chronischer Hypoxie massiv aktiviert. Die Deaktivierung von ERK1/2 bei chronischer Hypoxie kann sogar durch Akt erfolgen, da dieses eine übergeordnete Raf-Kinase phosphoryliert und somit die Signalweiterleitung Richtung ERK1/2 hemmt [171].

Die protektiven Wirkmechanismen von ERK1/2 und Akt beziehen sich zum einen direkt auf die Inhibierung der Apoptose und zum anderen auf die Expression von zellprotektiven Genen. Beide Kinasen können zur Inhibierung der Apoptose die Komponenten Bad und Caspase-9 phosphorylieren, was die Porenöffnung verhindert und zur Blockade der Caspase-Kaskade führt [98,100,109,172-174].

In Bezug auf die Genregulation ist bekannt, dass die ERK1/2-Kinasen die Expression des Transkriptionsfaktors HSF1 fördern, der daraufhin die Synthese von Hsp90 antreibt [175,176]. Die Hochregulation von Hsp90 in den ANT1-NRCM kann somit auf die enorme ERK1/2-Aktivierung zurückgeführt werden. Hsp90 ist ein Chaperon, das für die korrekte Proteinfaltung und Translokation von Ziel-Proteinen verantwortlich ist. Hsp90 gewährleistet beispielsweise die Translokation von ANT1 zum Mitochondrium und stellt daher eine essentielle Komponente im ANT1-Wirkmechanismus dar [5]. Darüber hinaus interagiert Hsp90 mit vielen regulatorischen Proteinen und kann dadurch zur Apoptose-Regulation beitragen. Im Zytosol hemmt Hsp90 u.a. die pro-apoptotischen Faktoren Apaf-1, Cyt *c* und EndoG [177], die normalerweise die Bildung des Apoptosoms induzieren und DNA-Fragmentierung hervorrufen. Außerdem kann Hsp90 mit Hilfe von Akt ins Mitochondrium translozieren und über CypD die MPTP regulieren [178,179]. Des Weiteren wurde beschrieben, dass

Hsp90 mit intrazellulären Kinasen wie Akt, Raf und MEK1/2 interagiert und zur Stabilisierung und Aktivierung dieser Kinasen führt [175,176,180]. Insgesamt können die ERK1/2-Kinasen also aktiv zur Proteinerhöhung von Hsp90 beitragen und umgekehrt kann Hsp90 eine stärkere Aktivierung von Raf und MEK1/2 hervorrufen, die letztendlich ERK1/2 phosphorylieren. Zusammenfassend ist Hsp90 eine essentielle Komponente im kardioprotektiven Mechanismus, da es direkt in die Apoptose-Induktion eingreift und protektive Signalwege wie ERK1/2 und Akt unterstützt. Diese Studie und Arbeiten von Wang *et al.* und Chen *et al.* zeigten übereinstimmend Hochregulationen von Hsp90 und P-Akt bei Hypoxie, die antiapoptotisch und zellprotektiv wirken [109,115].

Ein weiteres Zielprotein von ERK1/2 und Akt ist der Transkriptionsfaktor HIF-1 α , der mit HIF-1 β das physiologisch aktive HIF-1 bildet. HIF-1 ist ein ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor, der Gene für das Zellüberleben, die Zellproliferation, Angiogenese und den Glukosemetabolismus induziert und kardioprotektiv wirkt [181,182]. Bei der Bildung von HIF-1 ist die HIF-1 α -Untereinheit die limitierende Komponente. Sie wird sauerstoffunabhängig synthetisiert und sauerstoffabhängig degradiert.

Die HIF-1 α -Synthese wird über ERK1/2 und Akt gesteuert [183-185]. Beide Signalwege führen zur p70S6 Kinase, die das ribosomale S6 Protein (PS6) phosphoryliert und die Translation von HIF-1 α stimuliert. Western-Blot-Analysen zeigten eine signifikante Erhöhung der PS6-Phosphorylierung in ANT1-NRCM bei chronischer Hypoxie, während die WT-NRCM zeitgleich eine Herunterregulation aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Somit kann die hohe HIF-1 α -Proteinmenge der ANT1-NRCM, sofern diese auf einer erhöhten Synthese beruht, mit der Aktivierung von Akt in Verbindung stehen.

Diese Studie zeigte insgesamt, dass hypoxische ANT1-NRCM die ERK1/2- und Akt-Signalwege massiv aktivierten und protektive Komponenten wie Hsp90 und HIF-1 α verstärkt exprimierten. Dadurch können apoptotische Prozesse gezielt blockiert und Nekrose reduziert werden. Die direkten Zusammenhänge zwischen dem erhöhten ANT1 und den Signalkomponenten sind jedoch weitgehend unklar. Erste Hinweise auf eine Interaktion zwischen ANT1 und Akt lieferten Kobayashi *et al.* mittels Immunpräzipitation [186]. Zudem identifizierten Edmondson *et al.* spezifische Interaktome, in denen der ANT1 zusammen mit ERK1/2, HIF-1 α und Akt kolokalisiert ist [187]. Demzufolge ist der ANT1 eine essentielle Komponente im Netzwerk des zellulären *Signalings*. Änderungen der ANT1-Expression und folglich Funktion können das System maßgeblich beeinflussen.

Auf der Suche nach potentiellen Kinasen, die in Verbindung mit ANT1 die Akt- und ERK1/2-Signalwege weiter aufwärts stimulieren, traten die Proteinkinase C ϵ (PKC ϵ) und die Src-Kinase in den Fokus, wobei letztere ANT1 im Mitochondrium phosphoryliert [188]. Western-Blot-Analysen zeigten jedoch, dass sich die Src-Aktivierungen zwischen ANT1- und WT-NRCM bei Hypoxie nicht änderten

(Daten nicht gezeigt). Demnach scheidet diese Kinase vermutlich als Hauptaktivator in den ANT1-NRCM aus. Die PKC ϵ bildet im Herzen Multiproteinkomplexe mit dem ANT1, der PI3K, Akt, Ras, ERK1/2 und der Src-Kinase und ist als kardioprotektive Komponente beschrieben [189,190]. Die Rolle der PKC ϵ bei Hypoxie muss in weiteren Experimenten überprüft werden. Insgesamt bestätigten verschiedene Studien, dass der ANT1 direkt oder indirekt mit Signalkomponenten interagiert und vermutlich als Energielieferant die notwendige Energie für die Phosphorylierungen liefert [155,191]. Der Einfluss des ANT1 auf die intrazellulären Signalkaskaden lässt sich auch über die Modulation von Membranrezeptoren erklären. Zum einen führt die ANT1-Überexpression zur Reduktion von TGF- β II-Rezeptoren auf der Plasmamembran, was eine verminderte Ansprechbarkeit von ANT1-ARCM auf TGF- β 1 hervorruft und in der Zelle die Apoptoseinduktion unterdrückt [163]. Zum anderen wird der ANT1 in der Plasmamembran von Neuronen lokalisiert, wo er direkt mit dem Zelladhäsionsprotein L1 interagiert und das Neuritenwachstum fördert [155]. Der ANT1 kann somit durch die Interaktion mit Membranproteinen Signale ins Extra- bzw. Intrazelluläre vermitteln.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse dieser Studie, dass eine transgene ANT1-Überexpression in hypoxischen NRCM ATP-Mangel und ROS-Bildung reduziert, vor Nekrose und Apoptose schützt und die Zellviabilität fördert. Dieser Effekt basiert möglicherweise auf einer massiven Aktivierung der Akt- und ERK1/2-Signalwege, die in Verbindung mit Hsp90 und HIF-1 α protektiv wirken.

4.2 Kardioprotektive Wirkung von ANT1 bei Ischämie

Eine ANT1-Überexpression demonstrierte *in vitro* bei Hypoxie protektive Effekte. Daher wurde analysiert, ob die Protektion auch *in vivo* bei kardialer Ischämie zu beobachten ist. Die Dauer der Ischämie betrug 24 h, parallel zur akuten Hypoxie. Tatsächlich wiesen die ischämischen ANT1-Ratten eine geringere Myokardinfarktgröße und eine deutlich höhere Überlebensrate auf als die WT. Die höhere Überlebensrate war auch in diesem Modell mit reduziertem oxidativen Stress gekoppelt. Dieser wurde anhand der Peroxidkonzentration im Blutserum gemessen. Während die ischämischen WT-Ratten im Vergleich zu den WT-Kontrollen eine signifikant höhere Peroxidmenge im Serum aufwiesen, blieb diese in den ANT1-Ratten unverändert. Darauf basierend waren die oxidativen Proteinmodifikationen im Gewebe der ischämischen WT-Ratten erhöht, wohingegen die ischämischen ANT1-Ratten keine Erhöhung zeigten. Demnach besitzen die ANT1-Tiere einen effektiveren Schutz vor oxidativem Stress, der *in vitro* und *in vivo* vor Zerstörung schützt.

Im Modell des ischämischen *Preconditionings* werden Tiere einzelnen kurzen Ischämie-Episoden ausgesetzt, die vor Zerstörung schützen, sobald eine lange gewebeschädigende Ischämie-Phase erfolgt

[192]. Als Schutzmechanismus wird der ANT hochreguliert, die mitochondriale Atmungskette stabilisiert, oxidativer Stress reduziert und intrazelluläre Signalkaskaden wie ERK1/2 aktiviert [193-196]. Eine ANT1-Überexpression induzierte ähnliche Effekte (Kapitel 4.1:[50]), sodass die zentrale Rolle des ANT1 bei der Kardioprotektion bestätigt wird.

4.3 Einfluss des ANT1 auf den kontraktilen Mechanismus des Herzens

Bislang konnte gezeigt werden, dass eine herzspezifische ANT1-Überexpression viele intrazelluläre Prozesse positiv beeinflusst und bei Herzerkrankungen kardioprotektiv wirkt. Die Induktion eines ANT1-*Knock-Outs* hingegen verursacht in Mäusen eine mitochondriale Myopathie mit kardialer Hypertrophie [45]. Hypertrophierte Herzen besitzen zerstörte und unstrukturierte Muskelfasern mit veränderten Sarkomerstrukturen, die insbesondere durch fehlende kontraktile Proteine wie Myosin charakterisiert sind [197]. Diese Defekte führen zum Verlust der kontraktilen Funktion. Zudem treten Einschränkungen im Ca^{2+} -Haushalt auf, die durch verminderte Ca^{2+} -Transportprozesse insbesondere von SERCA2a gekennzeichnet sind [197]. Daher wurde untersucht, ob eine ANT1-Überexpression diese Prozesse grundsätzlich beeinflusst und die kontraktile Funktion der Kardiomyozyten fördert.

Zur Untersuchung der kontraktilen Funktion wurden ARCM mit steigenden Frequenzen von 0,5 Hz, 1 Hz und 2 Hz stimuliert und die Parameter TTP und RT50 gemessen. Die ANT1-ARCM zeigten anhand der Reduktion von TTP und RT50 bei allen Frequenzen eine enorme Steigerung ihrer Kontraktilität. Zusätzlich ergaben mikroskopische Analysen, dass ANT1-ARCM in ihrer Zelllänge und Zellbreite vergrößert waren, folglich die Zellvolumina anstiegen und die Zellen eine physiologische Hypertrophie aufwiesen. Die physiologische Hypertrophie der Zellen kann mit der Gewichtszunahme und Vergrößerung der Herzen assoziiert sein, die in einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe beobachtet wurde [50]. Da die Gewichtszunahme der Herzen *in vivo* an ein höheres Körpergewicht der ANT1-Tiere gekoppelt war, ergaben sich dabei für die relativen Herzgewichte keine signifikanten Unterschiede.

Wir postulieren, dass die morphologischen Veränderungen der ANT1-ARCM zur gesteigerten kontraktilen Funktion beitragen und mit der vermehrten Expression kontraktiler Proteine wie Aktin, TnI und insbesondere Myosin assoziiert sind. Myosin stellt das häufigste Protein der Herzmuskelzellen dar. In kardialem Gewebe kommen die Homodimere aus α MHC und β MHC am häufigsten vor. Die verwendeten Ratten besitzen ca. 80% α MHC und 20% β MHC im Herzen [198]. Grundsätzlich wird β MHC als langsames Myosin beschrieben, während α MHC als schnelle Isoform gilt [199]. Da die ANT1-Hezen nur eine leichte Expressionserhöhung von β MHC aufwiesen, ist die Hauptzunahme des

gesamten Myosins auf α MHC, der schnellen Isoform, zurückzuführen, was zur Kontraktionssteigerung beiträgt. Dass die zusätzlichen kontraktile Proteine die Sarkomerstruktur und Organisation nicht beeinträchtigen, zeigten elektronenmikroskopische Aufnahmen von Längsschnitten der Herzen [50]. Sowohl die WT- als auch ANT1-Herzen besitzen eine regelmäßige Anordnung der Myofibrillen und einzelnen Sarkomere, die deutliche I-Banden, A-Banden, gut definierte Z-Banden sowie M-Linien aufweisen. Somit assemblieren die ANT1-Herzen vermutlich mehr neu gebildete Myofibrillen in der Zelle, die in geordneter Struktur zur gesteigerten Kontraktilität und einem erhöhten Zellvolumen beitragen.

Neben dem kontraktile Material, wurden auch die energieabhängigen Ca^{2+} -ATPasen SERCA2a und PMCA in den ANT1-Herzen hochexprimiert. Diese transportieren zusammen mit dem NCX, dessen Proteinmengen unverändert blieben, zytosolisches Ca^{2+} ins Extrazelluläre und leiten dadurch die Relaxation ein. Da der NCX und die PMCA nur geringfügig zur diastolischen Ca^{2+} -Reduktion beitragen [200,201], ist SERCA2a die essentielle Komponente bei der Relaxation im kontraktile Mechanismus [200,202,203]. Abgesehen vom erhöhten SERCA2a-Proteinlevel, war auch die SERCA2a-Aktivität signifikant erhöht. Somit ist die beschleunigte Relaxationszeit (RT50) der ANT1-ARCM vermutlich auf einen erhöhten SERCA2a-abhängigen Ca^{2+} -Rücktransport zurückzuführen. Diese Ergebnisse stimmen mit anderen Studien überein, in denen eine Hochregulation von SERCA2a zu einem beschleunigten Ca^{2+} -Rücktransport führt, der die Kontraktilität steigert [204-208]. Del Monte *et al.* beschrieben beispielsweise, dass eine SERCA2a-Überexpression in Myozyten von Patienten mit Herzinsuffizienz die SERCA2a-Aktivität erhöht und die kontraktile Funktion verbessert [205]. Auch war ein erhöhtes SERCA2a-Proteinlevel im Atrium von Ratten mit einer erhöhten Pumpfunktion verbunden, die in eine geringere atriale Kontraktionszeit mündet [209].

Die Pumpaktivität von SERCA2a wird im Wesentlichen durch die dephosphorylierte Form von PLB reguliert, das als inhibitorisches Protein an SERCA2a bindet und die Ca^{2+} -Affinität sowie die SR Ca^{2+} -Aufnahme reduziert. Daraus folgt eine Verlangsamung der kardialen Relaxation und Reduktion der SR Ca^{2+} -Konzentration. Die Phosphorylierung von PLB hebt den inhibitorischen Einfluss auf [210,211]. Untersuchungen in dieser Studie ergaben, dass das Verhältnis von dephosphoryliertem PLB zu SERCA2a in den ANT1-Herzen um 30% abnahm, was vermutlich die SERCA2a-Aktivität steigert und die Relaxationszeit verkürzt.

Die Kontraktionsamplitude wird in Myozyten mit spezifischer Vorspannung durch systolische Ca^{2+} -Einwärtsströme bestimmt. Diese erfolgen über DHPR der Plasmamembran und RyR des SRs, wobei letztere für den größten Anteil des Ca^{2+} -Einstroms verantwortlich sind [212]. Die Proteinmengen der DHPR und RyR waren in den ANT1-Herzen im Vergleich zum WT nicht verändert (Daten nicht

gezeigt). Unabhängig davon ist das Ausmaß der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR von der freien Ca^{2+} -Konzentration abhängig [119,125,213]. Die hohe SERCA2a-Aktivität der ANT1-Herzen in Verbindung mit gleichbleibender Calsequestrin-Proteinmenge (Daten nicht gezeigt), das als Ca^{2+} -Bindeprotein Ca^{2+} im SR bindet, erhöht vermutlich die freie Ca^{2+} -Konzentration. Daraus folgt ein vermehrter Ca^{2+} -Ausstrom und Aktivierung der kontraktilen Proteine.

In diesen Analysen konnte gezeigt werden, dass ANT1-Rattenherzen basal über größere Mengen an kontraktilen Proteinen verfügen, die vermutlich eine physiologische Hypertrophie verursachen und zur schnelleren Kontraktion beitragen. Somit können die Tiere Defekte, die bei myokardialen Dysfunktionen auftreten, effektiver kompensieren. Walther *et al.* zeigten beispielsweise, dass doppeltransgene ANT1/REN-Ratten über signifikant weniger pathologische Veränderungen im Myokard verfügen als die reinen REN-Tiere [50]. Diese entwickeln einen fulminanten Bluthochdruck mit kardialer Hypertrophie. Die Hypertrophie ist durch eine deutliche interstitielle Fibrose charakterisiert, die zerstörte kontraktile Strukturen aufweist. Im Gegensatz dazu besitzen ANT1/REN-Ratten eine intakte myokardiale Struktur mit signifikant reduzierter Fibrose. Auch können die Tiere die kardiale Funktion aufrechterhalten und einer Hypertrophie entgegenwirken. Ferner sind myokardiale Dysfunktionen häufig mit reduzierter SERCA2a-Proteinmenge und -Aktivität verbunden [203,214,215], die mit Hilfe einer SERCA2a-Überexpression kompensiert werden [208]. Demzufolge kann die hohe SERCA2a-Proteinmenge und -Aktivität in ANT1-Rattenherzen kompensatorisch bei myokardialer Dysfunktion wirken. Zusammenfassend wird deutlich, dass sich eine transgene ANT1-Überexpression im Myokard positiv auf das kontraktile System auswirkt. Die kontraktilen Proteine sowie Ca^{2+} -ATPasen werden basal hochreguliert und die SERCA2a-Aktivität verstärkt, was die Kontraktion und Relaxation beschleunigt.

4.4 IL-1 β reguliert die Genexpression von ANT1

Die kardiale ANT1-Überexpression ist in vielen Krankheitsmodellen mit kardioprotektiven Eigenschaften verbunden. Daher war es von besonderem Interesse Substanzen zu identifizieren, die die ANT1-Genexpression regulieren. Für diese Untersuchungen wurden Plasmidkonstrukte mit unterschiedlich langen murinen ANT1-Promotorbereichen hergestellt. Als Expressionssystem dienen mausspezifische HL-1-Zellen, die eine hohe Transfektionseffizienz aufwiesen und zudem über die morphologischen, biochemischen und elektrophysiologischen Eigenschaften von adulten Kardiomyozyten verfügen [216,217]. Unter basalen Bedingungen wies der 4 kB-ANT1-Promotor die größte Transkriptionsaktivierung auf, sodass dieser für die weiterführenden Stimulationsversuche

eingesetzt wurde. Die Stimulation mit den intrinsischen Faktoren TGF- β 1, TNF α und IL-4, die den Energiestoffwechsel beeinflussen, führte nicht zur veränderten Promotoraktivierung. Auffällig war, dass IL-1 β die ANT1-Promotoraktivität signifikant reduzierte. Auch zeigten Untersuchungen in NRCM eine Herunterregulation der endogenen ANT1-mRNA durch IL-1 β . IL-1 β ist ein Zytokin, das bei Herzinsuffizienz von Kardiomyozyten sezerniert und über Rezeptoren Nachbarzellen stimuliert. IL-1 β setzt die mitochondriale Funktion herab, verursacht Fibrose und Apoptose und führt schließlich zur Myokardhypertrophie [218]. Diese Krankheitsbilder sind gleichzeitig mit einer reduzierten ANT1-Expression verbunden [24]. Deshalb könnte die Hemmung des IL-1 β -*Signalings* zur Stabilisierung der ANT1-Expression und der mitochondrialen Funktion führen und unter pathophysiologischen Bedingungen Fibrose und Apoptose reduzieren [219].

Die Arbeiten von Buck *et al.* und Chen *et al.* lieferten Hinweise auf eine Hochregulation des ANT1 durch TGF- β 1 und IL-1 β in primären Astrozyten bzw. beta-Zellen des Pankreas [39,220]. Die TGF- β 1-Stimulation in Astrozyten erfolgt über rezeptoraktivierte SMADs, die nachfolgend SP1-Transkriptionsfaktoren aktivieren und die Promotorfunktion des ANT1 erhöhen. SP1 bindet an eine spezifische Sequenz im proximalen ANT1-Promotor, die auch im kardialen ANT1 vorhanden ist. Trotz allem konnten wir für TGF- β 1 keine vermehrte ANT1-Promotorstimulation und Genexpression beobachten. Überdies belegten eigene experimentelle Vorarbeiten, dass ARCM keine veränderte endogene ANT1-Genexpression nach TGF- β 1-Stimulation aufwies. Auch zeigten kardiale Zellen nach IL-1 β -Stimulation keine ANT1-Promotoraktivierung bzw. Steigerung der endogenen ANT1-Expression. Im Gegenteil, IL-1 β regulierte ANT1 herunter. Demzufolge sind die TGF- β 1- und IL-1 β -Effekte offensichtlich zelltypspezifisch. Zusammenfassend ist festzustellen, dass IL-1 β in transfizierten murinen HL-1-Zellen und in NRCM als ANT1-Regulator fungiert. Eine Inhibierung des IL-1 β -Wirkmechanismus kann unter pathophysiologischen Bedingungen die ANT1-Genexpression stabilisieren und kardioprotektive Effekte erzielen.

4.5 ANT1-spezifische Charakteristika und Kardioprotektion

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit und den bislang publizierten Studien kann geschlossen werden, dass die transgene ANT1-Überexpression in Rattenherzen bzw. Kardiomyozyten unter pathophysiologischen Bedingungen protektiv wirkt. Auch im basalen Zustand können Veränderungen intrazellulärer Prozesse als Folge der ANT1-Überexpression beobachtet werden, was gute Voraussetzungen schafft, um das Herz vor krankheitsbedingten Zellschädigungen zu schützen.

1) Die ANT1-Überexpression steigert basal die ANT1-Proteinmenge (Kapitel 4.1.1) und -Aktivität und beschleunigt dadurch den ATP/ADP-Transport über der IMM [50]. Sie erhöht die Aktivität der Atmungskettenkomplexe CII-CIV, was zur besseren energetischen Kopplung der Atmungskette führt [50]. Somit können Defekte der Atmungskettenfunktion, wie bei Hypoxie oder Hypertonie-induzierter Hypertrophie, kompensiert werden. Darüber hinaus stabilisiert die ANT1-Überexpression das Kreatinkinase-System bei Hypertonie-induzierter Hypertrophie, was die Energiezufuhr sicherstellt [50].

2) Über die Regulation der Apoptose ist bekannt, dass der ANT1 in ANT1-ARCM die MPTP stabilisiert und in Gegenwart von Ca^{2+} die Öffnungswahrscheinlichkeit der MPTP reduziert. Eine Verhinderung der Apoptose-Induktion bei TGF- β 1-Stimulation durch die ANT1-basierte Stabilisierung der MPTP und des Membranpotentials, schützt die Zellen vor Zerstörung [163]. Die ANT1-ARCM weisen außerdem nach TGF- β 1-Stimulation eine Expressionserhöhung von Bcl-2 auf, das die MPTP-Öffnung verhindert. Auch unter anderen pathophysiologischen Bedingungen wie Hypoxie (Kapitel 4.1.3) oder Hypertonie-induzierter Hypertrophie [50] ist eine geringere Apoptoserate messbar. Ob die verminderte Apoptoserate in diesen Krankheitsbildern tatsächlich mit der Blockierung der MPTP assoziiert ist oder über den extrinsischen Weg verläuft, muss überprüft werden.

3) Die ANT1-Überexpression schützt bei Ischämie und Hypoxie vor oxidativem Stress (Kapitel 4.1.1 und 4.2). Offensichtlich verfügen die ANT1-Ratten bzw. ANT1-NRCM unter pathophysiologischen Bedingungen über effektivere Abwehrmechanismen, die eine Überproduktion von ROS verhindern.

4) Die ANT1-NRCM aktivieren bei Hypoxie verstärkt die intrazellulären Akt- und ERK1/2-Signalwege, die in Verbindung mit Hsp90 und HIF-1 α maßgeblich zur Zellprotektion beitragen (Kapitel 4.1.4). Durch die Interaktion des ANT1 mit zellulären Signalkomponenten und membranständigen Proteinen bzw. Rezeptoren kann der ANT1 direkt in die Zellkommunikation eingreifen [155,163].

5) ANT1-Rattenherzen verfügen basal über große Mengen an myofibrillären Proteinen, die zur Stabilisierung der Myozytenstruktur beitragen und zusammen mit einer höheren Expression und Aktivität von SERCA2a die kontraktile Funktion der Myozyten steigern (Kapitel 4.3). Die basalen Kontraktionssteigerungen können unter pathophysiologischen Bedingungen protektiv wirken. Bei der diabetischen Kardiomyopathie und Hypertonie-induzierten Herzerkrankung konnte die kontraktile Funktion durch die ANT1-Überexpression stabilisiert werden [50,51].

Insgesamt führen alle genannten Charakteristika zur basalen Stabilisierung der Myozyten und verleihen dem ANT1 kardioprotektive Wirkungen.

5. Zusammenfassung

Der Adeninukleotid-Translokator (ANT) ist eine zentrale Komponente des mitochondrialen Energiestoffwechsels. Er ermöglicht den Austausch von zytosolischem ADP und mitochondrialem ATP über die innere mitochondriale Membran. Darüber hinaus ist der ANT ein essentieller Regulator der Apoptose.

Herzerkrankungen wie Ischämie und Hypoxie sind mit einem gestörten Energiestoffwechsel und einer ANT-Dysfunktion verbunden. Dies führt zur Reduktion des intrazellulären ATP-Gehalts, zur Entstehung von oxidativem Stress und zum Zusammenbruch der zellulären Homöostase, was Nekrose und Apoptose auslöst. Im ersten Teil der Arbeit wurde daher analysiert, ob eine ANT1-Überexpression bei Hypoxie und Ischämie protektiv wirkt.

Im Hypoxie-Modell wurden WT- und ANT1-neonatale Rattenkardiomyozyten (NRCM) für 24 h (akut) und 48 h (chronisch) hypoxischen Bedingungen ausgesetzt und in Bezug auf die zuvor genannten Veränderungen analysiert. Hypoxische WT-NRCM zeigten im Verlauf der Hypoxie einen stetig abnehmenden ATP-Gehalt, der in den ANT1-NRCM hingegen zunächst unbeeinflusst blieb und sich erst bei chronischer Hypoxie reduzierte. Darüber hinaus war die Produktion von Sauerstoffradikalen in den ANT1-NRCM signifikant geringer und parallel dazu wurde das antioxidative Stress-System nicht aktiviert. Ein stabilerer Energiemetabolismus und verminderter oxidativer Stress trugen zur Hemmung der Apoptose- und Nekrose in den ANT1-NRCM bei akuter und chronischer Hypoxie bei. Zudem mussten weitere Schutzmechanismen existieren, die die ANT1-NRCM effektiver vor Apoptose und Nekrose-Induktion schützten. Diese Studie zeigte, dass die zellprotektiv wirkenden Akt- und ERK1/2-Signalwege in den ANT1-NRCM verstärkt aktiviert waren. Auch wurde das Hitzeschockprotein 90, ein Chaperon und Stabilisator der aktiven Akt, verstärkt gebildet. Die Akt- und ERK1/2-Kinasen fördern das Überleben der Zelle durch Aktivierung anti-apoptotischer Zielproteine und Hemmung pro-apoptotischer Faktoren, wie die Initiator-Caspase-9, was die verminderte Aktivierung von Caspase-3/7 und die geringere DNA-Fragmentierung in ANT1-NRCM erklärt. Darüber hinaus aktivieren Akt und ERK1/2 den Transkriptionsfaktor HIF-1 α , der das Überleben der Zellen sichert und in ANT1-NRCM vermehrt gebildet wurde. Insgesamt führen ein stabilerer Energiemetabolismus, geringerer oxidativer Stress sowie die massive Aktivierung von protektiven Akt- und ERK1/2-Signalwegen bei Hypoxie in ANT1-überexprimierenden NRCM zu einer erhöhten Resistenz gegen Apoptose- und Nekrose.

Auch *in vivo* war ein deutlich positiver Effekt der ANT1-Überexpression zu beobachten. ANT1-Ratten zeigten bei myokardialer Ischämie eine höhere Überlebensrate, im Vergleich zum WT, nach Ligatur der linken proximalen Koronararterie. Die ANT1-Ratten besaßen zudem ein geringeres Infarktareal und einen unauffälligen Peroxidanteil im Blutserum sowie weniger Proteincarbonylierungen als Zeichen von vermindertem oxidativen Stress.

Frühere Studien belegen, dass eine ANT1-Überexpression im Myokard unter pathophysiologischen Bedingungen die Myozytenstruktur und -funktion stabilisiert [50]. Daher wurde im zweiten Teil dieser Arbeit untersucht, ob die transgene ANT1-Überexpression schon unter basalen Bedingungen das kontraktile System und den Ca^{2+} -Haushalt sowie die Morphologie der Kardiomyozyten beeinflusst. ANT1-Ratten exprimierten im Vergleich zum WT verstärkt kontraktile Proteine wie Myosin, Aktin und Troponin I sowie die Ca^{2+} -ATPasen PMCA und SERCA2a im Myokard, die für den Ca^{2+} -Rücktransport bei der Relaxation verantwortlich sind. Parallel dazu nahm die SERCA2a-Aktivität signifikant zu. Diese Protein- und Aktivitätsänderungen resultierten in einer zellulären physiologischen Hypertrophie und einer beschleunigten Kontraktilität von ANT1-adulten Rattenkardiomyozyten. Somit nimmt der ANT1 nicht nur Einfluss auf die mitochondriale Funktion und die Apoptose, sondern stabilisiert das kontraktile System [170], so dass dieses protektiv kontraktile Dysfunktionen kompensieren kann.

Die kardiale ANT1-Überexpression beeinflusst basal und unter pathophysiologischen Bedingungen viele intrazelluläre Prozesse. Daher war es von besonderem Interesse, Substanzen zu identifizieren, die die ANT1-Genexpression regulieren. Für diese Untersuchungen wurde ein Reporterplasmid generiert, bei dem eine Luziferase unter der Kontrolle von Promotorelementen des murinen ANT1-Gens stand. Nach Transfektion in kardiale HL-1-Zellen erfolgte die Stimulation mit IL-1 β , TGF- β 1, TNF α und IL-4, die das Entzündungsgeschehen, die Zelldifferenzierung, Apoptose und den Energiestoffwechsel beeinflussen. Parallel dazu wurde die Wirkung der Stimulanzen auf die endogene ANT1-Genexpression in NRCM untersucht. Auf Transkriptionsebene regulierte nur IL-1 β die ANT1-Expression herunter und bewirkt somit eine verminderte Stresstoleranz der Zellen.

Zusammenfassend wirkt die ANT1-Überexpression unmittelbar auf die zelluläre Stressresistenz. Über den gezeigten Einfluss auf den Apoptoseprozess, die Signaltransduktion und die Kontraktilität erweist sich der ANT1 als zentrale Regulationsstelle im intrazellulären Geschehen.

6. Summary

The adenine nucleotide translocase (ANT) is a central component of the mitochondrial energy metabolism. It facilitates the exchange of cytosolic ADP and intramitochondrial ATP across the inner mitochondrial membrane and is also involved in the regulation of apoptosis.

Heart diseases like ischemia and hypoxia are linked to a disturbed energy metabolism and ANT dysfunction that result into reduced ATP content, oxidative stress as well as cellular necrosis and apoptosis. In this study we analyzed, whether ANT1 overexpression has a protective effect against hypoxia and ischemia inducing cell damage.

In the experimental model of hypoxia, WT and ANT1 neonatal rat cardiomyocytes (NRCM) were incubated under hypoxic conditions for 24 h (acute) and 48 h (chronic) and were analyzed regarding the previously mentioned intracellular changes. WT-NRCM showed a continuous decline in ATP content in the course of hypoxia, while ATP content remained unaffected in hypoxic ANT1-NRCM in the acute phase and declined later during chronic hypoxia. In addition, ROS production was delayed and measurably lower in hypoxic ANT1-NRCM than in treated WT cells. In parallel, expression and activity of anti-oxidative stress enzymes remained unchanged in ANT1-NRCM under hypoxic conditions. A stable ATP content and less oxidative Stress in ANT1-NRCM support cell stability and thus, contribute to inhibition of apoptosis and necrosis observed in these cells. Besides, further mechanisms were identified, to protect cells more efficient against destruction. Those mechanisms included the higher activation of cell protective Akt and ERK1/2 signalling pathways in hypoxic ANT1-NRCM, which was supported by elevated expression of Hsp90, a chaperone and stabilizer of Akt. Both, Akt and ERK1/2 exert anti-apoptotic functions by promoting inhibition of pro-apoptotic components like Bad and caspase-9. These anti-apoptotic effects might explain the reduced caspase-3/7 activity and DNA-fragmentation observed in ANT1-NRCM. Besides acting anti-apoptotic, both Akt and ERK1/2 promote activation of the transcription factor HIF-1 α , which was enhanced in ANT1-NRCM and accounts for adaptation and survival of cells during hypoxia. Taken together, a stable ATP-content, less oxidative stress and massive activation of protective Akt and ERK1/2 signalling pathways during hypoxia in ANT1 overexpressing NRCM lead to a high resistance against apoptosis and necrosis.

The protective effect of ANT1 overexpression was also evident *in vivo*. ANT1-rats exhibited a reduction in infarct size and a higher survival rate during myocardial ischemia than WT animals, after ligation of the left descending coronary artery. Oxidative stress, measured by serum peroxide concentration and myocardial protein carbonylation, was also significantly lower in ischemic ANT1-rats.

Former studies reveal that myocardial ANT1 overexpression preserves cardiac structure and function under pathophysiological conditions [50]. To ascertain whether the contractile system is directly affected by ANT1 overexpression under basal conditions, we analyzed contraction and relaxation parameters, contractile protein expression, Ca^{2+} -handling, and cell morphology in these animals. ANT1-rat hearts displayed a marked increase in contractile proteins like myosin, actin and troponin I, as well as the Ca^{2+} -ATPases PMCA and SERCA2a, that are responsible for Ca^{2+} export during relaxation. In addition to SERCA2a protein, SERCA2a activity was significantly increased in ANT1-rat hearts. These structural and functional changes explain the cellular physiologic hypertrophy observed in isolated ANT1 adult rat cardiomyocytes and remarkably contribute to accelerated cardiac performance of these cells. Thus, ANT1 overexpression influences not only mitochondrial function, apoptosis and signal transduction. It also stabilises cardiac structure and function [170] and possesses a potency to compensate restricted cardiac contraction under pathophysiological conditions.

As described above, cardiac ANT1 overexpression affects various intracellular processes. Therefore, it was of particular interest, to identify substances that regulate ANT1 gene expression. For these analyses, reporter plasmids were generated, containing a luciferase under the control of promoter elements of the murine ANT1 gene. After transfection of these plasmids in cardiac HL-1-cells, cells were incubated with IL-1 β , TGF- β 1, TNF α and IL-4. These cytokines influence inflammation, cell differentiation, apoptosis and cellular energy metabolisms. In addition, the impact of stimulants to endogenous ANT1 gene expression in NRCM was analyzed. We found out, that IL-1 β downregulates ANT1 gene expression and consequently causes reduces stress tolerance of those cells in cardiac diseases.

In conclusion, ANT1 overexpression directly affects cellular stress resistance. Due to impact on apoptosis, signal transduction and contractile system, ANT1 plays an essential role in the intracellular networks.

7. Literaturverzeichnis

- [1] M. Klingenberg and D. R. Nelson, Structure-function relationships of the ADP/ATP carrier, *Biochim. Biophys. Acta*, 1187 (1994) 241-244.
- [2] M. Saraste and J. E. Walker, Internal sequence repeats and the path of polypeptide in mitochondrial ADP/ATP translocase, *FEBS Lett.*, 144 (1982) 250-254.
- [3] C. Hout-Gonzalez, H. Nury, V. Trezeguet, G. J. Lauquin, E. Pebay-Peyroula, and G. Brandolin, Molecular, functional, and pathological aspects of the mitochondrial ADP/ATP carrier, *Physiology*. (Bethesda.), 21 (2006) 242-249.
- [4] N. Gebert, M. T. Ryan, N. Pfanner, N. Wiedemann, and D. Stojanovski, Mitochondrial protein import machineries and lipids: a functional connection, *Biochim. Biophys. Acta*, 1808 (2011) 1002-1011.
- [5] J. C. Young, N. J. Hoogenraad, and F. U. Hartl, Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70, *Cell*, 112 (2003) 41-50.
- [6] N. Wiedemann, N. Pfanner, and M. T. Ryan, The three modules of ADP/ATP carrier cooperate in receptor recruitment and translocation into mitochondria, *EMBO J.*, 20 (2001) 951-960.
- [7] S. P. Curran, D. Leuenberger, W. Oppliger, and C. M. Koehler, The Tim9p-Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ADP/ATP carrier, *EMBO J.*, 21 (2002) 942-953.
- [8] C. Sirrenberg, M. F. Bauer, B. Guiard, W. Neupert, and M. Brunner, Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22, *Nature*, 384 (1996) 582-585.
- [9] A. Vasiljev, U. Ahting, F. E. Nargang, N. E. Go, S. J. Habib, C. Kozany, V. Panneels, I. Sinning, H. Prokisch, W. Neupert, S. Nussberger, and D. Rapaport, Reconstituted TOM core complex and Tim9/Tim10 complex of mitochondria are sufficient for translocation of the ADP/ATP carrier across membranes, *Mol. Biol. Cell*, 15 (2004) 1445-1458.
- [10] M. Klingenberg, The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier, *Biochim. Biophys. Acta*, 1778 (2008) 1978-2021.
- [11] E. Pfaff, M. Klingenberg, and H. W. Heldt, Unspecific permeation and specific exchange of adenine nucleotides in liver mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta*, 104 (1965) 312-315.
- [12] E. Pfaff and M. Klingenberg, Adenine nucleotide translocation of mitochondria. 1. Specificity and control, *Eur. J. Biochem.*, 6 (1968) 66-79.
- [13] M. Klingenberg, I. Mayer, and A. S. Dahms, Interaction of fluorescent adenine nucleotide derivatives with the ADP/ATP carrier in mitochondria. 2. [5-(Dimethylamino)-1-naphthoyl]adenine nucleotides as probes for the transition between c and m states of the ADP/ATP carrier, *Biochemistry*, 23 (1984) 2442-2449.
- [14] E. Metelkin, I. Goryanin, and O. Demin, Mathematical modeling of mitochondrial adenine nucleotide translocase, *Biophys. J.*, 90 (2006) 423-432.

- [15] E. D. Duee and P. V. Vignais, Kinetics and specificity of the adenine nucleotide translocation in rat liver mitochondria, *J. Biol. Chem.*, 244 (1969) 3920-3931.
- [16] R. Kramer and M. Klingenberg, Modulation of the reconstituted adenine nucleotide exchange by membrane potential, *Biochemistry*, 19 (1980) 556-560.
- [17] S. Giraud, C. Bonod-Bidaud, M. Wesolowski-Louvel, and G. Stepien, Expression of human ANT2 gene in highly proliferative cells: GRBOX, a new transcriptional element, is involved in the regulation of glycolytic ATP import into mitochondria, *J. Mol. Biol.*, 281 (1998) 409-418.
- [18] M. Klingenberg and H. Rottenberg, Relation between the gradient of the ATP/ADP ratio and the membrane potential across the mitochondrial membrane, *Eur. J. Biochem.*, 73 (1977) 125-130.
- [19] R. Kramer and M. Klingenberg, Electrophoretic control of reconstituted adenine nucleotide translocation, *Biochemistry*, 21 (1982) 1082-1089.
- [20] M. A. Portman, Y. Xiao, Y. Song, and X. H. Ning, Expression of adenine nucleotide translocator parallels maturation of respiratory control in heart in vivo, *Am. J. Physiol.*, 273 (1997) H1977-H1983.
- [21] M. A. Portman and X. H. Ning, Maturation changes in respiratory control through creatine kinase in heart in vivo, *Am. J. Physiol.*, 263 (1992) C453-C460.
- [22] A. P. Halestrap and C. Brenner, The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death, *Curr. Med. Chem.*, 10 (2003) 1507-1525.
- [23] R. Benz, Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins, *Biochim. Biophys. Acta*, 1197 (1994) 167-196.
- [24] L. Ebermann, Die mitochondriale Funktion bei Coxsackievirus B3-induzierter Myokarditis: Wirkung einer kardialen Überexpression des Adeninnukleotid-Translokators, Dissertation, Freie Universität Berlin, (2010).
- [25] A. Doerner, M. Pauschinger, A. Badorff, M. Noutsias, S. Giessen, K. Schulze, J. Bilger, U. Rauch, and H. P. Schultheiss, Tissue-specific transcription pattern of the adenine nucleotide translocase isoforms in humans, *FEBS Lett.*, 414 (1997) 258-262.
- [26] V. Dolce, P. Scarcia, D. Iacopetta, and F. Palmieri, A fourth ADP/ATP carrier isoform in man: identification, bacterial expression, functional characterization and tissue distribution, *FEBS Lett.*, 579 (2005) 633-637.
- [27] A. Dorner, M. Olesch, S. Giessen, M. Pauschinger, and H. P. Schultheiss, Transcription of the adenine nucleotide translocase isoforms in various types of tissues in the rat 1, *Biochim. Biophys. Acta*, 1417 (1999) 16-24.
- [28] S. E. Levy, Y. S. Chen, B. H. Graham, and D. C. Wallace, Expression and sequence analysis of the mouse adenine nucleotide translocase 1 and 2 genes, *Gene*, 254 (2000) 57-66.
- [29] D. H. Ku, J. Kagan, S. T. Chen, C. D. Chang, R. Baserga, and J. Wurzel, The human fibroblast adenine nucleotide translocator gene. Molecular cloning and sequence, *J. Biol. Chem.*, 265 (1990) 16060-16063.

- [30] K. Li, C. K. Warner, J. A. Hodge, S. Minoshima, J. Kudoh, R. Fukuyama, M. Maekawa, Y. Shimizu, N. Shimizu, and D. C. Wallace, A human muscle adenine nucleotide translocator gene has four exons, is located on chromosome 4, and is differentially expressed, *J. Biol. Chem.*, 264 (1989) 13998-14004.
- [31] R. Battini, S. Ferrari, L. Kaczmarek, B. Calabretta, S. T. Chen, and R. Baserga, Molecular cloning of a cDNA for a human ADP/ATP carrier which is growth-regulated, *J. Biol. Chem.*, 262 (1987) 4355-4359.
- [32] A. Dorner and H. P. Schultheiss, Adenine nucleotide translocase in the focus of cardiovascular diseases, *Trends Cardiovasc. Med.*, 17 (2007) 284-290.
- [33] A. B. Chung, G. Stepien, Y. Haraguchi, K. Li, and D. C. Wallace, Transcriptional control of nuclear genes for the mitochondrial muscle ADP/ATP translocator and the ATP synthase beta subunit. Multiple factors interact with the OXBOX/REBOX promoter sequences, *J. Biol. Chem.*, 267 (1992) 21154-21161.
- [34] K. Li, J. A. Hodge, and D. C. Wallace, OXBOX, a positive transcriptional element of the heart-skeletal muscle ADP/ATP translocator gene, *J. Biol. Chem.*, 265 (1990) 20585-20588.
- [35] A. K. Law, D. Gupta, S. Levy, D. C. Wallace, R. J. McKeon, and C. R. Buck, TGF-beta1 induction of the adenine nucleotide translocator 1 in astrocytes occurs through Smads and Sp1 transcription factors, *BMC. Neurosci.*, 5 (2004) 1.
- [36] K. Luciakova, G. Kollarovic, P. Barath, and B. D. Nelson, Growth-dependent repression of human adenine nucleotide translocator-2 (ANT2) transcription: evidence for the participation of Smad and Sp family proteins in the NF1-dependent repressor complex, *Biochem. J.*, 412 (2008) 123-130.
- [37] G. Stepien, A. Torroni, A. B. Chung, J. A. Hodge, and D. C. Wallace, Differential expression of adenine nucleotide translocator isoforms in mammalian tissues and during muscle cell differentiation, *J. Biol. Chem.*, 267 (1992) 14592-14597.
- [38] J. Y. Jang and C. E. Lee, Mitochondrial adenine nucleotide translocator 3 is regulated by IL-4 and IFN-gamma via STAT-dependent pathways, *Cell Immunol.*, 226 (2003) 11-19.
- [39] M. C. Chen, F. Schuit, and D. L. Eizirik, Identification of IL-1beta-induced messenger RNAs in rat pancreatic beta cells by differential display of messenger RNA, *Diabetologia*, 42 (1999) 1199-1203.
- [40] H. P. Schultheiss, The significance of autoantibodies against the ADP/ATP carrier for the pathogenesis of myocarditis and dilated cardiomyopathy--clinical and experimental data, *Springer Semin. Immunopathol.*, 11 (1989) 15-30.
- [41] H. P. Schultheiss, P. Schwimmbeck, H. D. Bolte, and M. Klingenberg, The antigenic characteristics and the significance of the adenine nucleotide translocator as a major autoantigen to antimitochondrial antibodies in dilated cardiomyopathy, *Adv. Myocardiol.*, 6 (1985) 311-327.
- [42] H. P. Schultheiss and H. D. Bolte, Immunological analysis of auto-antibodies against the adenine nucleotide translocator in dilated cardiomyopathy, *J. Mol. Cell Cardiol.*, 17 (1985) 603-617.
- [43] M. Deschauer, G. Hudson, T. Muller, R. W. Taylor, P. F. Chinnery, and S. Zierz, A novel ANT1 gene mutation with probable germline mosaicism in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia, *Neuromuscul. Disord.*, 15 (2005) 311-315.

- [44] E. Z. Jordens, L. Palmieri, M. Huizing, L. P. van den Heuvel, R. C. Sengers, A. Dorner, W. Ruitenbeek, F. J. Trijbels, J. Valsson, G. Sigfusson, F. Palmieri, and J. A. Smeitink, Adenine nucleotide translocator 1 deficiency associated with Sengers syndrome, *Ann. Neurol.*, 52 (2002) 95-99.
- [45] B. H. Graham, K. G. Waymire, B. Cottrell, I. A. Trounce, G. R. MacGregor, and D. C. Wallace, A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator, *Nat. Genet.*, 16 (1997) 226-234.
- [46] L. A. Esposito, S. Melov, A. Panov, B. A. Cottrell, and D. C. Wallace, Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96 (1999) 4820-4825.
- [47] H. L. Vieira, A. S. Belzacq, D. Haouzi, F. Bernassola, I. Cohen, E. Jacotot, K. F. Ferri, H. C. El, L. M. Bartle, G. Melino, C. Brenner, V. Goldmacher, and G. Kroemer, The adenine nucleotide translocator: a target of nitric oxide, peroxynitrite, and 4-hydroxynonenal, *Oncogene*, 20 (2001) 4305-4316.
- [48] C. W. Zwizinski and H. H. Schmid, Peroxidative damage to cardiac mitochondria: identification and purification of modified adenine nucleotide translocase, *Arch. Biochem. Biophys.*, 294 (1992) 178-183.
- [49] S. Neubauer, The failing heart--an engine out of fuel, *N. Engl. J. Med.*, 356 (2007) 1140-1151.
- [50] T. Walther, C. Tschope, A. Sterner-Kock, D. Westermann, S. Heringer-Walther, A. Riad, A. Nikolic, Y. Wang, L. Ebermann, W. E. Siems, M. Bader, M. Shakibaei, H. P. Schultheiss, and A. Dorner, Accelerated mitochondrial adenosine diphosphate/adenosine triphosphate transport improves hypertension-induced heart disease 4, *Circulation*, 115 (2007) 333-344.
- [51] Y. Wang, L. Ebermann, A. Sterner-Kock, S. Wika, H. P. Schultheiss, A. Dorner, and T. Walther, Myocardial overexpression of adenine nucleotide translocase 1 ameliorates diabetic cardiomyopathy in mice, *Exp. Physiol*, 94 (2009) 220-227.
- [52] F. J. Giordano, Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure, *J. Clin. Invest*, 115 (2005) 500-508.
- [53] J. R. Neely, M. J. Rovetto, and J. F. Oram, Myocardial utilization of carbohydrate and lipids, *Prog. Cardiovasc. Dis.*, 15 (1972) 289-329.
- [54] J. R. Neely and H. E. Morgan, Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle, *Annu. Rev. Physiol*, 36 (1974) 413-459.
- [55] J.M. Berg, J.L. Tymoczko, and L. Stryer, *Biochemie*. 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin (2002).
- [56] M. A. Portman, Adenine nucleotide translocator in heart, *Mol. Genet. Metab*, 71 (2000) 445-450.
- [57] K. Gempel, M. F. Bauer, and K. D. Gerbitz, Mitochondriale Erkrankungen: Massenspektrometrie ergänzt biochemische und molekularbiologische Diagnostik von Fettsäure- und Aminosäurestoffwechselstörungen, *Deutsches Ärzteblatt* 96, Heft 47 (1999).
- [58] H. M. Piper and A. Das, Detrimental actions of endogenous fatty acids and their derivatives. A study of ischaemic mitochondrial injury, *Basic Res. Cardiol.*, 82 Suppl 1 (1987) 187-196.

- [59] J. C. Won, J. Y. Park, Y. M. Kim, E. H. Koh, S. Seol, B. H. Jeon, J. Han, J. R. Kim, T. S. Park, C. S. Choi, W. J. Lee, M. S. Kim, I. K. Lee, J. H. Youn, and K. U. Lee, Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1-alpha overexpression prevents endothelial apoptosis by increasing ATP/ADP translocase activity, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 30 (2010) 290-297.
- [60] J. Duranteau, N. S. Chandel, A. Kulisz, Z. Shao, and P. T. Schumacker, Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes, *J. Biol. Chem.*, 273 (1998) 11619-11624.
- [61] Q. Chen, S. Moghaddas, C. L. Hoppel, and E. J. Lesnefsky, Ischemic defects in the electron transport chain increase the production of reactive oxygen species from isolated rat heart mitochondria, *Am. J. Physiol Cell Physiol*, 294 (2008) C460-C466.
- [62] R. R. Wauer, D. Ganten, and K. Ruckpaul, *Molekularmedizinische Grundlagen von fetalen und neonalen Erkrankungen*, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (2005).
- [63] B. N. Ames, M. K. Shigenaga, and T. M. Hagen, Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90 (1993) 7915-7922.
- [64] M. N. Gadaleta, G. Rainaldi, A. M. Lezza, F. Milella, F. Fracasso, and P. Cantatore, Mitochondrial DNA copy number and mitochondrial DNA deletion in adult and senescent rats, *Mutat. Res.*, 275 (1992) 181-193.
- [65] D. C. Wallace, Mitochondrial diseases in man and mouse, *Science*, 283 (1999) 1482-1488.
- [66] A. C. Kulkarni, P. Kuppusamy, and N. Parinandi, Oxygen, the lead actor in the pathophysiologic drama: enactment of the trinity of normoxia, hypoxia, and hyperoxia in disease and therapy, *Antioxid. Redox. Signal.*, 9 (2007) 1717-1730.
- [67] A. Gossiau and L. Rensing, [Oxidative stress, age-dependent [correction of age-related] cell damage and antioxidative mechanisms], *Z. Gerontol. Geriatr.*, 35 (2002) 139-150.
- [68] E. R. Stadtman, Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions, *Annu. Rev. Biochem.*, 62 (1993) 797-821.
- [69] L. J. Marnett, Oxyradicals and DNA damage, *Carcinogenesis*, 21 (2000) 361-370.
- [70] L. Gao, K. Laude, and H. Cai, Mitochondrial pathophysiology, reactive oxygen species, and cardiovascular diseases, *Vet. Clin. North Am. Small Anim Pract.*, 38 (2008) 137-55, vi.
- [71] J. Giron-Calle, C. W. Zwizinski, and H. H. Schmid, Peroxidative damage to cardiac mitochondria. II. Immunological analysis of modified adenine nucleotide translocase, *Arch. Biochem. Biophys.*, 315 (1994) 1-7.
- [72] H. Nury, C. Hout-Gonzalez, V. Trezeguet, G. Lauquin, G. Brandolin, and E. Pebay-Peyroula, Structural basis for lipid-mediated interactions between mitochondrial ADP/ATP carrier monomers, *FEBS Lett.*, 579 (2005) 6031-6036.
- [73] J. Nordberg and E. S. Arner, Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system, *Free Radic. Biol. Med.*, 31 (2001) 1287-1312.

- [74] O. Blokhina, E. Virolainen, and K. V. Fagerstedt, Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review, *Ann. Bot.*, 91 Spec No (2003) 179-194.
- [75] G. R. Buettner, C. F. Ng, M. Wang, V. G. Rodgers, and F. Q. Schafer, A new paradigm: manganese superoxide dismutase influences the production of H₂O₂ in cells and thereby their biological state, *Free Radic. Biol. Med.*, 41 (2006) 1338-1350.
- [76] H. N. Kirkman and G. F. Gaetani, Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 81 (1984) 4343-4347.
- [77] H. N. Kirkman, M. Rolfo, A. M. Ferraris, and G. F. Gaetani, Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry, *J. Biol. Chem.*, 274 (1999) 13908-13914.
- [78] E. Marban, Y. Koretsune, M. Corretti, V. P. Chacko, and H. Kusuoka, Calcium and its role in myocardial cell injury during ischemia and reperfusion, *Circulation*, 80 (1989) IV17-IV22.
- [79] B. F. Trump and I. K. Berezsky, Calcium-mediated cell injury and cell death, *FASEB J.*, 9 (1995) 219-228.
- [80] M. R. Prasad, L. M. Popescu, I. I. Moraru, X. K. Liu, S. Maity, R. M. Engelman, and D. K. Das, Role of phospholipases A₂ and C in myocardial ischemic reperfusion injury, *Am. J. Physiol*, 260 (1991) H877-H883.
- [81] R. Ferrari, C. Ceconi, S. Curello, C. Guarnieri, C. M. Caldarera, A. Albertini, and O. Visioli, Oxygen-mediated myocardial damage during ischaemia and reperfusion: role of the cellular defences against oxygen toxicity, *J. Mol. Cell Cardiol.*, 17 (1985) 937-945.
- [82] M. Crompton, The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death, *Biochem. J.*, 341 (Pt 2) (1999) 233-249.
- [83] N. Johnson, A. Khan, S. Virji, J. M. Ward, and M. Crompton, Import and processing of heart mitochondrial cyclophilin D, *Eur. J. Biochem.*, 263 (1999) 353-359.
- [84] V. Petronilli, A. Nicolli, P. Costantini, R. Colonna, and P. Bernardi, Regulation of the permeability transition pore, a voltage-dependent mitochondrial channel inhibited by cyclosporin A, *Biochim. Biophys. Acta*, 1187 (1994) 255-259.
- [85] D. B. Zorov, M. Juhaszova, Y. Yaniv, H. B. Nuss, S. Wang, and S. J. Sollott, Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore, *Cardiovasc. Res.*, 83 (2009) 213-225.
- [86] M. K. Bauer, A. Schubert, O. Rocks, and S. Grimm, Adenine nucleotide translocase-1, a component of the permeability transition pore, can dominantly induce apoptosis, *J. Cell Biol.*, 147 (1999) 1493-1502.
- [87] C. Brenner, H. Cadiou, H. L. Vieira, N. Zamzami, I. Marzo, Z. Xie, B. Leber, D. Andrews, H. Duclouhier, J. C. Reed, and G. Kroemer, Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator, *Oncogene*, 19 (2000) 329-336.
- [88] I. Marzo, C. Brenner, N. Zamzami, J. M. Jurgensmeier, S. A. Susin, H. L. Vieira, M. C. Prevost, Z. Xie, S. Matsuyama, J. C. Reed, and G. Kroemer, Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis, *Science*, 281 (1998) 2027-2031.

- [89] P. Bernardi, R. Colonna, P. Costantini, O. Eriksson, E. Fontaine, F. Ichas, S. Massari, A. Nicolli, V. Petronilli, and L. Scorrano, The mitochondrial permeability transition, *Biofactors*, 8 (1998) 273-281.
- [90] P. T. Daniel, Zellzyklus und Apoptose. Molekulare Grundlagen von hämatologischen Neoplasien, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 11, (2003) 130-184.
- [91] X. Liu, C. N. Kim, J. Yang, R. Jemmerson, and X. Wang, Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c, *Cell*, 86 (1996) 147-157.
- [92] H. Zou, W. J. Henzel, X. Liu, A. Lutschg, and X. Wang, Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3, *Cell*, 90 (1997) 405-413.
- [93] S. J. Martin and D. R. Green, Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts?, *Cell*, 82 (1995) 349-352.
- [94] B. B. Wolf, M. Schuler, F. Echeverri, and D. R. Green, Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragmentation factor-45/inhibitor of caspase-activated DNase inactivation, *J. Biol. Chem.*, 274 (1999) 30651-30656.
- [95] M. Zaugg and M. C. Schaub, Signaling and cellular mechanisms in cardiac protection by ischemic and pharmacological preconditioning, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 24 (2003) 219-249.
- [96] C. P. Baines and J. D. Molkentin, STRESS signaling pathways that modulate cardiac myocyte apoptosis, *J. Mol. Cell Cardiol.*, 38 (2005) 47-62.
- [97] D. Ganten and K. Ruckpaul, Grundlagen der Molekularen Medizin. 3. Auflage, Springer Medizin-Verlag Heidelberg, (2008).
- [98] F. B. Mehrhof, F. U. Muller, M. W. Bergmann, P. Li, Y. Wang, W. Schmitz, R. Dietz, and H. R. von, In cardiomyocyte hypoxia, insulin-like growth factor-I-induced antiapoptotic signaling requires phosphatidylinositol-3-OH-kinase-dependent and mitogen-activated protein kinase-dependent activation of the transcription factor cAMP response element-binding protein, *Circulation*, 104 (2001) 2088-2094.
- [99] S. Miyamoto, A. N. Murphy, and J. H. Brown, Akt mediated mitochondrial protection in the heart: metabolic and survival pathways to the rescue, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 41 (2009) 169-180.
- [100] S. Yoon and R. Seger, The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions, *Growth Factors*, 24 (2006) 21-44.
- [101] J. Gillespie-Brown, S. J. Fuller, M. A. Bogoyevitch, S. Cowley, and P. H. Sugden, The mitogen-activated protein kinase kinase MEK1 stimulates a pattern of gene expression typical of the hypertrophic phenotype in rat ventricular cardiomyocytes, *J. Biol. Chem.*, 270 (1995) 28092-28096.
- [102] J. M. Kyriakis, H. App, X. F. Zhang, P. Banerjee, D. L. Brautigan, U. R. Rapp, and J. Avruch, Raf-1 activates MAP kinase-kinase, *Nature*, 358 (1992) 417-421.
- [103] T. G. Boulton, S. H. Nye, D. J. Robbins, N. Y. Ip, E. Radziejewska, S. D. Morgenbesser, R. A. DePinho, N. Panayotatos, M. H. Cobb, and G. D. Yancopoulos, ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF, *Cell*, 65 (1991) 663-675.

- [104] D. M. Payne, A. J. Rossomando, P. Martino, A. K. Erickson, J. H. Her, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, M. J. Weber, and T. W. Sturgill, Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase), *EMBO J.*, 10 (1991) 885-892.
- [105] B. Vanhaesebroeck and D. R. Alessi, The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB, *Biochem. J.*, 346 Pt 3 (2000) 561-576.
- [106] S. R. Datta, H. Dudek, X. Tao, S. Masters, H. Fu, Y. Gotoh, and M. E. Greenberg, Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery, *Cell*, 91 (1997) 231-241.
- [107] M. H. Cardone, N. Roy, H. R. Stennicke, G. S. Salvesen, T. F. Franke, E. Stanbridge, S. Frisch, and J. C. Reed, Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation, *Science*, 282 (1998) 1318-1321.
- [108] D. E. Richard, E. Berra, E. Gothie, D. Roux, and J. Pouyssegur, p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1, *J. Biol. Chem.*, 274 (1999) 32631-32637.
- [109] W. Wang, Y. Peng, Y. Wang, X. Zhao, and Z. Yuan, THE ANTI-APOPTOTIC EFFECT OF HEAT SHOCK PROTEIN 90 ON HYPOXIA-MEDIATED CARDIOMYOCYTE DAMAGE THROUGH THE PI3K/AKT PATHWAY, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, (2009).
- [110] R. S. Belaiba, S. Bonello, C. Zahringer, S. Schmidt, J. Hess, T. Kietzmann, and A. Gorlach, Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells, *Mol. Biol. Cell*, 18 (2007) 4691-4697.
- [111] C. Chen, L. C. Edelstein, and C. Gelinas, The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L), *Mol. Cell Biol.*, 20 (2000) 2687-2695.
- [112] M. Denis and J. A. Gustafsson, The Mr approximately 90,000 heat shock protein: an important modulator of ligand and DNA-binding properties of the glucocorticoid receptor, *Cancer Res.*, 49 (1989) 2275s-2281s.
- [113] M. E. Feder and G. E. Hofmann, Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology, *Annu. Rev. Physiol.*, 61 (1999) 243-282.
- [114] M. G. Santoro, Heat shock factors and the control of the stress response, *Biochem. Pharmacol.*, 59 (2000) 55-63.
- [115] J. X. Chen and B. Meyrick, Hypoxia increases Hsp90 binding to eNOS via PI3K-Akt in porcine coronary artery endothelium, *Lab Invest*, 84 (2004) 182-190.
- [116] H. Zhang and F. Burrows, Targeting multiple signal transduction pathways through inhibition of Hsp90, *J. Mol. Med. (Berl)*, 82 (2004) 488-499.
- [117] F. Dou, L. D. Yuan, and J. J. Zhu, Heat shock protein 90 indirectly regulates ERK activity by affecting Raf protein metabolism, *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, 37 (2005) 501-505.
- [118] D. M. Bers, Cardiac excitation-contraction coupling, *Nature*, 415 (2002) 198-205.
- [119] A. Fabiato and F. Fabiato, Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells, *J. Physiol.*, 249 (1975) 469-495.

- [120] I. M. Gommans, M. H. Vlak, H. A. de, and B. G. van Engelen, Calcium regulation and muscle disease, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 23 (2002) 59-63.
- [121] D. Gianni, J. Chan, J. K. Gwathmey, M. F. del, and R. J. Hajjar, SERCA2a in heart failure: role and therapeutic prospects, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 37 (2005) 375-380.
- [122] D. M. Bers, J. W. Bassani, and R. A. Bassani, Na-Ca exchange and Ca fluxes during contraction and relaxation in mammalian ventricular muscle, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 779 (1996) 430-442.
- [123] T. R. Shannon and D. M. Bers, Integrated Ca²⁺ management in cardiac myocytes, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1015 (2004) 28-38.
- [124] J. W. Bassani, R. A. Bassani, and D. M. Bers, Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms, *J. Physiol.*, 476 (1994) 279-293.
- [125] E. Carafoli, Intracellular calcium homeostasis, *Annu. Rev. Biochem.*, 56 (1987) 395-433.
- [126] D. M. Bers and J. H. Bridge, Relaxation of rabbit ventricular muscle by Na-Ca exchange and sarcoplasmic reticulum calcium pump. Ryanodine and voltage sensitivity, *Circ. Res.*, 65 (1989) 334-342.
- [127] W. F. Bluhm, E. G. Kranias, W. H. Dillmann, and M. Meyer, Phospholamban: a major determinant of the cardiac force-frequency relationship, *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol.*, 278 (2000) H249-H255.
- [128] H. W. Kim, N. A. Steenaart, D. G. Ferguson, and E. G. Kranias, Functional reconstitution of the cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase with phospholamban in phospholipid vesicles, *J. Biol. Chem.*, 265 (1990) 1702-1709.
- [129] T. Takahashi, H. Schunkert, S. Isoyama, J. Y. Wei, B. Nadal-Ginard, W. Grossman, and S. Izumo, Age-related differences in the expression of proto-oncogene and contractile protein genes in response to pressure overload in the rat myocardium, *J. Clin. Invest.*, 89 (1992) 939-946.
- [130] W. A. Clark, S. J. Rudnick, D. G. Simpson, J. J. LaPres, and R. S. Decker, Cultured adult cardiac myocytes maintain protein synthetic capacity of intact adult hearts, *Am. J. Physiol.*, 264 (1993) H573-H582.
- [131] X. H. Gu, R. C. Ou, D. J. Casley, M. J. Daly, and W. G. Nayler, Effect of age on endothelin-1 binding sites in rat cardiac ventricular membranes, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 19 (1992) 764-769.
- [132] C. Tschöpe, M. Koch, F. Spillmann, S. Heringer-Walther, H. C. Mochmann, H. Stauss, M. Bader, T. Unger, H. P. Schultheiss, and T. Walther, Upregulation of the cardiac bradykinin B2 receptors after myocardial infarction, *Immunopharmacology*, 44 (1999) 111-117.
- [133] J. Wang, H. Bo, X. Meng, Y. Wu, Y. Bao, and Y. Li, A simple and fast experimental model of myocardial infarction in the mouse, *Tex. Heart Inst. J.*, 33 (2006) 290-293.
- [134] T. Lindl, *Zell- und Gewebekultur*. 5. Auflage, Gustav Fischer Verlag Stuttgart New York, (2002).
- [135] R. Vetter, M. Kott, W. Schulze, and H. Rupp, Influence of different culture conditions on sarcoplasmic reticular calcium transport in isolated neonatal rat cardiomyocytes, *Mol. Cell Biochem.*, 188 (1998) 177-185.

- [136] H. M. Piper, I. Probst, P. Schwartz, F. J. Hutter, and P. G. Spieckermann, Culturing of calcium stable adult cardiac myocytes I, *J. Mol. Cell Cardiol.*, 14 (1982) 397-412.
- [137] R. F. BEERS, Jr. and I. W. SIZER, A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase, *J. Biol. Chem.*, 195 (1952) 133-140.
- [138] A. Z. Reznick and L. Packer, Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay, *Methods Enzymol.*, 233 (1994) 357-363.
- [139] R. J. Solaro and F. N. Briggs, Estimating the functional capabilities of sarcoplasmic reticulum in cardiac muscle. Calcium binding, *Circ. Res.*, 34 (1974) 531-540.
- [140] R. Vetter, R. Studer, H. Reinecke, F. Kolar, I. Ostadalova, and H. Drexler, Reciprocal changes in the postnatal expression of the sarcolemmal Na⁺-Ca²⁺-exchanger and SERCA2 in rat heart, *J. Mol. Cell Cardiol.*, 27 (1995) 1689-1701.
- [141] R. Vetter and H. Will, Sarcolemmal Na-Ca exchange and sarcoplasmic reticulum calcium uptake in developing chick heart, *J. Mol. Cell Cardiol.*, 18 (1986) 1267-1275.
- [142] L. Suckau, RNA Interferenz vermittelte Gentherapie bei Herzinsuffizienz mittels Phospholamban-shRNA exprimierender Adenoviraler- und AAV-Vektoren, Dissertation, Freie Universität Berlin, (2008).
- [143] A. H. Wyllie, Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation, *Nature*, 284 (1980) 555-556.
- [144] H. Wang and J. A. Joseph, Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader, *Free Radic. Biol. Med.*, 27 (1999) 612-616.
- [145] M. Schafer, K. Ponicke, I. Heinroth-Hoffmann, O. E. Brodde, H. M. Piper, and K. D. Schluter, Beta-adrenoceptor stimulation attenuates the hypertrophic effect of alpha-adrenoceptor stimulation in adult rat ventricular cardiomyocytes, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 37 (2001) 300-307.
- [146] P. Chomczynski and N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem.*, 162 (1987) 156-159.
- [147] J. Sambrook, E. F. Fritsch. and T. Maniatis, *Molecular Cloning*, (1989).
- [148] R. Higuchi, G. Dollinger, P. S. Walsh, and R. Griffith, Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences, *Biotechnology (N. Y.)*, 10 (1992) 413-417.
- [149] R. Higuchi, C. Fockler, G. Dollinger, and R. Watson, Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions, *Biotechnology (N. Y.)*, 11 (1993) 1026-1030.
- [150] M. W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res.*, 29 (2001) e45.
- [151] P. A. Hurtado, X. Wang, I. Sipo, U. Siemetzki, J. Eberle, W. Poller, and H. Fechner, Viral and nonviral factors causing nonspecific replication of tumor- and tissue-specific promoter-dependent oncolytic adenoviruses, *Mol. Ther.*, 11 (2005) 563-577.

- [152] E. H. Kim, E. H. Koh, J. Y. Park, and K. U. Lee, Adenine nucleotide translocator as a regulator of mitochondrial function: implication in the pathogenesis of metabolic syndrome, *Korean Diabetes J.*, 34 (2010) 146-153.
- [153] D. Roussel, F. Chainier, J. Rouanet, and H. Barre, Increase in the adenine nucleotide translocase content of duckling subsarcolemmal mitochondria during cold acclimation, *FEBS Lett.*, 477 (2000) 141-144.
- [154] V. P. Skulachev, Anion carriers in fatty acid-mediated physiological uncoupling, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 31 (1999) 431-445.
- [155] G. Loers, T. Makhina, U. Bork, A. Dorner, M. Schachner, and R. Kleene, The interaction between cell adhesion molecule L1, matrix metalloproteinase 14, and adenine nucleotide translocator at the plasma membrane regulates L1-mediated neurite outgrowth of murine cerebellar neurons, *J. Neurosci.*, 32 (2012) 3917-3930.
- [156] P. Barath, K. Luciakova, Z. Hodny, R. Li, and B. D. Nelson, The growth-dependent expression of the adenine nucleotide translocase-2 (ANT2) gene is regulated at the level of transcription and is a marker of cell proliferation, *Exp. Cell Res.*, 248 (1999) 583-588.
- [157] K. U. Lee, I. K. Lee, J. Han, D. K. Song, Y. M. Kim, H. S. Song, H. S. Kim, W. J. Lee, E. H. Koh, K. H. Song, S. M. Han, M. S. Kim, I. S. Park, and J. Y. Park, Effects of recombinant adenovirus-mediated uncoupling protein 2 overexpression on endothelial function and apoptosis, *Circ. Res.*, 96 (2005) 1200-1207.
- [158] M. Akashi, M. Hachiya, R. L. Paquette, Y. Osawa, S. Shimizu, and G. Suzuki, Irradiation increases manganese superoxide dismutase mRNA levels in human fibroblasts. Possible mechanisms for its accumulation, *J. Biol. Chem.*, 270 (1995) 15864-15869.
- [159] E. D. Harris, Regulation of antioxidant enzymes, *FASEB J.*, 6 (1992) 2675-2683.
- [160] R. Radi, J. F. Turrens, L. Y. Chang, K. M. Bush, J. D. Crapo, and B. A. Freeman, Detection of catalase in rat heart mitochondria, *J. Biol. Chem.*, 266 (1991) 22028-22034.
- [161] A. Haunstetter and S. Izumo, Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease, *Circ. Res.*, 82 (1998) 1111-1129.
- [162] A. Halestrap, Biochemistry: a pore way to die, *Nature*, 434 (2005) 578-579.
- [163] J. Heger, Y. Abdallah, T. Shahzad, I. Klumpe, H. M. Piper, H. P. Schultheiss, K. D. Schluter, R. Schulz, G. Euler, and A. Dorner, Transgenic overexpression of the adenine nucleotide translocase 1 protects cardiomyocytes against TGFbeta(1)-induced apoptosis by stabilization of the mitochondrial permeability transition pore, *J. Mol. Cell Cardiol.*, (2012).
- [164] A. S. Belzacq, H. L. Vieira, F. Verrier, G. Vandecasteele, I. Cohen, M. C. Prevost, E. Larquet, F. Pariselli, P. X. Petit, A. Kahn, R. Rizzuto, C. Brenner, and G. Kroemer, Bcl-2 and Bax modulate adenine nucleotide translocase activity, *Cancer Res.*, 63 (2003) 541-546.

- [165] T. Bouwmeester, A. Bauch, H. Ruffner, P. O. Angrand, G. Bergamini, K. Croughton, C. Cruciat, D. Eberhard, J. Gagneur, S. Ghidelli, C. Hopf, B. Huhse, R. Mangano, A. M. Michon, M. Schirle, J. Schlegl, M. Schwab, M. A. Stein, A. Bauer, G. Casari, G. Drewes, A. C. Gavin, D. B. Jackson, G. Joberty, G. Neubauer, J. Rick, B. Kuster, and G. Superti-Furga, A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway, *Nat. Cell Biol.*, 6 (2004) 97-105.
- [166] M. Zamora, M. Granell, T. Mampel, and O. Vinas, Adenine nucleotide translocase 3 (ANT3) overexpression induces apoptosis in cultured cells, *FEBS Lett.*, 563 (2004) 155-160.
- [167] M. R. Wieckowski, G. Szabadkai, M. Wasilewski, P. Pinton, J. Duszynski, and R. Rizzuto, Overexpression of adenine nucleotide translocase reduces Ca²⁺ signal transmission between the ER and mitochondria, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 348 (2006) 393-399.
- [168] J. Lee, S. E. Schriener, and D. C. Wallace, Adenine nucleotide translocator 1 deficiency increases resistance of mouse brain and neurons to excitotoxic insults, *Biochim. Biophys. Acta*, 1787 (2009) 364-370.
- [169] C. P. Baines and J. D. Molkenin, Adenine nucleotide translocase-1 induces cardiomyocyte death through upregulation of the pro-apoptotic protein Bax, *J. Mol. Cell Cardiol.*, 46 (2009) 969-977.
- [170] I. Vogelpohl, R. Vetter, J. Heger, L. Ebermann, G. Euler, H. P. Schultheiss, and A. Dorner, Transgenic overexpression of heart-specific adenine nucleotide translocase 1 positively affects contractile function in cardiomyocytes, *Cell Physiol Biochem.*, 27 (2011) 121-128.
- [171] S. Zimmermann and K. Moelling, Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B), *Science*, 286 (1999) 1741-1744.
- [172] G. Milano, L. K. von Segesser, S. Morel, A. Joncic, P. Bianciardi, G. Vassalli, and M. Samaja, Phosphorylation of phosphatidylinositol-3-kinase-protein kinase B and extracellular signal-regulated kinases 1/2 mediate reoxygenation-induced cardioprotection during hypoxia, *Exp. Biol. Med.* (Maywood.), 235 (2010) 401-410.
- [173] A. Bonni, A. Brunet, A. E. West, S. R. Datta, M. A. Takasu, and M. E. Greenberg, Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms, *Science*, 286 (1999) 1358-1362.
- [174] M. P. Scheid, K. M. Schubert, and V. Duronio, Regulation of bad phosphorylation and association with Bcl-x(L) by the MAPK/Erk kinase, *J. Biol. Chem.*, 274 (1999) 31108-31113.
- [175] B. K. Brar, J. Railson, A. Stephanou, R. A. Knight, and D. S. Latchman, Urocortin increases the expression of heat shock protein 90 in rat cardiac myocytes in a MEK1/2-dependent manner, *J. Endocrinol.*, 172 (2002) 283-293.
- [176] J. Kim, A. Nueda, Y. H. Meng, W. S. Dynan, and N. F. Mivechi, Analysis of the phosphorylation of human heat shock transcription factor-1 by MAP kinase family members, *J. Cell Biochem.*, 67 (1997) 43-54.
- [177] S. Fulda, L. Galluzzi, and G. Kroemer, Targeting mitochondria for cancer therapy, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 9 (2010) 447-464.

- [178] B. H. Kang, J. Plescia, T. Dohi, J. Rosa, S. J. Doxsey, and D. C. Altieri, Regulation of tumor cell mitochondrial homeostasis by an organelle-specific Hsp90 chaperone network, *Cell*, 131 (2007) 257-270.
- [179] G. L. Wright, I. G. Maroulakou, J. Eldridge, T. L. Liby, V. Sridharan, P. N. Tsiichlis, and R. C. Muise-Helmericks, VEGF stimulation of mitochondrial biogenesis: requirement of AKT3 kinase, *FASEB J.*, 22 (2008) 3264-3275.
- [180] J. Nishizawa, A. Nakai, K. Matsuda, M. Komeda, T. Ban, and K. Nagata, Reactive oxygen species play an important role in the activation of heat shock factor 1 in ischemic-reperfused heart, *Circulation*, 99 (1999) 934-941.
- [181] G. L. Semenza, Targeting HIF-1 for cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer*, 3 (2003) 721-732.
- [182] M. A. Dery, M. D. Michaud, and D. E. Richard, Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 37 (2005) 535-540.
- [183] H. Zhong, K. Chiles, D. Feldser, E. Laughner, C. Hanrahan, M. M. Georgescu, J. W. Simons, and G. L. Semenza, Modulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics, *Cancer Res.*, 60 (2000) 1541-1545.
- [184] W. Zundel, C. Schindler, D. Haas-Kogan, A. Koong, F. Kaper, E. Chen, A. R. Gottschalk, H. E. Ryan, R. S. Johnson, A. B. Jefferson, D. Stokoe, and A. J. Giaccia, Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression, *Genes Dev.*, 14 (2000) 391-396.
- [185] R. Fukuda, K. Hirota, F. Fan, Y. D. Jung, L. M. Ellis, and G. L. Semenza, Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells, *J. Biol. Chem.*, 277 (2002) 38205-38211.
- [186] H. Kobayashi, T. Miura, H. Ishida, T. Miki, M. Tanno, T. Yano, T. Sato, H. Hotta, and K. Shimamoto, Limitation of infarct size by erythropoietin is associated with translocation of Akt to the mitochondria after reperfusion, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 35 (2008) 812-819.
- [187] R. D. Edmondson, T. M. Vondriska, K. J. Biederman, J. Zhang, R. C. Jones, Y. Zheng, D. L. Allen, J. X. Xiu, E. M. Cardwell, M. R. Pisano, and P. Ping, Protein kinase C epsilon signaling complexes include metabolism- and transcription/translation-related proteins: complimentary separation techniques with LC/MS/MS, *Mol. Cell Proteomics.*, 1 (2002) 421-433.
- [188] R. Aikawa, I. Komuro, T. Yamazaki, Y. Zou, S. Kudoh, M. Tanaka, I. Shiojima, Y. Hiroi, and Y. Yazaki, Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats, *J. Clin. Invest.*, 100 (1997) 1813-1821.
- [189] P. Ping, J. Zhang, W. M. Pierce, Jr., and R. Bolli, Functional proteomic analysis of protein kinase C epsilon signaling complexes in the normal heart and during cardioprotection, *Circ. Res.*, 88 (2001) 59-62.

- [190] T. M. Vondriska, J. Zhang, C. Song, X. L. Tang, X. Cao, C. P. Baines, J. M. Pass, S. Wang, R. Bolli, and P. Ping, Protein kinase C epsilon-Src modules direct signal transduction in nitric oxide-induced cardioprotection: complex formation as a means for cardioprotective signaling, *Circ. Res.*, 88 (2001) 1306-1313.
- [191] J. Y. Jang, Y. K. Jeon, and C. W. Kim, Degradation of HER2/neu by ANT2 shRNA suppresses migration and invasiveness of breast cancer cells, *BMC. Cancer*, 10 (2010) 391.
- [192] P. Sergeev, S. R. da, E. Lucchinetti, K. Zaugg, T. Pasch, M. C. Schaub, and M. Zaugg, Trigger-dependent gene expression profiles in cardiac preconditioning: evidence for distinct genetic programs in ischemic and anesthetic preconditioning, *Anesthesiology*, 100 (2004) 474-488.
- [193] C. J. McLeod, A. P. Jeyabalan, J. O. Minners, R. Clevenger, R. F. Hoyt, Jr., and M. N. Sack, Delayed ischemic preconditioning activates nuclear-encoded electron-transfer-chain gene expression in parallel with enhanced postanoxic mitochondrial respiratory recovery 1, *Circulation*, 110 (2004) 534-539.
- [194] X. H. Ning, C. S. Xu, Y. C. Song, Y. Xiao, Y. J. Hu, F. M. Lupinetti, and M. A. Portman, Hypothermia preserves function and signaling for mitochondrial biogenesis during subsequent ischemia, *Am. J. Physiol*, 274 (1998) H786-H793.
- [195] P. Ping, J. Zhang, X. Cao, R. C. Li, D. Kong, X. L. Tang, Y. Qiu, S. Manchikalapudi, J. A. Auchampach, R. G. Black, and R. Bolli, PKC-dependent activation of p44/p42 MAPKs during myocardial ischemia-reperfusion in conscious rabbits, *Am. J. Physiol*, 276 (1999) H1468-H1481.
- [196] D. J. Hausenloy, S. B. Ong, and D. M. Yellon, The mitochondrial permeability transition pore as a target for preconditioning and postconditioning, *Basic Res. Cardiol.*, 104 (2009) 189-202.
- [197] J. R. McMullen and G. L. Jennings, Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*, 34 (2007) 255-262.
- [198] E. Morkin, Regulation of myosin heavy chain genes in the heart, *Circulation*, 87 (1993) 1451-1460.
- [199] P. VanBuren, D. E. Harris, N. R. Alpert, and D. M. Warshaw, Cardiac V1 and V3 myosins differ in their hydrolytic and mechanical activities in vitro, *Circ. Res.*, 77 (1995) 439-444.
- [200] D. M. Bers, J. W. Bassani, and R. A. Bassani, Competition and redistribution among calcium transport systems in rabbit cardiac myocytes, *Cardiovasc. Res.*, 27 (1993) 1772-1777.
- [201] A. Hammes, S. Oberdorf-Maass, T. Rother, K. Nething, F. Gollnick, K. W. Linz, R. Meyer, K. Hu, H. Han, P. Gaudron, G. Ertl, S. Hoffmann, U. Ganten, R. Vetter, K. Schuh, C. Benkowitz, H. G. Zimmer, and L. Neyses, Overexpression of the sarcolemmal calcium pump in the myocardium of transgenic rats, *Circ. Res.*, 83 (1998) 877-888.
- [202] H. K. Mork, I. Sjaastad, J. B. Sande, M. Periasamy, O. M. Sejersted, and W. E. Louch, Increased cardiomyocyte function and Ca²⁺ transients in mice during early congestive heart failure 1, *J. Mol. Cell Cardiol.*, 43 (2007) 177-186.
- [203] M. Periasamy and S. Huke, SERCA pump level is a critical determinant of Ca(2+)homeostasis and cardiac contractility 5, *J. Mol. Cell Cardiol.*, 33 (2001) 1053-1063.

- [204] D. L. Baker, K. Hashimoto, I. L. Grupp, Y. Ji, T. Reed, E. Loukianov, G. Grupp, A. Bhagwat, B. Hoit, R. Walsh, E. Marban, and M. Periasamy, Targeted overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase increases cardiac contractility in transgenic mouse hearts, *Circ. Res.*, 83 (1998) 1205-1214.
- [205] M. del, S. E. Harding, U. Schmidt, T. Matsui, Z. B. Kang, G. W. Dec, J. K. Gwathmey, A. Rosenzweig, and R. J. Hajjar, Restoration of contractile function in isolated cardiomyocytes from failing human hearts by gene transfer of SERCA2a, *Circulation*, 100 (1999) 2308-2311.
- [206] H. He, F. J. Giordano, R. Hilal-Dandan, D. J. Choi, H. A. Rockman, P. M. McDonough, W. F. Bluhm, M. Meyer, M. R. Sayen, E. Swanson, and W. H. Dillmann, Overexpression of the rat sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase gene in the heart of transgenic mice accelerates calcium transients and cardiac relaxation, *J. Clin. Invest.*, 100 (1997) 380-389.
- [207] K. Ito, X. Yan, X. Feng, W. J. Manning, W. H. Dillmann, and B. H. Lorell, Transgenic expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+) atpase modifies the transition from hypertrophy to early heart failure, *Circ. Res.*, 89 (2001) 422-429.
- [208] R. Vetter, U. Rehfeld, C. Reissfelder, W. Weiss, K. D. Wagner, J. Gunther, A. Hammes, C. Tschope, W. Dillmann, and M. Paul, Transgenic overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ATPase improves reticular Ca²⁺ handling in normal and diabetic rat hearts 1, *FASEB J.*, 16 (2002) 1657-1659.
- [209] A. Minajeva, A. Kaasik, K. Paju, E. Seppet, A. M. Lompre, V. Veksler, and R. Ventura-Clapier, Sarcoplasmic reticulum function in determining atrioventricular contractile differences in rat heart 3, *Am. J. Physiol.*, 273 (1997) H2498-H2507.
- [210] W. Luo, I. L. Grupp, J. Harrer, S. Ponniah, G. Grupp, J. J. Duffy, T. Doetschman, and E. G. Kranias, Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation 4, *Circ. Res.*, 75 (1994) 401-409.
- [211] D. H. MacLennan and E. G. Kranias, Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility 4, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 4 (2003) 566-577.
- [212] H. Reuter and G. W. Beeler, Jr., Calcium current and activation of contraction in ventricular myocardial fibers, *Science*, 163 (1969) 399-401.
- [213] J. W. Bassani, W. Yuan, and D. M. Bers, Fractional SR Ca release is regulated by trigger Ca and SR Ca content in cardiac myocytes 3, *Am. J. Physiol.*, 268 (1995) C1313-C1319.
- [214] M. Arai, H. Matsui, and M. Periasamy, Sarcoplasmic reticulum gene expression in cardiac hypertrophy and heart failure 1, *Circ. Res.*, 74 (1994) 555-564.
- [215] M. Flesch, F. Schiffer, O. Zolk, Y. Pinto, S. Rosenkranz, C. Hirth-Dietrich, G. Arnold, M. Paul, and M. Bohm, Contractile systolic and diastolic dysfunction in renin-induced hypertensive cardiomyopathy, *Hypertension*, 30 (1997) 383-391.
- [216] W. C. Claycomb, N. A. Lanson, Jr., B. S. Stallworth, D. B. Egeland, J. B. Delcarpio, A. Bahinski, and N. J. Izzo, Jr., HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95 (1998) 2979-2984.

-
- [217] S. M. White, P. E. Constantin, and W. C. Claycomb, Cardiac physiology at the cellular level: use of cultured HL-1 cardiomyocytes for studies of cardiac muscle cell structure and function, *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol*, 286 (2004) H823-H829.
- [218] M. Bujak and N. G. Frangogiannis, The role of IL-1 in the pathogenesis of heart disease, *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*, 57 (2009) 165-176.
- [220] J. Tan, Z. Ma, L. Han, R. Du, L. Zhao, X. Wei, D. Hou, B. H. Johnstone, M. R. Farlow, and Y. Du, Caffeic acid phenethyl ester possesses potent cardioprotective effects in a rabbit model of acute myocardial ischemia-reperfusion injury, *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol*, 289 (2005) H2265-H2271.
- [221] C. R. Buck, M. J. Jurynek, D. K. Gupta, A. K. Law, J. Bilger, D. C. Wallace, and R. J. McKeon, Increased adenine nucleotide translocator 1 in reactive astrocytes facilitates glutamate transport, *Exp. Neurol.*, 181 (2003) 149-158.

8. Publikationsverzeichnis

8.1 Veröffentlichungen

(**Klumpe I.** geb. **Vogelpohl I.**)

Heger J, Abdallah Y, Shahzad T, **Klumpe I**, Piper HM, Schultheiss HP, Schlüter KD, Schulz R, Euler G, Dörner A. Transgenic overexpression of the adenine nucleotide translocase 1 protects cardiomyocytes against TGF β 1-induced apoptosis by stabilization of the mitochondrial permeability transition pore. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;53(1):73-81.

Ebermann L, Wika S, **Klumpe I**, Hammer E, Klingel K, Lassner D, Völker U, Erben U, Zeichhardt H, Schultheiss HP, Dörner A. The mitochondrial respiratory chain has a critical role in the antiviral process in Coxsackievirus B3-induced myocarditis. *Lab Invest.* 2012;92(1):125-34.

***Vogelpohl I**, Vetter R, Heger J, Ebermann L, Euler G, Schultheiss HP, Dörner A. Transgenic overexpression of heart-specific adenine nucleotide translocase 1 positively affects contractile function in cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem.* 2011;27(2):121-8.

***Klumpe I**, Savvatis K, Westermann D, Winter J, Tschöpe C, Schultheiss HP, Dörner A. Transgenic overexpression of adenine nucleotide translocase 1 increases activation of cell protective pathways in hypoxic cardiomyocytes and results in cardioprotection of ischemic hearts (Manuskript in Vorbereitung).

* Diese Publikationen enthalten Daten aus der vorliegenden Arbeit.

8.2 Kongressbeiträge

Klumpe I, Savvatis K, Westermann D, Winter J, Tschöpe C, Schultheiss HP, Dörner A. Transgenic overexpression of the adenine nucleotide translocase 1 (ANT1) protects the heart during ischemia. (Poster) 7th Ascona International Workshop on Cardiomyocyte Biology (2012).

Vogelpohl I, Savvatis K, Westermann D, Winter J, Tschoepe C, Schultheiss HP, Doerner A. Transgenic overexpression of heart-specific adenine nucleotide translocase 1 protects the heart during ischemia. (Poster) European Society of Cardiology (ESC) Congress (2011).

Vogelpohl I, Vetter R, Heger J, Euler G, Schultheiss HP, Dörner A. Transgenic overexpression of heart-specific ANT1 positively affects contractile function in cardiomyocytes. (Vortrag) Workshop Cardiac Physiology & Experimental Cardiology (2010).

Vogelpohl I, Vetter R, Heger J, Euler G, Schultheiss HP, Dörner A. Adaptation of myocardial intracellular Ca^{2+} -homeostasis and contractile apparatus to heart-specific ANT1 overexpression. (Vortrag) Joint Meeting of the Scandinavian and German Physiological Societies (2010).

Vogelpohl I, Vetter R, Ebermann L, Heger J, Schultheiss HP, Dörner A. Komponenten der myokardialen Ca^{2+} -Homöostase und des kontraktilen Apparates adaptieren sich an einen beschleunigten mitochondrialen ADP/ATP-Transport. (Poster) 76. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (2010).

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Heinz-Peter Schultheiss danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und seine Unterstützung.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens danke ich Frau Prof. Dr. Petra Knaus im Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie der Freien Universität Berlin.

Mein besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Andrea Dörner für die gute Betreuung meiner Arbeit im Labor, die fortwährende Hilfsbereitschaft und freundliche Zusammenarbeit.

Ich danke Julia Winter, Sabine Knüppel und Linda Ebermann für die Unterstützung bei den Laborarbeiten und ihr stets offenes Ohr und ihre Diskussionsbereitschaft, sowie das herzliche Arbeitsklima. Auch lieben Dank an die Kollegen der AG Skurk (Alexander Jenke, Jenny Stehr) und AG Schmidt-Lucke (Thomas Zobel), für die hilfreichen Ratschläge und die gute Zusammenarbeit bei den Hypoxie-Experimenten.

Zudem bedanke ich mich bei Herrn Dr. Roland Vetter, Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, und seinen Mitarbeitern für die Einweisung und Durchführung der Ca^{2+} -Transportmessungen und die kompetente Betreuung bei der Publikation.

Insbesondere möchte ich mich auch bei Dr. Jaqueline Heger, Physiologisches Institut der Justus-Liebig-Universität Giessen, bedanken, die die kontraktilen Messungen durchgeführt hat. Weiterhin danke ich der AG von Prof. Dr. Carsten Tschöpe für die operative Durchführung der Ischämie-Experimente sowie Dr. Dirk Lassner und seinem Team für die Bereitstellung seiner technischen Geräte.

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich permant unterstützt und in dieser Zeit begleitet haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Matthias, der stets für mich da war und mich jeden Tag aufs Neue motiviert hat.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und ohne unerlaubte Hilfe erstellt habe.

Berlin, den

.....

(Inga Klumpe)