

**Adenin-Nukleotid-Translokator 1 als Komponente des
intrazellulären Signalings:
Protective Wirkung durch Modulation der
interzellulären Kommunikation**

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

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Diplom Biochemikerin Julia Winter

geboren in Pritzwalk

Berlin, im November 2015

Diese Arbeit wurde angefertigt vom 01.03.2011 bis zum 27.11.2015 am Institut für Kardiologie und Pulmologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, unter der 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. Markus Wahl

Disputation am: 02. Juni 2016

FÜR MEINE FAMILIE

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	1
1. Einleitung.....	5
1.1 Adenin-Nukleotid-Transloator.....	5
1.1.1 Struktur und Funktion des Adenin-Nukleotid-Translokators	5
1.1.2 ANT in kardiologischen Erkrankungen	7
1.1.3 ANT1 begünstigt das Zellüberleben	8
1.2 Kardioprotektives Signaling.....	9
1.2.1 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen.....	9
1.2.1.1 Extrazellulär Signal regulierte Kinasen 1 und 2	9
1.2.1.2 Erk1/2 in kardialen Zellen.....	10
1.2.2 Proteinkinase B.....	10
1.2.2.1 AKT in kardialen Zellen	11
1.2.3 Chaperone	11
1.2.3.1 Hitzeschockprotein 90.....	12
1.2.3.2 Hitzeschockprotein 27	13
1.3 Toll-Like-Rezeptoren.....	14
1.4 Zielsetzung.....	17
2. Material und Methoden	19
2.1 Material	19
2.1.1 Chemikalien	19
2.1.2 Puffer und Lösungen	20
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	21
2.1.4 Geräte.....	22
2.1.5 Zellkulturmedien	23
2.1.6 Stimulationsreagenzien	23
2.1.7 Primer	24
2.1.8 Antikörper.....	24
2.1.9 Kommerzielle Testsysteme.....	25
2.1.10 Enzyme	25
2.2 Methoden.....	25
2.2.1 Sterilisation.....	25
2.2.2 Tierexperimentelles Arbeiten.....	25

2.2.2.1	ANT1-transgene Ratten.....	25
2.2.2.2	Herzentnahme aus adulten Ratten	26
2.2.2.3	Präparation neonataler Rattenkardiomyozyten	26
2.2.3	Zellkulturversuche und zellbiologische Methoden	27
2.2.3.1	Zellzahlbestimmung	27
2.2.3.2	Hypoxie-Induktion in NRCM.....	27
2.2.3.3	Generieren von KÜAH zur Stimulation von NRCM.....	28
2.2.3.4	Analyse der interzellulären Kommunikation von NRCM mittels Stimulationsversuchen	28
2.2.3.5	Caspase-3/7-Aktivitätstest	29
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	29
2.2.4.1	Herstellung von Gesamtzellextrakten aus Herzgewebe.....	29
2.2.4.2	Herstellung von Zellextrakten aus NRCM.....	29
2.2.4.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	30
2.2.4.4	Acetonfällung	30
2.2.4.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	30
2.2.4.6	Immuno-Blot.....	31
2.2.4.7	Immunfärbung.....	32
2.2.4.8	Immunpräzipitation.....	32
2.2.4.9	Massenspektroskopische Analysen.....	33
2.2.4.10	Proteinquantifizierung durch Sprectral Counting	34
2.2.5	Analysen mit Hilfe von Online-Datenbanken	35
2.2.5.1	Proteinanalysen der Massenspektren.....	35
2.2.5.2	Bestimmung der zellulären Lokalisation von Proteinen.....	35
2.2.5.3	Zuordnung von Proteinen zu Signalwegen.....	35
2.2.5.4	Proteinclustering	36
2.2.5.5	Sequenzanalysen	36
2.2.6	Molekularbiologische Analysen.....	36
2.2.6.1	Isolation genomischer DNA aus Schwanzspitzenbiopsien	36
2.2.6.2	Polymerasekettenreaktion	36
2.2.6.3	Agarose-Gelelektrophorese	37
2.2.7	Statistische Evaluierungen.....	38
3.	Ergebnisse.....	39
3.1	Interaktom des kardialen Adenin-Nukleotid-Translokators.....	39
3.1.1	Analyse des basalen ANT1-Interaktoms mittels IP/MS.....	39

3.1.2	Verifizierung des basalen ANT1-Interaktoms mittels IP/WB.....	42
3.1.3	Veränderung des ANT1-Interaktoms bei transgener ANT1-OE und Induktion von Hypoxie.....	43
3.2	Proteinexpression der ANT1-interagierenden HSP90, HSP75, CRYAB und HSP27.....	44
3.2.1	Expression der ANT1-interagierenden HSPs in NRCM	44
3.2.2	Hitzeschockproteingehalt von Kulturüberständen neonataler Rattenkardiomyozyten	45
3.2.3	Proteinexpression ANT1-interagierender HSPs bei Kultivierung von NRCM in Mangelmedium	47
3.2.4	Phosphorylierungszustand von HSP27 in ANT1tg-NRCM.....	48
3.3	Caspase 3-/7-Aktivität	50
3.4	Einfluss sekretierter Proteine auf kardioprotektive Signalwege.....	50
3.4.1	Einfluss von Komponenten eines hypoxisch generierten Überstandes auf die Expression von HSP90, HSP75 und CRYAB in NRCM	51
3.4.2	Einfluss von Komponenten eines hypoxisch generierten Überstandes auf die Expression und den Aktivierungszustand von HSP27 in NRCM	53
3.4.3	Aktivierung von AKT durch ins Kulturmedium freigesetzte Proteine.....	55
3.4.4	Aktivierung von Erk1/Erk2 durch ins Kulturmedium freigesetzte Proteine	56
3.4.5	Caspaseaktivität bei Stimulation mit Komponenten des Kulturüberstandes	59
3.5	Einfluss kardialer Toll-Like-Rezeptoren auf die Regulation von Signalwegen in ANT1tg-NRCM.....	60
3.5.1	Toll-Like-Rezeptor 2/4-Expression nach 24 Stunden hypoxischer Inkubation.....	60
3.5.2	Caspaseaktivierung bei Blockade von TLR2/4	61
3.5.3	Beeinflussung der Expression kardialer TLR 2/4 durch ins Kulturmedium freigesetzte Proteine	61
3.5.4	Einfluss der kardialen TLR2/4 auf die Aktivierung und Expression der protektiven Signalwege und Komponenten.....	62
4.	Diskussion.....	64
4.1.	ANT als Komponente intrazellulärer Signalwege	64
4.1.1	ANT1 als Komponente des Energiestoffwechsels	66
4.1.2	ANT1 als Komponente des Calcium-Signalings und der Muskelkontraktion	68
4.1.3	ANT1 als Komponente des Zytoskelettes.....	69
4.1.4	ANT1 als Komponente des Proteinmetabolismus.....	69
4.1.5	ANT1 als Apoptose regulierende Komponente.....	70
4.2	Die ANT1-OE beeinflusst die Bindung von Hitzeschockproteinen an das ANT1-Interaktom.....	72

4.3	Die ANT1-OE beeinflusst die Expression und Sekretion von Hitzeschockproteinen in NRCM.....	74
4.4	Einfluss der ANT1-OE auf die interzelluläre Kommunikation.....	77
4.4.1	In NRCM erfolgt eine interzelluläre Kommunikation durch Komponenten des KÜAH.....	77
4.4.2	HSP27 als funktionelle Komponente des KÜAH	78
4.4.3	Die ANT1-OE führt zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber extrazelluläre Stimuli ...	83
4.5	Beteiligung der kardialen TLR2 und TLR4 an der in ANT1tg-NRCM veränderten Signalinduktion	84
4.5.1	Die Unterschiede in der TLR-Expression sind nicht allein auf die ANT1-OE zurückzuführen.....	84
4.5.2	Die veränderte TLR2/4-Expression in ANT1tg-NRCM geht mit einer anti-apoptotischen Wirkung einher	85
4.5.3	Die Aktivierung protektiver Signalwege, sowie die Expression anti-apoptotischer HSPs wird durch TLR vermittelt.....	87
5.	Zusammenfassung.....	89
6.	Summary.....	91
7.	Abkürzungsverzeichnis	93
8.	Literaturverzeichnis	100
9.	Publikationsverzeichnis	120
9.1.	Veröffentlichungen.....	120
9.2.	Kongressbeiträge.....	120
10.	Danksagung	121
11.	Lebenslauf	122
12.	Eidesstattliche Erklärung	123
13.	Anhang.....	124

1. EINLEITUNG

1.1 Adenin-Nukleotid-Transloator

1.1.1 Struktur und Funktion des Adenin-Nukleotid-Translokators

Der Adenin-Nukleotid-Translokator (ANT) ist ein in der inneren Mitochondrienmembran (IMM) lokalisierter Transporter. Er tauscht mitochondriales ATP gegen zytosolisches ADP durch einen Antiport-Mechanismus aus [1] und ist daher eine wesentliche Komponente des Energiestoffwechsels. In stark energieverbrauchenden Geweben wie dem Herzmuskel ist der ANT mit 14 % des gesamten mitochondrialen Proteins das meist exprimierte Protein dieses Zellkompartiments [2]. In Säugetieren sind vier Isoformen des ANT (ANT1-4) bekannt [3;4]. ANT1 stellt mit 70 % des Gesamt-ANT-Gehaltes die am stärksten vertretene Isoform dar. Sie wird vor allem in Skelett- und Herzmuskeln sowie im Gehirn exprimiert [5;6]. ANT2 ist die dominante Isoform aller übrigen Gewebe [5]. ANT3 wird ubiquitär, allerdings nur in geringen Mengen [7] und ANT4 in undifferenzierten embryonalen Stammzellen, in den Testes und in der Leber exprimiert [3].

Der ANT liegt als Homodimer in der IMM vor. Jedes Monomer ist 30 kDa groß und besteht aus sechs Transmembranhelices [8]. Diese sind in drei Domänen angeordnet, in denen jeweils zwei Helices ein membranständiges Strukturelement bilden. Die jeweiligen Domänen sind über hydrophile, matrixexponierte und externe Loops verbunden [9;10]. Die Loops seitens der Matrix enthalten kurze Helices. Sowohl der Carboxyterminus als auch der Aminoterminus des Proteins ragen in den Intermembranraum. Die Nukleotidbindungsstellen befinden sich jeweils in der zweiten Domäne der jeweiligen monomeren Untereinheit [1]. Bei Substratbindung auf der zytosolischen (*c-State*) und der matrixzugewandten Seite (*m-State*) kommt es zu einer Konformationsänderung, bei der die Nukleotide durch den Proteinkanal transportiert werden [11] (Abbildung 1.1, modifiziert nach [12;13]). Der Transport ist abhängig vom Membranpotential und erfolgt in Richtung des ATP-Exports [14]. Grundsätzlich ist der Transport jedoch in beide Richtungen möglich [15;16].

Der ANT ist eng an die Funktion der Oxidativen Phosphorylierung gekoppelt [17]. In Herzen von neugeborenen Schafen korreliert der Gehalt an ANT1-Protein mit dem Sauerstoffverbrauch für die Oxidative Phosphorylierung [18]. Dies ist im Wesentlichen auf die Bereitstellung von ADP für die Synthese von ATP zurückzuführen [18;19].

Darüber hinaus spielt der ANT eine Rolle in der Apoptose. Die intrinsische Apoptose geht mit der Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-pore (MPTP) einher [20]. Auch wenn die endgültige Struktur dieser Pore noch nicht vollständig geklärt ist, gilt es als sicher, dass der ANT zusammen mit

anderen Komponenten, wie dem ladungsabhängigen Anionenkanal (VDAC) und dem Transporter für anorganisches Phosphat (PiC), die Porenöffnung reguliert [21]. Nach neusten Erkenntnissen stellen diese Komponenten, entgegen anfänglicher Vermutungen, keine porenformenden sondern regulatorische Komponenten der MPTP dar. Nach neusten Erkenntnissen geht man davon aus, dass die ATP-Synthase eine porenformende Komponente ist, welche mit ANT und PiC eine Superstruktur bildet, in der eine Untereinheit der ATPase, der sogenannte C-Ring, während der Porenöffnung eine entscheidende Konformationsänderung durchläuft. Dabei kommt es vermutlich zur Ausbildung eines unspezifischen Kanals [21]. Der ANT interagiert wiederum mit anderen porenregulierenden Komponenten wie Bax oder Bcl2 und beeinflusst so die Regulation der Porenöffnung [22-25].

Neben seiner Lokalisation in der IMM ist der ANT auch in der Plasmamembran nachweisbar. Loers *et al.* zeigten, dass sich etwa 0,6 % des ANT1- und 2,5 % des ANT2-Gesamtproteins in der Plasmamembran von Nervenzellen des Gehirns befinden [26]. Die Funktionen des ANTs in der Plasmamembran sind noch weitestgehend ungeklärt. Für Neuronen ist beschrieben, dass er an der Regulation des Neuritenwachstums beteiligt ist [26]. In Krebszellen wird die Funktion des ANTs in der Plasmamembran mit einer Beteiligung am Energiestoffwechsel und der Chemotaxis beschrieben [27]. Auch in *Leishmania* wurde die Funktion des ANTs in der Plasmamembran mit einer Beteiligung an der Chemotaxis und darüber hinaus als ATP-Sensor, also einer Beteiligung am Energiestoffwechsel, erklärt [28].

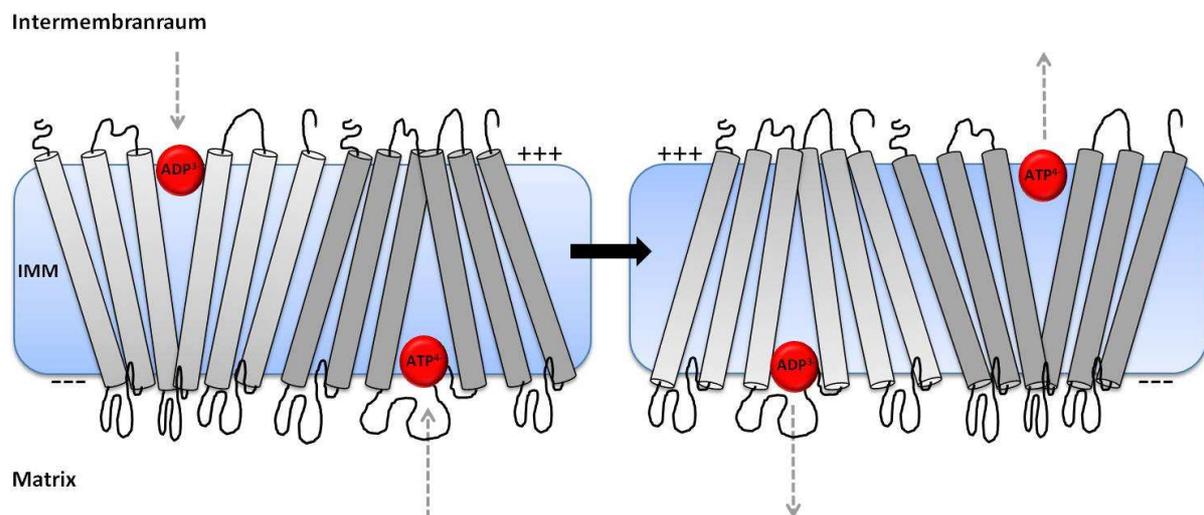


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Struktur und des Transportmechanismus von ANT. Der ANT liegt in der IMM als Homodimer vor. Jedes Monomer, hier unterschiedlich hell dargestellt, hat sechs Transmembranhelices die tunnelartig in der IMM angeordnet sind. Diese sind durch zytosolische und matrixexponierte Loops (hier schwarz dargestellt) miteinander verbunden. Bei Substratbindung kommt es zur Konformationsänderung, was den Austausch von zytosolischem ADP^{3-} gegen mitochondriales ATP^{4-} , entsprechend des Membranpotentials, ermöglicht. Abbildung modifiziert nach Metelkin 2006 und Klingenberg 2008 [12;13].

1.1.2 ANT in kardiologischen Erkrankungen

Der Adenin-Nukleotid-Translokator spielt in unterschiedlichen Herzkrankheiten eine Rolle. Bereits 1989 wurden ANT-spezifische Autoantikörper in Patienten mit Myokarditis und dilatativer Kardiomyopathie (DCM) identifiziert [29]. Diese Antikörper blockieren die Aktivität der kardialen Mitochondrien, welche überwiegend ANT1 exprimieren, nicht aber die der Mitochondrien aus der Leber, welche viel ANT3 enthalten. Es wurde beobachtet, dass eine DCM mit einer Verringerung der ANT-Transport-Kapazität und einer damit verbundenen Störung des kardialen Energiestoffwechsels einhergeht [30].

Die Immunisierung von Meerschweinchen mit Rinder-ANT, führte zur Bildung von Antikörpern, deren Funktionalität sich auch hier durch die Verringerung der ANT-Aktivität zeigte. Es kam zu verringertem myokardialen Energiestoffwechsel, begleitet von verringertem Sauerstoffverbrauch und Laktatazidose [31].

Auch in der Virus-Myokarditis wird eine Beteiligung des ANT auf unterschiedliche Weise diskutiert. Das 2C-Protein aus *Coxsackievirus B3* (CVB3) zeigt eine ähnliche Oberflächenstruktur wie ANT [32]. Im Rahmen der immunologischen Abwehrreaktion könnte es daher zur Bildung von Antikörpern kommen, die sowohl mit dem viralen 2C-Protein als auch mit ANT reagieren. In Mäusen konnte bereits gezeigt werden, dass eine CVB3-Infektion zur Bildung von ANT-spezifischen Autoantikörpern und den damit verbundenen Symptomen führt [33]. Darüber hinaus können Virusproteine direkt oder indirekt mit ANT interagieren und somit dessen Funktion beeinflussen [34]. Ein weiterer diskutierter Mechanismus ist, dass Viren die Freisetzung von bestimmten Zytokinen induzieren, die dann wiederum Einfluss auf die ANT-Expression ausüben [7].

Eine Fehlfunktion des ANT wird außerdem mit dem Senger Syndrom assoziiert [35]. Bei dieser autosomal rezessiv vererbaren Krankheit kommt es im Laufe der Zelldifferenzierung zum Verlust des ANT [36]. Sie zeichnet sich durch angeborenen grauen Star, hypertrophe Kardiomyopathie, mitochondriale Myopathie, Laktatazidose und Störungen im Fettstoffwechsel, insbesondere hinsichtlich der Lipidzusammensetzung der Mitochondrienmembranen aus. Der Phänotyp von ANT1-Knockout-Mäusen, zeichnet sich ebenfalls durch hypertrophe Kardiomyopathie begleitet von Laktatazidose aus und zeigt daher ein ähnliches Krankheitsbild wie das Senger Syndrom. Darüber hinaus ist der Verlust von ANT1 in Mäusen durch Muskelschwäche, verringerte Oxidative Phosphorylierung, erhöhten oxidativen Stress und vermehrte Mutationen mitochondrialer DNA gekennzeichnet [37;38]. Eine weitere, mit einer ANT-Fehlfunktion einhergehende Krankheit ist die autosomal dominant vererbare progressive externe Ophthalmoplegie. Es konnte gezeigt werden, dass fünf Punktmutationen im ANT1-Gen mit dieser Krankheit assoziiert sind [39]. Sie zeichnet sich durch die progrediente Lähmung der äußeren Augenmuskulatur, aber auch durch Muskelschwäche

der Extremitäten, Herzrhythmusstörungen, Kardiomyopathien und Störungen des peripheren oder des Zentralnervensystems, einhergehend mit verringerter Oxidativer Phosphorylierung, aus [39].

Auch in der myokardialen Ischämie ist die ANT-Aktivität verringert. Bei diesem Krankheitsbild kommt es zu Störungen des Fettsäuremetabolismus. Die β -Oxidation kommt zum Erliegen, was zur Folge hat, dass sich langkettiges Acyl-CoA anreichert. Dieses bindet und inhibiert dann den ANT [40;41]. Darüber hinaus kann die ANT-Funktion auch direkt durch Oxidation von Thiolgruppen durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die unter hypoxischen Bedingungen gebildet werden, modifiziert und damit inaktiviert werden [42].

Zusammenfassend kann man festhalten, dass eine ANT-Fehlfunktion zu schwerwiegenden Dysregulationen der Oxidativen Phosphorylierung und mit schwerwiegenden Fehlfunktionen der Muskulatur, insbesondere der des Herzens führt.

1.1.3 ANT1 begünstigt das Zellüberleben

Im Gegensatz zu den zahlreichen Defekten, die eine ANT-Fehlfunktion auslöst, wirkt sich eine ANT1-Überexpression (ANT1-OE) positiv auf den Energiemetabolismus und das Zellüberleben kardialer Zellen aus. ANT1-transgene (ANT1tg) Ratten, welche ANT1 herzspezifisch überexprimieren, zeigten eine erhöhte ANT-Funktionalität und erhöhte Aktivitäten der Komplexe II-IV der Atmungskette. Die ANT1-OE führte unter pathophysiologischen Bedingungen, simuliert durch Renin-Überexpression, zur Verringerung mitochondrialer Schädigung durch Stabilisierung der Oxidativen Phosphorylierung und zu verringerter Apoptose [43]. Des Weiteren verbesserte die transgene Überexpression von ANT1 die kontraktile Funktion von Rattenkardiomyozyten [44]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine TGF β -1-induzierte Apoptose in Rattenkardiomyozyten durch Überexpression von ANT1 verringert werden konnte. Dies war mit stabilisiertem Membranpotential und verringerter Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätspore assoziiert [45]. Auch hypoxisch stimulierte, neonatale Rattenkardiomyozyten zeigten bei transgener ANT1-OE eine verringerte Apoptose, begleitet von verringerter ROS-Bildung und aktivierten anti-apoptotischen Signalwegen wie dem AKT- und MAPK-Signaling [46].

In Mäusen, in denen eine diabetische Kardiomyopathie induziert wurde, wirkte eine transgene, myokardiale Überexpression des ANT1 ebenfalls kardioprotektiv [47].

Außerdem konnte in Ratten und Kaninchen gezeigt werden, dass die ANT1-Transkription im Rahmen eines durch ischämische Prækonditionierung induzierten, kardioprotektiven Genprogrammes hoch reguliert wird [48;49].

Der ANT1 trägt demnach maßgeblich zur Zellstabilisierung und einer damit verbundenen höheren Überlebensrate kardialer Zellen bei.

1.2 Kardioprotektives Signaling

Neben dem ANT gibt es noch weitere Komponenten, deren Aktivierung mit einer verbesserten Überlebensrate von kardialen Zellen, insbesondere nach Stresssituationen, einhergeht. Im Folgenden sollen einige dieser Komponenten genauer vorgestellt werden.

1.2.1 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) sind Serin-/Threonin-Kinasen, die ein großes Spektrum von externen Stimuli in zelluläre Signale umwandeln und in einer dreistufigen Kaskade aus Kinasen reguliert werden [50]. Externe Komponenten, wie Zytokine, Wachstumsfaktoren oder zellulärer Stress, stimulieren unterschiedliche Rezeptoren, wie beispielsweise Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK), Zytokinrezeptoren oder auch Toll-Like-Rezeptoren (TLR) [50;51] und induzieren damit die Aktivierung der MAPK. Üblicherweise erfolgt zunächst die Aktivierung einer MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK), welche wiederum die MAPK-Kinase (MAPKK) phosphoryliert und damit aktiviert [52]. Die MAPKK aktiviert dann die Kinaseaktivität der typischen MAPK indem sie Threonin und Thyrosin an einem typischen Sequenzmotiv (Threonin-X-Thyrosin) phosphoryliert. MAPK erkennen dann das Sequenzmotiv Prolin-X-Threonin/Serin-Prolin unterschiedlicher Substrate und phosphorylieren diese an Serin oder Threonin [53]. MAPK regulieren beispielsweise die Genexpression, die Mitose, das Zellüberleben, die Zelldifferenzierung oder die Apoptose [50]. Es gibt mehrere MAPK-Kaskaden die in der Zelle ablaufen können. Die drei wichtigsten sind die JNK-Kaskade, die p38MAP Kinase-Kaskade und die MAPK/Erk-Kaskade [52]. Besonders die MAPK/Erk-Kaskade ist in kardioprotektiven Mechanismen involviert und soll daher im Folgenden genauer betrachtet werden.

1.2.1.1 Extrazellulär Signal regulierte Kinasen 1 und 2

Die Extrazellulär Signal regulierten Kinasen 1 und 2 (Erk1/Erk2) gehören zu den Mitogen-aktivierten Proteinkinasen. Erk1 und Erk2 sind in ihren Sequenzen zu 83 % identisch und zeigen in ihren Funktionen eine sehr hohe Homologie. Wegen ihrer großen Ähnlichkeit, werden sie häufig als Erk1/2 zusammengefasst, sind aber dennoch nicht völlig identisch in ihren Funktionen. Beispielsweise wurde gezeigt, dass ein Erk2 Knockout bei Mäusen zum Tod der Embryos führt und dass Erk1 die fehlende Funktion von Erk2 nicht kompensieren konnte [54]. Erk1/2 wird ubiquitär exprimiert und liegt im inaktiven Basalzustand zytoplasmatisch vor [55]. Die Aktivierung von Erk1/2 wird durch unterschiedliche Stimuli, wie z.B. Wachstumsfaktoren, Serum, Liganden von G-Protein gekoppelten Rezeptoren oder durch zellulären Stress, induziert. Durch die Rezeptoraktivierung (z.B. RTK) erfolgt zunächst die Rekrutierung und Aktivierung des G-Protein Ras (*Rat sarcoma*). Dies aktiviert dann Raf

(*rapidly accelerated fibrosarcoma*, eine MAPKKK), diese dann MEK1/2 (MAPK/ERK Kinase 1/2, gehört zu den MAPKK), die dann wiederum die MAPK Erk1/2 phosphoryliert. Neben Raf sind noch andere MAPKKK (z.B. Mos, Tpl2) bekannt, die die Aktivierung von MEK1/2 und damit eine Aktivierung von Erk1/2 bewirken können [52]. Die Stimulation von Erk1/2 durch TLR erfolgt beispielsweise via Tpl2 [56-58]. Welche MAPKKK den Signalweg induziert, hängt vom Stimulus und vom Zelltyp ab [59]. Wird Erk1/2 aktiviert, transloziert ein signifikanter Teil des Proteins in den Zellkern und kann dort Substrate phosphorylieren [55]. Weitere Substrate befinden sich im Zytoplasma oder sind Membran- oder Zytoskelett-assoziiert [60]. Darüber hinaus existieren auch mitochondriale Substrate. STAT3 beispielsweise, ist ein Substrat von Erk2, welches bei Aktivierung im Mitochondrium zu einem vermehrten Elektronentransport über die Elektronentransportkette beiträgt [61]. Eine Übersicht der Substrate haben Yoon *et al.* in einem Review zusammengestellt [62]. Die Aktivierung von Erk1/2 beeinflusst, entsprechend seiner großen Anzahl an Substraten, auch eine Vielzahl zellulärer Prozesse zu denen unter anderem die Zellbewegung, die Zelldifferenzierung, die Zellproliferation, das Zellüberleben oder die Apoptose gehören [60;63].

1.2.1.2 Erk1/2 in kardialen Zellen

Die MAPK Erk1/2 spielen eine Rolle in der Kardiogenese. Es konnte gezeigt werden, dass Erk1/2 in die Differenzierung von Maus-Kardiomyozyten involviert ist [64]. Darüber hinaus konnten Krankheiten, wie das Noonan-Syndrom, das Leopard-Syndrom, das Costello-Syndrom und das Cardio-Facio-Futaneous-Syndrom mit Fehlfunktionen im MAPK/Erk-Weg assoziiert werden. Diese Krankheiten gehen mit geistigen Behinderungen, muskulären Veränderungen und angeborenen Herzfehlern einher [65;66]. Bueno *et al.* zeigten, dass die Aktivierung von Erk1/2 zu kardialer Hypertrophie, begleitet von verstärkter kardialer Funktion und partieller Resistenz gegen Apoptose führt [67]. Die Phosphorylierung von Erk1/2 geht also mit einer verringerten Apoptose und damit mit einer kardioprotektiven Wirkung, insbesondere bei Ischämie, einher [68]. Die kardioprotektive Wirkung wird durch unterschiedliche Mechanismen erklärt [69]. Einerseits führt die verstärkte Phosphorylierung zur Verringerung der TNF α -Induzierten Apoptose [70], andererseits wird die Expression anti-apoptotischer Faktoren induziert [71;72].

1.2.2 Proteinkinase B

Die Proteinkinase B (PKB oder AKT) spielt eine wichtige Rolle in einer Vielzahl von zellulären Prozessen, wie der Zellproliferation, der Regulation des Zellzyklus oder der Apoptose [73]. Es existieren drei hochgradig homologe Isoformen [74-76]. Die Isoformen PKB α und PKB γ werden ubiquitär exprimiert. Die Isoform PKB β hingegen tritt vorwiegend in Insulin-sensitivem Gewebe auf

und ist maßgeblich am Insulinsignaling beteiligt [77;78]. Alle drei Isoformen haben eine N-terminale PH-Domäne, die eine Bindung an Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat (PIP3) ermöglicht, eine C-terminale hydrophobe Domäne und eine zentrale Kinase-Domäne, die die Übertragung von Phosphatresten auf unterschiedliche Substrate ermöglicht [79]. Die Proteinkinase B gehört zu den Serin-/Threonin-kinasen. Sie phosphoryliert Substrate mit der Erkennungssequenz Arginin-X-Arginin-X-X-Serin/Threonin-Asparagin/Asparaginsäure und ändert damit deren Aktivierungszustand [80]. Bei der Aktivierung von AKT erfolgt zunächst ein extrazelluläres Signal, welches Rezeptoren wie Rezeptor-Thyrosin-Kinasen (RTK) oder Toll-Like-Rezeptoren [81] stimuliert, die dann wiederum die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) aktivieren. Diese bewirkt die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphat (PIP2) zu PIP3. PIP3 interagiert anschließend mit AKT, welches dann phosphoryliert (T308,S473) und damit aktiviert wird [79]. Es wurde beobachtet, dass AKT mit Hitzeschockprotein 27 (*Heat shock protein 27*, HSP27) interagiert. Dadurch wird die Phosphorylierung und damit auch die Aktivierung von AKT stabilisiert [82]. Aktivierte Proteinkinase B wirkt positiv auf das Zellüberleben, indem sie die Apoptose blockiert. Dies kann durch unterschiedliche Mechanismen erfolgen. Beispielsweise werden pro-apoptische Komponenten, wie Bax [83], GSK3 β [84] oder Caspase-9 [85] inhibiert und die Apoptose damit unterbunden.

1.2.2.1 AKT in kardialen Zellen

Auch in kardialen Zellen spielt AKT eine große Rolle [86]. In Rattenkardiomyozyten konnte die protektive Wirkung von AKT nachgewiesen werden, welche mit verringerter Apoptose und einer erhöhten Überlebensrate der Zellen einher ging [87-89]. Auch in Kaninchenherzen war die Aktivierung von AKT mit einer verringerten Infarktgröße assoziiert [90]. Neben der kardioprotektiven Wirkung wurde gezeigt, dass AKT auch einen Einfluss auf das Zellwachstum im Herzen hat. Zum Beispiel wurde beobachtet, dass eine Überexpression von PI3K in Mausherzen mit einer erhöhten AKT-Aktivierung und einer Vergrößerung der Kardiomyozyten verbunden ist [91]. Auch bei der transgenen Überexpression von konstitutiv aktivem AKT wurde ein vergrößertes Herz und vergrößerte Kardiomyozyten in Mäusen nachgewiesen [92]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass AKT die kontraktile Funktion und den Calciumhaushalt von Kardiomyozyten unter hypoxischen Bedingungen stabilisiert [93].

1.2.3 Chaperone

Chaperone sind Proteine, die die Faltung anderer Proteine kontrollieren. Sie sind hoch konserviert und kommen in allen Lebewesen vor [94;95]. Einige Chaperone werden als Antwort auf Stressbedingungen, wie erhöhte Temperatur [96], Ischämie [97], Hypoxie [98], freie Radikale

(reaktive Sauerstoff-Spezies, ROS) [99] oder Hypothermie [100;101] verstärkt exprimiert. Da erstmalig eine Expressionsinduktion von Chaperonen, nach der Erhöhung der Temperatur [96], beobachtet wurde, bekamen diese Proteine den Namen Hitzeschockproteine (HSP).

Klassische Chaperone werden auch unter Basalbedingungen exprimiert. Ihre Funktion besteht darin, unreife Proteine reversibel zu binden und damit Interaktionen, welche zu fehlerhafter Aggregation oder Missfaltung und damit verbundenem Aktivitätsverlust führen würden, zu vermeiden.

Durch die Bindung von Chaperonen wird auch der Transport von Proteinen in andere Zellkompartimente ermöglicht. Bereits gefaltete Proteine könnten Membranen nicht passieren und demnach nicht an ihren Funktionsort gelangen [102;103].

Wenn eine Zelle extremen Stressbedingungen ausgesetzt ist, kann es zur Proteindenaturierung und verstärkter Expression von HSPs kommen [104]. Denaturierte Proteine können dann von HSPs erkannt und zurückgefaltet oder abgebaut werden [95;105;106].

Zellen, die HSPs durch Stress anreichern, entwickeln eine temporäre Toleranz gegen anschließend auftretende Stressepisoden [107]. In kardialen Zellen führt die Anreicherung von HSPs zu einer besseren Verträglichkeit von Ischämie/Reperfusion, begleitet von einer Verbesserung der kardialen Funktion [108]. Chaperone haben also einen großen Einfluss auf die Funktionalität und das Überleben vieler Zellen.

Chaperone werden häufig nach ihrem Molekulargewicht benannt. Man unterscheidet HSP110, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 und die kleinen HSPs (<35kDa)[95;109].

Im Folgenden sollen Hitzeschockproteine, die in dieser Arbeit von besonderem Interesse sind, genauer vorgestellt werden.

1.2.3.1 Hitzeschockprotein 90

Hitzeschockprotein 90 (HSP90) ist eines der am stärksten exprimierten HSPs und kommt unter Basalbedingungen im Zytosol, im Zellkern, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), in Mitochondrien eukaryotischer Zellen und in Pflanzen auch in Chloroplasten vor [110]. Man unterscheidet vier Klassen von HSP90 [111]. HSP90AA, welche die induzierbare Form darstellt, HSP90AB, welches der basal exprimierten Form entspricht, HSP90B, welches im ER vorliegt und TRAP1 (*tumor necrosis factor receptor-associated protein 1*), welches auch als mitochondriales HSP90 oder HSP75 bezeichnet wird [112]. Wie der Name vermuten lässt, ist letzteres mit 75kDa, kleiner als die anderen Mitglieder der HSP90-Familie [113]. Die Expression von HSP90 kann sowohl durch Hitze, als auch durch Ischämie/Reperfusion induziert werden [114;115].

Eine Vielzahl der Substrate von HSP90 gehört zu den Transkriptionsfaktoren oder Kinasen. Sie sind an der Zellzykluskontrolle, der Zelldifferenzierung, der Apoptose oder an der Signaltransduktion beteiligt [110;116;117]. HSP90 verhindert eine unspezifische Aggregation von Proteinen [118] und kann die

Konformation seiner Substrate modifizieren und diese damit aktivieren oder stabilisieren [119]. Es liegt in der Zelle als Dimer vor. Jedes Monomer enthält eine carboxyterminale (C-terminale) Dimerisierungsdomäne welche an eine Mitteldomäne grenzt. Die Mitteldomäne ist an der Substratbindung beteiligt und über einen geladenen Linker mit der aminoterminalen (N-terminalen) Domäne verbunden [110]. Letztere enthält eine tief eingelagerte ATP-Bindungsstelle. TRAP1 zeigt ein besonderes Strukturmerkmal, das Leucin-X-Cystein-X-Glutaminsäure-Motiv, welches in allen anderen HSP90 fehlt [113]. Darüber hinaus ist HSP90 mit Cofaktoren assoziiert [120-122]. Diese werden durch die C-terminale Domäne gebunden [123]. Beispielsweise wird ANT durch HSP90, zusammen mit HSP70 und HSP40 in löslicher Form gehalten, um den Transport zum Mitochondrium und die Integration in dessen Membran zu sichern [124]. Des Weiteren werden Steroidrezeptoren nur in Assoziation mit HSP56 und HSP70 von HSP90 gebunden und ihre Aktivität dadurch reguliert [125;126].

HSP90 in kardialen Zellen

Es konnte gezeigt werden, dass HSP90 mit der Stickstoffmonoxidsynthase (NO-Synthase) interagiert und so die Stickstoffmonoxidproduktion stabilisiert [127;128]. Gleichzeitig wird eine reduzierte NO-Produktion, mit verringertem koronarem Blutfluss und einem Abfall der kardialen Leistung, assoziiert [129]. Demnach stabilisiert HSP90, durch seine Interaktion mit der NO-Synthase, die kardiale Leistungsfähigkeit.

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass HSP90 mit AKT interagiert, dessen Dephosphorylierung verhindert und somit seine Aktivität stabilisiert [130]. Außerdem ist bekannt, dass eine erhöhte ANT-Expression in NRCM unter Hypoxie mit erhöhter HSP90-Expression einhergeht [46]. Es wäre daher möglich, dass HSP90 auch dort einen stabilisierenden Effekt auf phosphoryliertes AKT und der damit verbundenen Erhöhung des Zellüberlebens hat.

1.2.3.2 Hitzeschockprotein 27

Hitzeschockprotein 27 (HSP27) gehört zu der Familie der kleinen Hitzeschockproteine (sHSP), zu denen auch Crystallin (CRYAB), HSP20 und HSP22 sowie sechs weitere Proteine gehören [131]. Sie existieren unter Basalbedingungen und werden durch zytotoxischen Stress, wie Hitze oder oxidativen Stress verstärkt exprimiert [132-134]. Eine verstärkte HSP27-Expression führt zu Thermotoleranz und auch zur Resistenz gegen oxidativen Stress [133;135]. Auch CRYAB zeigt diese Eigenschaften [134;136]. CRYAB und HSP27 sind eng miteinander assoziiert. Es wurde mehrfach gezeigt, dass HSP27 und CRYAB miteinander interagieren [132;137]. Die Struktur der meisten sHSPs besteht in einem hoch konservierten C-terminalen Bereich, der eine sogenannte α -Crystallin-Domäne beinhaltet und dem weniger konservierten, N-terminalen Bereich, der die hydrophobe WD/EPF-Domäne und

Phosphorylierungsstellen enthält [138]. Die N-terminale Domäne ist wichtig für die Ausbildung von dynamischen HSP27-Oligomeren unterschiedlicher Größe (100-700kDa), indem sie intramolekulare Interaktionen mit dem hydrophoben Bereich der α -Crystallin-Domäne vermittelt [139].

Der Oligomerisierungszustand ist assoziiert mit der Chaperonaktivität. Liegt HSP27 in Form großer Oligomere vor, ist es in wenig oder unphosphoryliertem Zustand, zeigt Chaperonaktivität und schützt vor oxidativem Stress [140]. Andererseits wurde gezeigt, dass nach Einwirkung von zytotoxischem Stress eine Phosphorylierung von HSP27 an unterschiedlichen Serinresten erfolgt und damit die Dissoziation von HSP27-Oligomeren und ein Verlust der Chaperonfunktion induziert wird [141]. Dieses widersprüchliche Phänomen ist noch nicht völlig aufgeklärt. Es wird aber vermutet, dass dies ein Recyclingmechanismus ist, um HSP27 von falsch gefalteten Proteinen, deren Umfaltung unter akuten Stresssituationen nicht essentiell ist, zu befreien und für andere Proteine zugänglich zu machen [140]. Die Phosphorylierung von HSP27 erfolgt durch den p38-MAPK-Weg [142;143], der durch zahlreiche Stimuli, unter anderem auch durch TLR-Aktivierung [51;144], durch Proteinkinase B (AKT), C oder D induziert werden kann [145-149]. Neben seiner Funktion als Chaperon ist HSP27 auch an der Modulation von F-Aktin beteiligt und nimmt so Einfluss auf die Muskelkontraktion und das Zytoskelett [150-152]. Darüber hinaus vermittelt HSP27 die Degradation oxidierter Proteine über das Proteasom [153;154]. Des Weiteren schützt es vor Apoptose, indem es beispielsweise die Freisetzung von Cytochrom C (CytC) aus dem Mitochondrium und damit die Aktivierung von Caspasen verhindert [155-158]. Zusätzlich wird die Menge an ROS durch sHSPs verringert, was Folgeeffekte wie Lipidperoxidation und Proteinoxidation reduziert [159;160]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass HSP27 und CRYAB die Apoptose durch die Kontrolle der Aktivierung von AKT regulieren [149;161]. Auch in Kardiomyozyten konnte eine protektive Wirkung von HSP27 bei Ischämie nachgewiesen werden [162;163]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass humanes Myokard Hsp27 nach Ischämie freisetzt und dadurch die Toll-Like-Rezeptoren 2 und 4 stimuliert werden [164]. Aus diesem Grund soll im Folgenden etwas genauer auf die Toll-Like-Rezeptoren eingegangen werden.

1.3 Toll-Like-Rezeptoren

Toll-Like-Rezeptoren (TLR) sind Membranproteine, die eine wesentliche Komponente in der angeborenen Immunreaktion spielen. Sie erkennen unterschiedliche strukturelle Elemente von Mikroorganismen (PAMPs, *pathogen-associated molecular pattern*) und induzieren dann eine antigenunabhängige Immunantwort. Toll-Like-Rezeptoren werden in Immunzellen wie Neutrophilen, Makrophagen, Monozyten oder Dendritischen Zellen, aber auch in einer Vielzahl von anderen Zellen wie mesenchymalen und parenchymalen Zellen aus Leber, Haut, Hirn oder auch Herz exprimiert [165]. Auch in Kardiomyozyten werden TLR exprimiert [166]. Die genaue Funktion in diesen Geweben ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Bei Zellschädigung werden, z.B. von Kardiomyozyten, bestimmte

Komponenten (DAMPs, *damage-associated molecular pattern*) wie z.B. Hitzeschockproteine freigesetzt [167], welche dann ebenfalls mit TLR interagieren und eine intrazelluläre Signalkaskade auslösen [164].

In Säugetieren sind bisher 13 Isoformen von Toll-Like-Rezeptoren identifiziert worden, wobei diese sich von Art zu Art unterscheiden. In humanen Zellen sind TLR1-10, in Mauszellen beispielsweise TLR 1-9 und TLR11-13 vorhanden. In Ratten fehlt TLR1, aber TLR2-12 sind hingegen vorhanden (www.uniprot.org).

Toll-Like-Rezeptoren haben eine konservierte, zytoplasmatische Domäne, die Toll/IL-1R (TIR) Domäne genannt wird. Sie interagiert mit intrazellulären Adaptermolekülen und ist für die Signaltransduktion essentiell. Des Weiteren haben sie eine extrazelluläre, funktionelle Domäne die leucinreiche Wiederholungen (LRR, *Leucin-rich-repeats*) enthält. Diese LRR formen eine Hufeisenstruktur, welche direkt an der Erkennung der PAMPs/DAMPs beteiligt ist.

Die TLR-Isoformen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Spezifität und ihrer Lokalisation innerhalb der Zelle [51;168]. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR6 sind auf der Zelloberfläche lokalisiert und erkennen beispielsweise Lipoproteine (TLR2 in Kombination mit TLR1 oder TLR6), Lipopolysaccharide (LPS, erkannt durch TLR4) oder Flagelline (TLR5). TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 sind auf Endosomen lokalisiert und für die Erkennung von Nukleinsäuren (dsRNA, ssRNA, CpG DNA) verantwortlich [51;167].

TLR2, TLR3, TLR4 und TLR6 kommen in Kardiomyozyten vor [166;169], wobei TLR2 und TLR4 die hier am stärksten exprimierten Isoformen sind [170].

Wenn Toll-Like-Rezeptoren stimuliert werden, laufen bestimmte Signalkaskaden ab, die letztendlich zur Zytokinproduktion führen. Abhängig von Ligand und Rezeptor werden bestimmte Adapterproteine rekrutiert, über die vermittelt wird, welches Expressionsmuster aktiviert wird. In Tabelle 1.1 ist dargestellt, welche HSPs an TLR2 und TLR4 als Liganden agieren (nach [51]).

Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von TLR über den MyD88 (*myeloid differentiation primary-response protein 88*) abhängigen Weg, über den auch die kardialen TLR2 und TLR4 fungieren können, unter anderem zur Aktivierung unterschiedlicher MAPK wie Erk, p38MAP Kinase oder JNK führt [144;171]. Die Aktivierung von AKT kann ebenfalls durch die Aktivierung von TLR2 induziert werden [172;173]. Toll-Like-Rezeptoren stimulieren eine Vielzahl von intrazellulären Signalkaskaden, die sowohl pro- als auch anti-inflammatorisch wirken können und nehmen daher sowohl Einfluss auf das Zellüberleben als auch auf die Apoptose [174;175].

Tabelle 1.1: HSP-Liganden von TLR2 und TLR4.

Rezeptor	Ligand	Ursprung des Liganden	Referenz
TLR2	Hitzeschockprotein 70	Wirt	[176]
	Hitzeschockprotein 60	Wirt	[177]
	Hitzeschockprotein 90	rekombinant, human	[178]
	Hitzeschockprotein 27	rekombinant, human	[164]
	Hitzeschockprotein 22	Wirt	[179]
	Alpha A Crystallin	Wirt	[179]
TLR4	Hitzeschockprotein 60	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	[180;181]
	Hitzeschockprotein 60	Wirt	[177]
	Hitzeschockprotein 70	Wirt	[182]
	Hitzeschockprotein 27	rekombinant, human	[164]

1.4 Zielsetzung

Allein in Deutschland starben 2013 rund 130.000 Menschen an ischämischen Herzkrankheiten (Quelle: Statistisches Bundesamt). Das entspricht 14,4 % aller Todesfälle in diesem Jahr und stellt damit eine der häufigsten Todesursachen dar. Ischämische und hypoxische Zellschädigungen sind mit einer verringerten ANT-Aktivität, ATP-Mangel, verstärkter ROS-Produktion und damit verbundenem Zelltod assoziiert. Es ist daher von zentraler Bedeutung die Mechanismen, die einer solchen Schädigung entgegen wirken können, zu ermitteln und zu analysieren. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe haben bereits gezeigt, dass eine ANT1-Überexpression (ANT1-OE) in neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRCM), bei hypoxischer Inkubation, mit verstärkter HSP90-Expression, einem verstärkt aktivierten, kardioprotektiven AKT- und Erk-Signaling sowie mit verringertem Zelltod einhergeht. Die Mechanismen, durch die diese Effekte verursacht werden, sind noch weitestgehend ungeklärt. Um die protektive Wirkung von ANT1 auch therapeutisch nutzen zu können, ist es daher von großer Wichtigkeit das ANT-Signaling genauer zu analysieren.

Aus diesem Grund wurde zunächst untersucht, mit welchen Komponenten der ANT interagiert. Dazu wurde das ANT-spezifische Immunpräzipitat mittels Massenspektroskopie untersucht und anschließend Rückschlüsse auf involvierte Signalwege gezogen.

Da Hitzeschockproteine auch bei hypoxischem Stress eine protektive Funktion übernehmen, wurde im zweiten Teil der Arbeit untersucht, wie sich die ANT1-OE auf die Expression der ANT-interagierenden Hitzeschockproteine unter Hypoxie auswirkt. Es wurde bereits beschrieben, dass myokardiale Zellen HSPs nach Ischämie ins Kulturmedium abgeben, die dann Toll-Like-Rezeptoren stimulieren [164]. Außerdem zeigten Kim *et al.*, dass adulte Rattenkardiomyozyten HSP60 freisetzen und so eine interzelluläre Kommunikation induzieren [183]. Es stellte sich die Frage, ob eine Kommunikation unter NRCM erfolgt, indem ANT-interagierende HSPs in den Kulturüberstand abgegeben werden und ob die ANT1-OE eine solche Kommunikation beeinflusst. Zur Klärung dieses Sachverhaltes wurden die Kulturüberstände im dritten Teil dieser Arbeit hinsichtlich ihres HSP-Gehaltes analysiert. Zusätzlich erfolgte die Untersuchung des intrazellulären Signalings von neonatalen Rattenkardiomyozyten nach Stimulation mit HSP enthaltendem Kulturüberstand und rekombinantem HSP.

Um zu untersuchen, ob die Induktion intrazellulärer Signalantworten durch TLRs vermittelt wird, erfolgte im vierten Teil der Arbeit die Blockade der TLR2/4 bei gleichzeitiger Stimulation mit HSP oder Kulturüberstand.

Darüber hinaus wurde analysiert, ob Unterschiede in der Signalantwort bei ANT1-OE in NRCM auf Unterschiede in der Rezeptorexpression zurückzuführen sind, indem die Expression der kardiomyozytären TLR2 und TLR4 ermittelt wurde.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 2.1: Verwendete Chemikalien.

Substanz	Hersteller
Acetonitril	J. T. Baker, Center Valley/U.S.A.
Agarose	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Ammoniumbicarbonat	Carl Roth, Karlsruhe
AmpliTaQ-Polimerase-Puffer (10x)	Applied Biosystems, Darmstadt
<i>Bovine Serum Albumine (BSA)</i>	Carl Roth, Karlsruhe
Bromthymolblau (BTB)	Sigma Aldrich, München
<i>Cell Lysis Buffer (10x)</i>	Cell Signaling, Boston/U.S.A.
Complete Mini Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche Applied Science, Mannheim
Coomassie-Blau (<i>Coomassie® Brilliant Blue R-250</i>)	Sigma Aldrich, München
DEPC-Wasser	USB Corporation, Cleveland/U.S.A.
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich, München
DMEM, <i>low Glucose</i>	GIBCO/ Invitrogen, Darmstadt
dNTP Mix	Abgene, Epsom/UK
<i>Dubelco's Phosphate Buffered Saline (PBS, ohne Ca²⁺, Mg²⁺)</i>	PAA, Pasching/A
EDTA	Merck, Darmstadt
Eisessig	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol (EtOH)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Fötales Rinderserum (FBS Gold)	Sigma Aldrich, München
5-Fluoro-2'-desoxyuridine (FUDR)	Sigma Aldrich, München
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe
HBSS, <i>Hank's Balanced Salt Solution</i>	GIBCO/ Invitrogen, Darmstadt
J. T. Baker Wasser	J. T. Baker, Center Valley/U.S.A.
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kohlenstoffdioxid	Linde AG, Berlin
Konzentrierte Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol (MeOH)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
NuPAGE® <i>Transfer Buffer</i>	Lifetechnologies, Carlsbad/U.S.A.
NuPAGE® <i>LDL Sample buffer, 4x</i>	Lifetechnologies, Carlsbad/U.S.A.
NuPAGE® <i>MES SDS Running Buffer (20x)</i> ,	Lifetechnologies, Carlsbad/U.S.A.
OxPAPC	Invivogen, Toulouse/Fr

Substanz	Hersteller
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Pferdeserum (<i>Donor Horse Serum</i>)	Biochrom AG, Berlin
PhosStop Phosphatase Inhibitor	Roche Applied Science, Mannheim
rekombinantes, humanes HSP27, endotoxinfrei	Enzo Life Sciences, Farmingdale/U.S.A.
Sauerstoffarmes Gas (CRYASTAL-Gemisch, 94 % N ₂ , 5 % CO ₂ , 1 % O ₂)	Air Liquide, Kornwestheim
Stickstoff	Linde AG, Berlin
Tris Base	Carl Roth, Karlsruhe
Tris HCl	Carl Roth, Karlsruhe
Trypanblau-Lösung 0,4 %	Sigma Aldrich, München
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe

2.1.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 2.2: Verwendete Puffer und Lösungen.

Bezeichnung	Verwendung	Zusammensetzung
Ammoniumbicarbonat-Lösung	Massenspektrometrie	20 mM in <i>A. dest</i>
Blocklösung	Immunfärbung	5 % w/v Magermilchpulver (MaMiPu) oder 1-3 % BSA in TBST
Complete Mini Protease-Inhibitor-Cocktail	Proteaseinhibition	1 Tablette in 1 ml <i>A. dest</i>
Coomassie-Blau-Entfärbelösung	Immunfärbung	10 % (v/v) Essigsäure, 30 % (v/v) Ethanol
Coomassie-Blau-Lösung	Immunfärbung	0,2 % (w/v) Coomassie-Blau in 10 % (v/v) Essigsäure, 30 % (v/v) Methanol
DNA-Ladepuffer (6x)	Agarose-Gelelektrophorese	10 mM Tris HCl, 60 % (v/v) Glycerol, 60 mM EDTA, 1 % (w/v) Bromthymolblau
DTT-Lösung	Probenpufferadditiv	1M in <i>A. dest</i>
Ethanol	Desinfektion	70% v/v in <i>A. dest</i>
FUDR-Lösung	Inhibition der Fibroblasten	2 mM in sterilem Wasser (1000x), final 2 µM
IP-Puffer	Immunpräzipitation	25 mM Tris HCl, 600 mM NaCl, pH 7.2
Kollagenase-Lösung	Kollagenverdau	10 mg/ml in HBSS (10x), final 1 mg/ml HBSS, sterilfiltriert
Laufpuffer	SDS-PAGE	50 ml NuPAGE® MES SDS Running Buffer ad 1l <i>A. dest</i>
Lysepuffer	Generieren von Gesamtzellextrakten	100 µl Cell Lysis Buffer (10x), 100 µl PhosStop Phosphatase-Inhibitor (10x), 100 µl Complete Mini Proteaseinhibitor (10x) ad 1 ml <i>A. bide</i> st
PhosStop Phosphatase Inhibitor	Phosphataseinhibition	1 Tablette in 1 ml <i>A. dest</i>
Primer-Lösung	PCR	10 pM Primer in J. T. Baker Wasser
Probenpuffer, 4x	Denaturieren von Proteinen	NuPAGE-Probenpuffer, mit 200 mM DTT

Bezeichnung	Verwendung	Zusammensetzung
RNAse A	Isolation genomischer DNA	20 mg/ml in DEPC-Wasser
Spüllösung	Spülen entnommener Herzen bis zur Blutleere	130 mM NaCl, 30 mM KCl in <i>A. dest.</i> , sterilfiltriert
TAE-Puffer (50x)	Agarose-Gelelektrophorese	2 M Tris Base, 5,7 % (v/v) Eisessig, 50 mM EDTA, pH 8.3
TBS (10x)	Immunfärbung	0,5 mM Tris Base, 1,38 M NaCl, 7 mM KCl, pH 7.4 ad 1l <i>A. dest.</i>
TBST	Immunfärbung	100 ml TBS (10x), 1 ml Tween 20 ad 1l <i>A. dest.</i>
Transferpuffer	Western-Blot	50ml NuPAGE [®] Transfer Buffer mit 20 % v/v MeOH ad 1l <i>A. dest.</i>
Trypsinlösung	Andauen von Herzstücken	0,6 mg/ml in HBSS
Trypsinlösung	Massenspektrometrie	10 ng/μl in <i>A. dest.</i>

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.3: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
<i>C-18 resin Tips</i> , Bindungskapazität 2 μg	Omix Varian, Pittcon/U.S.A.
Eppendorfreaktionsgefäße, 200 μl, 500 μl, 1500 μl, 2000 μl	Eppendorf, Hamburg
<i>Feather Disposable Scalpel No 11, No21</i>	PfmMedical, Köln
Feinpinzette Dumont # 5-45 <i>Forceps</i> "	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Feinschere " <i>Iris Scissors</i> 11,5 cm"	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
ImmunBlot PVDF Membran	BIO-RAD, München
Mullkompresse, steril	Fuhrmann Verbandstoffe, Much
NuPAGE [®] Novex Sharp <i>prestained</i> Proteinstandard	Lifetechnologies, Carlsbad/U.S.A.
NuPAGE [®] Novex Bis-Tris-Gele	Lifetechnologies, Carlsbad/U.S.A.
Pierce [®] Protein A/G-Agarose Beads	Lifetechnologies, Carlsbad/U.S.A.
Pinzette "Standard Pattern <i>Forceps</i> 14,5cm"	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Pipettenspitzen, 10 μl, 100 μl, 1000 μl	Sarstedt, Nümbrecht
Schere " <i>Surgical Scissors</i> 14,5 cm"	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Serologische Pipetten, 5 ml, 10 ml, 25 ml	VWR, Dresden
Spritze, PLASTIPAK 10 ml, 50 ml	BD Biosciences, Heidelberg
Sterilfilter PharmAssure [®] , 2 μm	Pall GmbH, Dreieich
Whatman-Papier	GE Healthcare, München
Zellkulturflaschen, T75	BD Biosciences, Heidelberg
Zellkulturplatten, 6-Well, 12-Well, 24-Well, 96-Well	BD Biosciences, Heidelberg
Zellkulturschalen	BD Biosciences, Heidelberg
Zellschaber	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen/CH
Zentrifugenröhrchen 15ml, 50ml	BD Biosciences, Heidelberg

2.1.4 Geräte

Tabelle 2.4: Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller	Bemerkung
C 18 reverse Phase nano HPLC Säule	Thermo Scientific, Karlsruhe	
CO ₂ -Inkubator CB150	Binder, Tuttlingen	
Dounce Homogenisator, 1ml	OPS Diagnostics, Lebanon/U.S.A.	
Dynabeads® Mx 1 Mixer	Invitrogen Darmstadt	
Fluorometer "Spektra Max Gemini"	Molecular Devices, Sunnyvale/U.S.A.	
Gelelektrophoresekammer	OWL Separation Systems, Nottingham/UK	
Genesys 6 UV-Vis Spektrophotometer	Thermoelectron, Waltham USA	
HERASafe Sterilbank	Thermo Electron, Waltham/U.S.A.	
Hypoxiekammer (Modular Incubator Chamber)	Billups-Rothenberg, Del Mar/U.S.A.	
Las 4000 mini-Imagers	Fujifilm, Tokio/JP	
LTQ-Orbitrap-Velos Massen Spectrometer	Thermo Electron, Waltham/U.S.A.	
Magnetrührer <i>lab disc</i>	VWR International, Darmstadt	
Mehrkanalpipette, 200 µl	Eppendorf, Hamburg	
<i>Microtitration plate reader</i> Tecan Sunrise	Tecan, Männedorf/CH	
Mikroskop DMIL DCF 480	Leica, Wetzlar	
Mikroskop Eclipse TS 100	Nikon Instruments, Kingston/GB	
Mikrowelle MW 7809	Severin, Sundern	
Mini Trans-Blot® Cell	BIO-RAD, München	
Neubauer Zählkammer, Neubauer Improved	LO-Laboroptik GmbH, Bad Homburg	
NuPAGE® NovexMini Cell	Lifetechnologies, Carlsbad/U.S.A.	
Pipetten, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg	
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt	
PowerPac™ <i>Basic Power Supply</i>	BIO-RAD, München	
Primus 96 advanced® Thermocycler	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen	
SmartSpec™ 3000	BIO-RAD, München	
Thermokissen	NEB Biolabs, Ipswich, U.S.A.	
Transiluminator BioDoc Analyze, CCD-Kamera	Biometra, Göttingen	
Trio Thermoblock	Biometra, Göttingen	
Wasserbad TWB5	Julabo, Seelbach	
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg	Rotor FA-45-24-11
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg	Rotor FA-45-6-30
Zentrifuge Avanti™ J-25	Beckmann Coulter, Fullerton/U.S.A.	Rotor JA 25-50, JA 25-15
Zentrifuge mit Kühlfunktion 5415 R	Eppendorf, Hamburg	Rotor FA-45-24-11

2.1.5 Zellkulturmedien

Tabelle 2.5: Für die Zellkultur verwendete Medien.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Fibroblastenmedium	DMEM, <i>low Glucose</i> , 20 % v/v FBS Gold, 1 % v/v Penicillin/Streptomycin
NRVM-Medium	DMEM, <i>low Glucose</i> , 10 % v/v FBS Gold, 10 % Pferdeserum, 1 % v/v Penicillin/Streptomycin, 2 µM FUDR
Mangelmedium, C-	DMEM, <i>low Glucose</i> , 1 % v/v Penicillin/Streptomycin, 2 µM FUDR

2.1.6 Stimulationsreagenzien

Tabelle 2.6: Verwendete Stimulationsreagenzien. Die Reagenzien wurden wie in dieser Tabelle beschrieben angesetzt und vor Verwendung dunkel für zwei Stunden auf Eis vorinkubiert.

Experiment	Zusammensetzung	Dauer/ Begasungszustand
Stimulation mit KÜAH	KÜAH (Kulturüberstand hypoxisch kultivierter ANT1tg NRCM)	30 min/ normoxisch
Stimulation mit KÜAH	KÜAH	24 h/ normoxisch + hypoxisch
Blockade des endogenen HSP27 im KÜAH	KÜAH mit 10 µg/ml Antikörper (HSP27-Antikörper oder unspezifisches Ziegen IgG), direkt in KÜAH angesetzt	30 min/ normoxisch
Blockade des endogenen HSP27 im KÜAH	Mangelmedium mit 10 µg/ml Antikörper (HSP27-Antikörper oder unspezifisches goat IgG), direkt in Mangelmedium angesetzt	24 h/ normoxisch + hypoxisch
Blockade der TLR2/4 bei Stimulation mit KÜAH	KÜAH mit 30 µg/ml OxPAPC, Substanz direkt in KÜAH angesetzt	30 min/ normoxisch
Blockade der TLR2/4 bei Stimulation mit KÜAH	Mangelmedium mit 30 µg/ml OxPAPC, Substanz direkt in Mangelmedium angesetzt	24 h/ normoxisch + hypoxisch
Stimulation mit rhHSP27	Mangelmedium mit 4 µg/ml rhHSP27, Substanz direkt in Mangelmedium angesetzt	30 min/ normoxisch
Stimulation mit rhHSP27	Mangelmedium mit 4 µg/ml rhHSP27, Substanz direkt in Mangelmedium angesetzt	24 h/ normoxisch + hypoxisch
Blockade der TLR2/4 bei Stimulation mit rhHSP27	Mangelmedium mit 30 µg/ml OxPAPC und 4µg/ml rhHSP27, Substanzen direkt in Mangelmedium angesetzt	30 min/ normoxisch
Blockade der TLR2/4 bei Stimulation mit rhHSP27	Mangelmedium mit 30 µg/ml OxPAPC und 4µg/ml rhHSP27, Substanzen direkt in Mangelmedium angesetzt	24 h/ normoxisch + hypoxisch

2.1.7 Primer

Tabelle 2.7: Zur Genotypisierung verwendete Primer.

Primerbezeichnung	Orientierung	Nukleotidsequenz
ANT1 35	<i>forward</i>	5'-GGA TGA TGA TGC AGT CTG G-3'
ANT1 37	<i>reverse</i>	5'-CTA AAG CTG GAA GGC AGT G-3'
pOBGH3	<i>forward</i>	5'-TAG AAG GCA CAG TCG AGG-3'

2.1.8 Antikörper

Tabelle 2.8: Verwendete Antikörper. Antikörper wurden in der Immunpräzipitation (IP), im Westernblot (WB) und für Stimulationsversuche verwendet.

Antikörper	Hersteller	Verwendung/ Blocklösung	Ursprung
unspezifisches Ziegen-IgG	Santa Cruz Biotechnology, Dallas/U.S.A.	IP (5 µg), Stimulation (10 µg/ml)	Ziege
14-3-3	Cell Signaling, Boston/U.S.A.	WB 1:2000 in 3 % BSA	Kaninchen
AKT	Cell Signaling, Boston/U.S.A.	WB 1:750 in 3 % BSA	Kaninchen
ANT 87/3	Dörner, Berlin	WB 1:500 in 5 % MaMiPu	Kaninchen
ANT N19	Santa Cruz Biotechnology, Dallas/U.S.A.	IP (5µg), WB 1:500 in 5 % MaMiPu	Ziege
Anti-Ziege IgG HRP-Konjugat	Dako, Glostrup/DK	WB 1:10.000 in 5 % MaMiPu	Schwein
Anti-Maus IgG HRP-Konjugat	Dako, Glostrup/DK	WB 1:10.000 in 5 % MaMiPu	Ziege
Anti-Kaninchen IgG HRP-Konjugat	Dako, Glostrup/DK	WB 1:10.000 in 5 % MaMiPu	Ziege
a-Tubulin	Merck Millipore, Darmstadt	WB 1:1.000 in 5 % MaMiPu	Maus
CRYAB	Cell Signaling, Boston/U.S.A.	WB 1:1.000 in 3 % BSA	Kaninchen
Erk1/2	Cell Signaling, Boston/U.S.A.	WB 1:250 in 3 % BSA	Kaninchen
HSP27	Santa Cruz Biotechnology, Dallas/U.S.A.	Stimulation (10 µg/ml), WB 1:500 in 3 % BSA	Ziege
HSP60	Cell Signaling, Boston/U.S.A.	WB 1:1.000 in 3 % BSA	Kaninchen
HSP75	Santa Cruz Biotechnology, Dallas/U.S.A.	WB 1:500 in 5 % MaMiPu	Kaninchen
HSP90	Cell Signaling, Boston/U.S.A.	WB 1:1.000 in 3 % BSA	Kaninchen
LDHB	Genetex, Irvine/U.S.A.	WB 1:10.000 in 5 % MaMiPu	Kaninchen
OPA1	Santa Cruz Biotechnology, Dallas/U.S.A.	WB 1:200 in 5 % MaMiPu	Mouse
p-AKT (Ser 473)	Cell Signaling, Boston/U.S.A.	WB 1:1.000 in 3 % BSA	Kaninchen
p-Erk1/2 (Thr 202/204)	Cell Signaling, Boston/U.S.A.	WB 1:1.500 in 3 % BSA	Kaninchen
p-HSP27 (Ser15)	Pierce, Rockford/ U.S.A.	WB 1:500 in 3 % BSA	Kaninchen
p-HSP27 (Ser85)	Pierce, Rockford/ U.S.A.	WB 1:2.000 in 3 % BSA	Kaninchen
TLR2	Novus Biologicals, Littleton/U.S.A.	WB 1:5.000 in 1 % BSA	Kaninchen
TLR4	bioess inc, Woburn/U.S.A.	WB 1:500 in 3 % BSA	Kaninchen
VDAC	Acris, Hiddenhausen	WB 1:1.000 in 5 % MaMiPu	Kaninchen

2.1.9 Kommerzielle Testsysteme

Die verwendeten Reaktionssysteme wurden nach Herstelleranweisung eingesetzt.

Tabelle 2.9: Verwendete Kits.

Produkt	Hersteller
Apo-One® Homogeneous Caspase-3/7 Assay	Promega, Mannheim
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford/ U.S.A.
High Pure PCR Template Preparation Kit	Roche, Mannheim
Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate	Lifetechnologies, Carlsbad/U.S.A.
Rodeo ECL Western Blotting Detection Reagent	Amersham, München

2.1.10 Enzyme

Tabelle 2.10: Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
AmpliTaQ DNA-Polymerase	Applied Biosystems, Darmstadt
Kollagenase Typ 2	Worthington, Lakewood/U.S.A.
RNase A	Serva, Heidelberg
Trypsin	GIBCO/ Invitrogen, Darmstadt

2.2 Methoden

2.2.1 Sterilisation

Lösungen wurden entweder steril filtriert (Porengröße des Filters 0,2 µM) oder im Dampfdruckautoklaven für 20 min bei 120 °C und 10⁵ Pa autoklaviert. Gebrauchswaren wurden autoklaviert, oder bei 220 °C über Nacht (ÜN) erhitzt. Die Desinfektion der Arbeitsflächen und Sterilbänke erfolgte mit 70 %igem Ethanol über eine Einwirkzeit von zwei Minuten. Darüber hinaus erfolgte die Dekontamination der Sterilbänke durch UV-Licht.

2.2.2 Tierexperimentelles Arbeiten

2.2.2.1 ANT1-transgene Ratten

Die in dieser Arbeit verwendeten ANT1-transgenen (ANT1tg) Ratten sind von unserer Arbeitsgruppe generiert und bereits beschrieben worden [43]. Charakteristisch für diese Tiere ist, dass sieben bis neun Kopien des ANT1-Konstruktes genomisch integriert vorliegen. Der ANT1 wird herzspezifisch unter Verwendung eines *α-Myosin Heavy Chain* (αMHC)-Promotors überexprimiert. Zur Zuchtkontrolle wurden Schwanzspitzenbiopsien regelmäßig genotypisiert (Kapitel 2.2.6.1 bis Kapitel

2.2.6.3). Die Versuchstiere wurden in der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin Berlin in einem 12 stündigen Tag-Nacht-Rhythmus unter Einhaltung der deutschen Tierschutzverordnung gehalten. Wasser und Nahrung standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Behördliche Genehmigungen für die Durchführung der tierexperimentellen Arbeiten lagen zu Versuchsbeginn vor (Genehmigungsnummern: T0049/08, G0158/08).

2.2.2.2 Herzentnahme aus adulten Ratten

Adulte, drei Monate alte Ratten wurden mittels CO₂ narkotisiert und anschließend durch Genickbruch getötet. Der Thorax wurde eröffnet und das Herz schnellstmöglich entnommen, in eiskalte Spüllösung überführt und das restliche Blut aus dem Herzen geschwemmt. Anschließend wurden die Vorhöfe und der rechte Ventrikel entfernt und verworfen. Der übrige linke Ventrikel wurde in kleinere Gewebestücke zerteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Danach erfolgte die Lagerung der Gewebe bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung.

2.2.2.3 Präparation neonataler Rattenkardiomyozyten

Die Präparation neonataler Rattenkardiomyozyten (NRCM) erfolgte nach Vetter *et al.* [184] aus ventrikulärem Gewebe ein bis drei Tage alter Ratten. Zunächst wurden die Versuchstiere in 70 %igem Ethanol desinfiziert. Nach Dekapitation erfolgte ein Sternalschnitt bis kurz über das Zwerchfell und die Herzentnahme. Nach jedem Tier wurde das Präparierbesteck in 70 %igem Ethanol desinfiziert und in HBSS gespült. Das Herz wurde schnellstmöglich in eisgekühltes HBSS, welches sich in einer sterilen Petrischale auf Eis befand, überführt. Die Vorhöfe der Herzen wurden abgetrennt und verworfen. Im Anschluss daran wurde das restliche Herz vorsichtig in eine weitere Petrischale mit frischem HBSS überführt und dort geteilt. Danach wurden die Herzstücke in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen mit ca. 1 ml/Herz Trypsinlösung überführt und 18 Stunden bei 4 °C und langsamer Rotationsbewegung (max. 5 rpm) angedaut. Im Anschluss erfolgte die Freisetzung der kardialen Zellen mittels Kollagenaseverdau. Dazu wurden die angedauten Herzhälften zunächst in Fibroblasten-Medium gewaschen, in 20 ml frischem Fibroblasten-Medium in ein Becherglas überführt und langsam für 5 min bei 37 °C gerührt. Anschließend wurde möglichst viel des klaren Überstandes abgenommen und verworfen. Danach wurden den Herzstücken 5 ml Kollagenase-Lösung (1 mg/ml) zugesetzt. Der Ansatz wurde erneut 4 min bei 37 °C langsam gerührt. Der nun nicht mehr klare, Zellen enthaltende Überstand wurde abgenommen und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen auf Eis überführt. Die Gewebestücke wurden erneut mit Kollagenase-Lösung versetzt und der Verdau wiederholt, bis die Stücke vollständig verdaut waren. Im Anschluss wurde die gesammelte Zellsuspension durch eine sterile Mullkompressen in ein weiteres 50 ml Zentrifugenröhrchen filtriert,

um restliche Gewebefragmente abzutrennen und 5 min bei 1.200 rpm (Rotor JA 25-50) zentrifugiert. Die pelletierten Herzzellen wurden in 20 ml Fibroblasten-Medium resuspendiert, in eine Zellkulturflasche überführt und 60 min bei 37 °C und Luft mit 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Die NRCM verblieben im Überstand und konnten nach erfolgter Inkubation in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und erneut 5 min bei 1.200 rpm (Rotor JA 25-50) abzentrifugiert werden. Die Zellen wurden in NRVM-Medium (1 ml/Herz) resuspendiert, ausgezählt (Kapitel 2.2.3.1) und ausgesät. Dazu wurde eine Stocklösung (600.000 Zellen/ml) angesetzt und wie in Tabelle 2.11 dargestellt ausgesät.

Tabelle 2.11: Schema zur Aussaat neonataler Rattenkardiomyozyten.

Plattenformat	Zellzahl/ Well	Volumen Stocklösung [μ l]
6 Well	1.200.000	2.000
12 Well	600.000	1.000
24 Well	300.000	500
96 Well	60.000	100

Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank (37 °C, Luft mit 5 % CO₂) kultiviert, am nächsten Tag zweimal mit HBSS gewaschen, mit frischem Medium versehen und für unterschiedliche Versuche verwendet.

2.2.3 Zellkulturversuche und zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Zellzahlbestimmung

Vor dem Aussäen der Zellen erfolgte die Bestimmung der Zellzahl. Dazu wurden die Zellen 1:1 mit Trypanblau verdünnt. Trypanblau passiert die Zellmembran toter Zellen und färbt diese blau an. Lebende Zellen werden durch die kontrastreiche Lösung besser sichtbar, bleiben aber ungefärbt. Die generierte Zellsuspension wurde auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die Zellen in acht Großquadraten nach Herstelleranweisung ausgezählt (Zellzahl pro Großquadrat: nQ). Danach erfolgte die Berechnung der Zellzahl. Dabei galt:

$$\text{Zellzahl} \left(\text{in} \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right) = (\text{Mittelwert } nQ * 2 * 10^4)$$

2.2.3.2 Hypoxie-Induktion in NRCM

Die Hypoxiekammer wurde vor Beginn mit 70 %igem Ethanol desinfiziert und mit sterilem *Aqua bidest*, welches sich in einer Zellkulturschale befand, bestückt. Im Anschluss wurden die Zellen in der Kammer platziert und diese verschlossen. Danach erfolgte über Befüllungsschläuche der Austausch

der Luft durch sauerstoffarmes Gas (94 % N₂, 5 % CO₂, 1 % O₂), indem die Kammer 4 Minuten lang mit einer Flussrate von 25 l/min gespült wurde. Nach den 4 Minuten wurde die Kammer schnellstmöglich luftdicht verschlossen und für 24 Stunden bei 37 °C im Brutschrank platziert. Die Inkubation der Kontrollgruppen erfolgte unter normoxischen Bedingungen (Luft mit 5% CO₂ entspricht 74,3% N₂, 20% O₂, 5% CO₂, 0,7 % sonstige Luftbestandteile) für die gleiche Dauer im selben Brutschrank. Nach der Inkubation wurden die Platten schnellstmöglich auf Eis positioniert, um den Stoffwechsel zu reduzieren und so die Reoxygenierung zu vermeiden. Die Zellen wurden zweimal mit HBSS gewaschen, die Restflüssigkeit vollständig abgesaugt und die Zellen auf Trockeneis schockgefroren. Die Zellen wurden anschließend bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Die Caspase-messung (Kapitel 2.2.3.5) erfolgte stets direkt nach der Entnahme aus dem Brutschrank mit lebenden Zellen.

2.2.3.3 Generieren von KÜAH zur Stimulation von NRCM

ANT1tg-NRCM wurden 24 Stunden hypoxisch in Mangelmedium kultiviert (Abschnitt 2.2.3.2). Der Kulturüberstand der Zellen wurde in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen auf Eis gesammelt und anschließend für 5 min bei 1200 rpm (Rotor JA 25-50) abzentrifugiert um restliche Zellen unzerstört abzutrennen. Der Überstand wurde anschließend 30 min bei 4 °C und 12.000 rpm (Rotor FA-45-6-30) abzentrifugiert um Zellbruchstücke abzutrennen. Anschließend wurde der generierte Überstand aliquotiert und bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

2.2.3.4 Analyse der interzellulären Kommunikation von NRCM mittels Stimulationsversuchen

Die NRCM wurden wie in Abschnitt 2.2.2.3 vorbereitet und auf Mangelmedium umgesetzt. Nach zweistündiger Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ erfolgte die Stimulation mit rekombinantem, humanem HSP27 (rhHSP27), die Stimulation mit Kulturüberstand von hypoxisch kultivierten ANTtg-NRCM (KÜAH), die Blockade des im KÜAH enthaltenen HSP27 mit spezifischen Antikörpern und die Blockade der kardialen TLR2 und TLR4 mit OxPAPC. Die Reagenzien wurden nach Herstellerangaben oder wie zuvor in der Literatur beschrieben [164;185], in den entsprechenden Medien angesetzt und zwei Stunden dunkel auf Eis vorinkubiert (Tabelle 2.6). Für die Stimulationsversuche wurde das Mangelmedium durch das entsprechende Reagenz ausgetauscht. Je nach Ansatz wurden die Zellen kurzzeitig (30 Minuten) normoxisch, oder langfristig (24 Stunden) hypoxisch oder normoxisch kultiviert (Abschnitt 2.2.3.2). Nach der entsprechenden Kultivierungsdauer wurden die Zellen direkt für das Caspaseassay (Abschnitt 2.2.3.5) verwendet oder schnellstmöglich auf Eis gestellt, zweimal mit HBSS gewaschen, auf Trockeneis schockgefroren und bis zur Proteinextraktion bei -80 °C gelagert.

2.2.3.5 Caspase-3/7-Aktivitätstest

Caspasen sind wichtige Enzyme bei der Initiation des programmierten Zelltodes durch Apoptose und Nekrose und stellen daher einen idealen Marker zur Ermittlung der Zellstabilität dar. Die Aktivität der Caspasen in NRCM wurde daher mit Hilfe des Apo-One® Homogeneous Caspase-3/7 Assays bestimmt. Dazu wurden NRCM in 96-Well-Platten, wie in Kapitel 2.2.2.3 beschrieben, ausplattiert und nach Bedarf mit Stimulationsreagenzien normoxisch oder hypoxisch kultiviert. Nach der Behandlung wurde der Kulturüberstand der Zellen abgenommen. Die Zellen wurden mit 60 µl frischem Mangelmedium und 60 µl APO-Reagenz (frisch angesetzt) je Well versetzt und für 16 h bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln inkubiert. Als Kontrolle wurden das identische Volumen an APO-Reagenz und Mangelmedium in ein leeres Well gegeben und als Hintergrundkontrolle gemessen. Das Apo-Reagenz enthielt einen Lysepuffer und ein Substrat, dass durch die aktiven Caspasen-3/7 in fluoreszierendes Rhodamin 110 umgesetzt wurde. Die Fluoreszenz wurde nach der genannten Inkubationszeit im Spektrofluorometer bei einer Extinktionswellenlänge von 499 nm, einer Emissionswellenlänge von 521 nm und einem *Cut-off* von 515 nm ermittelt. Im Anschluss erfolgte der Abgleich der gemessenen Caspaseaktivität auf die Zellzahl.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten aus Herzgewebe

Die linksventrikulären Herzstücke wurden aus dem Gefrierschrank (-80 °C) entnommen und in flüssigem Stickstoff zum Verarbeitungsort transportiert. Die Gewebestückchen wurden mit Stickstoff in einen Mörser gegeben und in 30-50 mg große Stücke zerschlagen, gewogen, in Eppendorfgefäße überführt, mit dem 10-fachem Volumen an eiskaltem Lysepuffer versetzt und mit einer Schere zerkleinert. Anschließend wurde diese Suspension in einen 1 ml Dounce-Homogenisator überführt und 60 s auf Eis homogenisiert. Das Proteinhomogenat wurde in Eppendorfgefäße überführt und danach eine Stunde auf Eis lysiert. Im Anschluss wurden die Proben 30 min bei 16.000 xg und 4 °C abzentrifugiert. Das unlösliche Zellpellet wurde verworfen und der Überstand für weitere Analysen verwendet. Die Lagerung der Proteinlösungen erfolgte bei -20 °C.

2.2.4.2 Herstellung von Zellextrakten aus NRCM

Die Zellkulturplatten wurden aus -80 °C entnommen und zwischenzeitlich auf Trockeneis gelagert. Die Platten wurden dann einzeln auf 37 °C vorgewärmte Thermokissen gelegt und in jedes Well einer 6-Well-Platte schnellstmöglich 120 µl Lysepuffer pipettiert. Die Zellen wurden anschließend, schnell

und gründlich mittels Zellschaber gelöst, in ein Eppendorfggefäß überführt und 60 min auf Eis lysiert. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden 30 min bei 16.000 xg und 4 °C abzentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde abgenommen und bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

2.2.4.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte mittels BCA Protein Assay Kit der Firma Pierce im 96-Well-Plattenformat. Bei diesem Assay wird abhängig von der Proteinmenge ein rotvioletter Farbkomplex gebildet, dessen Absorption bei 562 nm kolorimetrisch bestimmt wird. Zur Durchführung des Assays wurde ein Standard von 50-1.000 ng/µl BSA in *Aqua bidest.* hergestellt und das BCA-Reagenz frisch vor der Verwendung, nach Angaben des Herstellers angesetzt. 10 µl des Standards, 10 µl *Aqua bidest.* als Blank, 10 µl Proteinlösung bzw. entsprechender Puffer (5-fach verdünnt, Doppelbestimmung) wurden in Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte (MTP) vorgelegt und anschließend mit Hilfe einer Mehrkanalpipette mit 150 µl BCA-Reagenz versetzt. Wenn die Probenzahl sehr gering war, wurde der identische Reaktionsansatz in 1,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Es erfolgte eine 15 minütige Inkubation im Wasserbad bei 60 °C. Nach einer kurzen Auskühlungsphase bei Raumtemperatur erfolgte die Absorptionsbestimmung bei 562 nm im Photometer. Die Proteinmengen wurden anhand des mitgeführten Standards berechnet.

2.2.4.4 Acetonfällung

Um die gesammelten Kulturüberstände hinsichtlich ihres Gehaltes an HSPs zu analysieren, wurden diese zunächst mit Aceton gefällt. Dazu wurden 250 µl KÜ mit 5-fachem Volumenüberschuss (1250 µl) -20 °C kalten Acetons versetzt, zweimal auf Eis invertiert, schnellstmöglich in einen -20 °C kalten Gefrierschrank überführt und dort über Nacht gelagert. Für jede Probe wurden zweimal 250 µl KÜ gefällt. Am nächsten Tag erfolgte zunächst die Zentrifugation einer der beiden Proben für 30 min bei 16.000 xg und 4 °C. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen, der zweite Fällungsansatz der identischen Probe auf das Pellet transferiert und die Probe erneut zu den genannten Bedingungen abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet getrocknet, mit 15 µl 4-fach SDS-Probenpuffer versetzt und wie unter 2.2.4.5 und 2.2.4.6 beschrieben analysiert.

2.2.4.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Analyse der Proteinexpressionsmuster in Geweben oder Zellen oder zur Identifikation von immunpräzipitierten (IP) Proteinen, erfolgte die Durchführung einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Proteine werden dabei anhand ihrer Molekularmasse aufgetrennt. 10-30 µg Protein wurden mit 4-fachem Protein-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 100 °C

denaturiert. Dabei kam es zum Aufbruch der Tertiär- und Sekundärstrukturen. Im Falle von Immunpräzipitationsproben wurden die Beads, an welchen das zu analysierende Protein gebunden war, direkt mit 10 µl 4-fach Protein-Probenpuffer versetzt und ebenfalls 10 min bei 100 °C denaturiert. Die Proben wurden anschließend mit Hilfe von NuPAGE®Novex Bis-Tris-Gelen, welche einen kontinuierlichen Acrylamidgradienten von 4-12 % enthielten, aufgetrennt. Zur Identifizierung der Proteingröße wurde der Proteinstandard NuPAGE®NovexSharp prestained und der NuPAGE®MES SDS Laufpuffer verwendet. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 100 V für ca. 120 min. Im Anschluss an die SDS-PAGE erfolgte der Transfer der Proteine mittels Immuno-Blot.

2.2.4.6 Immuno-Blot

Bei diesem Verfahren werden Proteine aus einem Polyacrylamidgel mit Hilfe eines elektrischen Feldes auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran) übertragen. In dieser Arbeit erfolgte das Immuno-Blotting (Westernblotting, WB) über das Tankblotverfahren, in einer Mini Trans-Blot® Cell von BIO-RAD. Dazu wurden pro Gel zunächst zwei zur Blottingkammer gehörende Schwämmchen und sechs Whatman-Filter in Transferpuffer getränkt. Danach erfolgte die Aktivierung der PVDF-Membran in Methanol. Diese wurde im Anschluss kurz in *Aqua bidest.* gespült und ebenfalls in Transferpuffer überführt. Nach Abschluss der SDS-PAGE, erfolgte der Aufbau des Westernblots in einer Gitterkassette. Dazu wurde einer der vorbereiteten Schwämme, drei Lagen des in Transferpuffer getränkten Filterpapiers, das Gel, im Anschluss die aktivierte PVDF-Membran gefolgt von drei weiteren Lagen vorbereiteten Filterpapiers und dem zweiten Schwämmchen (Abb. 2.1) luftblasenfrei übereinander gelegt und in der Kassette durch Einklemmen fixiert.

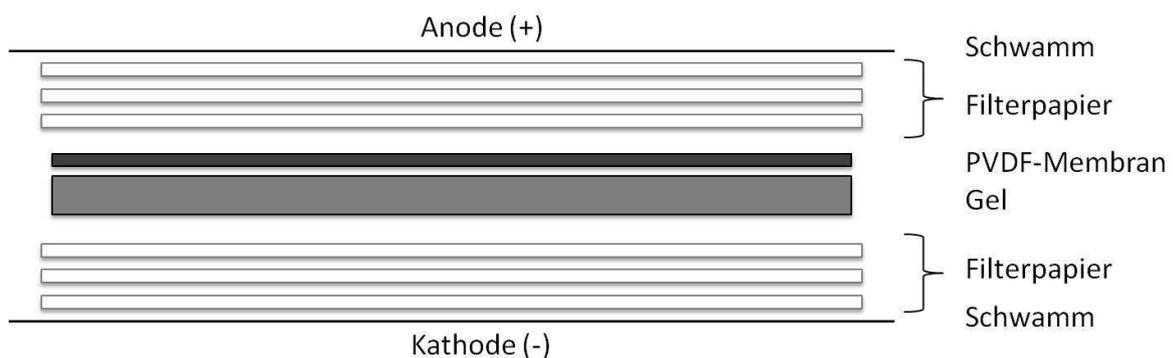


Abb. 2.1: Schematischer Aufbau eines Westernblots. Die Proteine wandern aufgrund ihrer Ladung aus dem Gel in Richtung der Anode und werden so auf die PVDF-Membran übertragen.

Die Kassette wurde in der in Abb. 2.1 gezeigten Orientierung in einem Einsatz platziert, in dessen Wänden Platindrähte als Elektroden eingebaut waren und anschließend nach Herstellerangaben in die Blotkammer eingesetzt. Der Transfer erfolgte in Transferpuffer unter Verwendung eines Kühlakkus für 90 min bei 200 mA. Im Anschluss erfolgte die Detektion der geblotteten Proteine mittels Immunfärbung.

2.2.4.7 Immunfärbung

Mit Hilfe der Immunfärbung werden Proteine, die auf eine PVDF-Membran transferiert wurden, visualisiert. Hierbei bindet ein Primärantikörper an ein spezifisches Protein. Dieser Primärantikörper wird anschließend von einem *Horse-Raddish-Peroxidase* (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper gebunden. Die Kopplung der HRP ermöglicht die Umsetzung eines Substrates, welches Chemilumineszenzsignale abgibt. Diese können detektiert werden und stellen direkt proportional die Menge des gebundenen Proteins dar.

Die Membran wurde aus der Blotkammer direkt in Blocklösung überführt und 1 h bei RT auf einem Schüttler inkubiert, um die restlichen aktivierten Bereiche der PVDF-Membran zu blockieren. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit einem Primärantikörper in entsprechender Verdünnung (siehe Tabelle 2.8), angesetzt in Blocklösung oder BSA, für 1 h bei Raumtemperatur oder ÜN bei 4 °C auf einem Schüttler. Wenn die Verwendung des Antikörpers in BSA erforderlich war, wurde die Membran vor Inkubation mit Primärantikörper zweimal kurz in TBST gewaschen. Nach der Inkubation mit Primärantikörper, wurden die Blots dreimal mit TBST für 10 min bei RT gewaschen. Anschließend erfolgte die Behandlung mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper, welcher 1:10.000 in Blocklösung angesetzt wurde, für 1 h bei RT. Danach erfolgten drei weitere Waschschrte mit TBST für 10 min, welche ebenfalls bei Raumtemperatur durchgeführt wurden. Nach dem Waschen wurde die Membran auf eine Folie überführt, mit 1 ml ECL-Reagenz versehen und 5 min im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Signale mit Hilfe des Las 4.000 mini-Imagers von Fujifilm visualisiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit dem Programm Multi Gauge (Version 3.2). Hierbei wurde die Quantifizierung der Signale in Relation zum aufgetragenen Gesamtprotein durchgeführt. Dazu wurde die Membran nach der Entwicklung der Antikörper eine Minute in Coomassie-Blau-Lösung gefärbt, 30 min mit Entfärber entfärbt, bei RT getrocknet und unter Weißlicht ebenfalls im Las 4.000 mini-Imager visualisiert. Zur Auswertung wurden mindestens fünf Proteinbanden quantifiziert und aufsummiert.

2.2.4.8 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation wurde im Rahmen dieser Dissertation optimiert. Dazu erfolgte die Testung zahlreicher ANT-Antikörper, die Erprobung unterschiedlicher Beadpräparate, die Ermittlung der optimalen Reaktionstemperatur, die Optimierung der Ionenstärke und des pH-Wertes des IP-Puffers, sowie die Anpassung des Antikörper-Proteinmengen-Verhältnisses im Reaktionsansatz. Im Folgenden ist das optimierte Prozedere beschrieben.

Zunächst wurden 100 µg Protein aus Gesamtzellextrakt von Geweben oder NRCM mit 15 µl 10-fach Phosphataseinhibitor, 15 µl 10-fach Proteaseinhibitor und IP-Puffer auf 150 µl aufgefüllt und bis zur

Verwendung auf Eis gelagert. Circa 100 µl Protein A/G-Beads wurden dreimal in 500 µl IP-Puffer gewaschen. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Anschließend wurde die Proteinlösung auf die Beads gegeben, 2,5 h bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler inkubiert und danach 1 min bei 3.000 xg abzentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 5 µg ANT-spezifischem Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Dallas/U.S.A.) versehen und über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Die Beads (PC, *Preclean*-Beads) wurden mit 300 µl IP-Puffer versetzt und im Kühlschrank ÜN gelagert. Am nächsten Tag wurden 100 µl frische Protein A/G-Beads wie beschrieben mit IP-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Protein-Antikörper-Komplex-haltige Lösung vollständig auf die frischen Beads überführt und erneut 2,5 h bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler inkubiert. Danach erfolgte die Zentrifugation der Proben für 1 min bei 3.000 xg. Der Überstand wurde verworfen und die Beads mit 300 µl IP-Puffer versetzt (IP-Beads). Die PC-Beads wurden zusammen mit den IP-Beads dreimal mit jeweils 500 µl IP-Puffer gewaschen und anschließend für Westernblot- oder Massenspektroskopische Analysen eingesetzt.

Zur Kontrolle wurde die IP mit 5 µg unspezifischen Ziegen-IgGs analog zur eigentlichen Immunpräzipitation durchgeführt und ebenfalls mittels Westernblot oder Massenspektroskopie analysiert.

2.2.4.9 Massenspektroskopische Analysen

Die massenspektroskopischen (MS) Analysen wurden von Frau Dr. Elke Hammer vom Institut für funktionelle Genomforschung der Universität Greifswald durchgeführt. Die Beads mit den daran gebundenen Proteinen (Immunpräzipitationsproben, IP: sowohl mit ANT-Antikörper als auch mit unspezifischen Ziegen-IgGs; *Preclean*kontrolle, PC) wurden dreimal in 100 µl Ammoniumbicarbonat-Lösung gewaschen und anschließend 16 h bei RT in 30 µl Trypsinlösung unter Schütteln verdaut. Die Reaktion wurde mit Essigsäure (finale Konzentration: 1 %) abgestoppt. Anschließend erfolgte die Aufreinigung des Überstandes mittels C-18 Spitzen einer Bindungskapazität von 2 µg. Die gebundenen Peptide wurden in zwei Schritten eluiert. Die erste Elution erfolgte mit 5 µl 50 %igem Acetonitril und die zweite mit 5 µl 80 %igem Acetonitril. Im Anschluss wurden beide Elutionsfraktionen gepoolt und auf 1-2 µl Gesamtvolumen eingedampft. Danach wurde die Probe mit 2 %igem Acetonitril in 0,1 %iger Essigsäure auf 20 µl aufgefüllt. Diese Probe wurde dann mittels nano HPLC unter Verwendung einer „C-18 reverse phase nano Säule“ aufgetrennt. Zur Elution wurde ein nicht linearer Acetonitril-Gradient von 0-100 % in 0,1 % Essigsäure mit einer konstanten Flussrate von 0,3 µl/min verwendet. Für die MS/MS abhängige sequenzielle Isolation und Fragmentierung, wurde für die 20 am stärksten auftretenden Ionen in der linearen Ionenfalle, eine kollisionsinduzierte Dissoziation von 10.000 Ionen festgelegt. Der Ausschluss bereits selektierter Proteine erfolgte für die Breite des entsprechenden Peptidpeaks über 60 Sekunden. Die detektierten Signale wurden mit Hilfe der SORCERER/SEQUENT-Suche Proteinen der Swissprot Rattendatenbank (Stand: Oktober/2011) mit

einer Massentoleranz von 10 ppm zugeordnet. Bei der Zuordnung wurden bis zu zwei nicht gespaltene Trypsinsequenzen und eine Methionin-Oxidation als tolerierbare Modifikationen angegeben. Eine Carbamidomethylierung von Cystein wurde als gegebene Modifikation festgelegt. Peptide die via MS/MS identifiziert wurden galten als signifikant, wenn der ladungsabhängige X-Korrelations-Wert für 2-fach geladene Peptide 2,2 und für 3-fach geladene Peptide größer als 3,7 war. Die ermittelten Peptide wurden anschließend mittels *Spectral Counting* quantifiziert.

2.2.4.10 Proteinquantifizierung durch Spectral Counting

In dieser Arbeit wurden ANT-assoziierte Komponenten durch die LC/MS-Analyse von Immunpräzipitierten Proteinen ermittelt. Dazu wurden mehrere Replikate einer Versuchsgruppe immunpräzipitiert und analysiert. Außerdem erfolgte die entsprechende Analyse von Kontrollen, die mit unspezifischen Ziegen-IgGs durchgeführt wurden (siehe Kapitel 2.2.4.8). Zunächst wurde die Anzahl aller Spektren einer Probe aufsummiert und alle Proben innerhalb einer Gruppe über den Mittelwert der Spektrensumme aufeinander angeglichen. Anhand dieser Spektrenzahlen wurde dann kontrolliert, ob die ermittelten Proteine spezifisch oder unspezifisch während der Immunpräzipitation an die Agarosebeads banden. Dazu wurde festgelegt, dass die Summe der Spektren des zugeordneten Proteins, mindestens die Anzahl der Replikate der IP-Proben, in unserem Fall drei, sein musste. Zusätzlich musste der Mittelwert der Spektren der IP-Proben signifikant ($p \leq 0,05$) größer als der Mittelwert der Spektren der PC-Kontrolle sein. Im Anschluss wurden die Spektren jeder PC-Probe von jeder IP-Probe abgezogen. Die so ermittelten Proteine wurden dann mittels *Spectral Counting* quantifiziert [186-188].

Je nach Größe eines Proteins, entstehen unterschiedlich viele Peptide pro Protein bei der Trypsinierung der Proben. Die ermittelte Spektrenanzahl spiegelt daher die Anzahl der Peptide wieder, die einem bestimmten Protein zugeordnet wurden und entspricht nicht der realen Stoffmenge des zugeordneten Proteins. Aus diesem Grund musste die Anzahl der Spektren hinsichtlich der Proteinlänge normalisiert werden, indem die Anzahl der ermittelten Spektren für jedes Protein durch die Anzahl der Aminosäuren des entsprechenden Proteins dividiert wurde (SpC/AS). Des Weiteren wurden die unterschiedlichen Proben mittels eines Normalisierungsfaktors, des NSAF-Wertes, untereinander normalisiert, um unterschiedliche Probengruppen miteinander vergleichen zu können. Bei der Berechnung des Normalisierungsfaktors für jede Probe galt:

$$\text{NSAF} = \frac{\text{SpC/AS}}{\sum \text{SpC/AS}}$$

Die normalisierten Spektren ($SpC_{normalized}$) ermittelten sich dabei nach:

$$SpC_{normalized} = 100 * \log(NSAF + 1)$$

Die so ermittelten normalisierten Spektren können nun untereinander verglichen werden und lassen eine Aussage über die Abundanz der entsprechenden Proteine in der Probe zu. Um zu ermitteln wie viel eines Proteins an ANT bindet, wurden die normalisierten Spektren in Abhängigkeit zu ANT1, also als Prozent von ANT1 ermittelt und so miteinander verglichen. Analog wurde auch mit den IgG-IP-Kontrollen verfahren. Proteine die an die unspezifischen IgGs banden, wurden aus dem Interaktom von ANT1 entfernt.

2.2.5 Analysen mit Hilfe von Online-Datenbanken

2.2.5.1 Proteinanalysen der Massenspektren

Die Zuordnung der mittels MS detektierten Spektren zu Proteinen erfolgte mit Hilfe eines Sequest-Algorithmus (Sorcerer built 4.04, Research Inc. Milpitas, CA, U.S.A.) gegen eine Rattendatenbank (www.ebi.ac.uk/swissprot/) aus dem Jahre 2011. Proteine, die nach dieser Suche als uncharakterisierte Proteine gekennzeichnet und als Komponenten des ANT1-Interaktoms identifiziert wurden, wurden im Mai 2015 nachträglich mit Hilfe von uniprot.org, über die zugeordnete Zugangsnummer aktualisiert und entsprechende Proteinamen zugeordnet. Die Schnittmengen von ANT1-Interaktionspartnern aus Gewebeproben und NRCM, wurden mit Hilfe von „Genevonn“ (genevonn.sourceforge.net) erstellt.

2.2.5.2 Bestimmung der zellulären Lokalisation von Proteinen

Die zelluläre Lokalisation der Komponenten des ANT-Interaktoms wurde mit Hilfe von uniprot.org und www.compartments.jenslab.org unter Auswahl der Spezies *Rattus norvegicus* durchgeführt. Um die Lokalisation nicht mitochondrialer ANT1-Interaktionspartner in anderen Spezies zu ermitteln, erfolgte deren Analyse zusätzlich unter Auswahl der Spezies *Homo sapiens* und *Mus musculus*.

2.2.5.3 Zuordnung von Proteinen zu Signalwegen

Die Zuordnung von Proteinen zu entsprechenden Prozessen sowie die Zuordnung von pro- als auch anti-apoptischen Eigenschaften erfolgte über pantherdb.org, david.abcc.ncifcrf.gov und mit Hilfe von uniprot.org.

2.2.5.4 Proteinclustering

Die Zuordnung Apoptose-regulierender ANT1-Interaktionspartner zu entsprechenden *Clustern* erfolgte mit Hilfe der Protein-Protein-Interaktions-Datenbank STRING (string-db.org). Zur Identifikation der *Cluster* wurde die Zuordnung der Proteine zur Spezies *Rattus norvegicus*, ein mittleres Konfidenzintervall von 0,4 und das *MCL-Clustering (Markov Clustering)* Stufe 5 festgelegt.

2.2.5.5 Sequenzanalysen

Die Ermittlung der Proteinsequenzen von humanem und Ratten-HSP27 erfolgte auf uniprot.org. Diese Sequenzen wurden anschließend mit Hilfe der bei uniprot.org hinterlegten BLAST-Analyse verglichen.

2.2.6 Molekularbiologische Analysen

2.2.6.1 Isolation genomischer DNA aus Schwanzspitzenbiopsien

Um WT- und ANT1tg-Ratten zu genotypisieren, wurden regelmäßig Schwanzspitzenbiopsien (ca. 3 mm) entnommen. Aus diesen wurde dann mittels des *High Pure PCR Template Preparation Kits* von Roche genomische DNA isoliert. Dazu wurden die Schwanzspitzen mit 200 µl Lysepuffer und 40 µl Proteinase-K-Lösung (im Kit enthalten) ÜN bei 55 °C im Wasserbad inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Aufreinigung der DNA nach Angaben des Herstellers. Die Elution der DNA erfolgte mit 200 µl warmem Elutionspuffer. Anschließend wurde 1 µl RNase A zugesetzt, gefolgt von 15 minütiger Inkubation bei RT. 1,5 µl der DNA-Lösung wurde anschließend in die Polymerasekettenreaktion eingesetzt (Kapitel 2.2.6.2) und die restliche DNA-Lösung bei -20 °C gelagert.

2.2.6.2 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction, PCR*) ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten. Mit Hilfe einer thermostabilen Polymerase werden dabei, unter Verwendung spezifischer Primer, die gewünschten DNA-Fragmente synthetisiert. In dieser Arbeit wurde die PCR zur Identifikation der ANT1tg-Ratten verwendet. In dieser PCR wurden drei Primer benutzt. Durch diese Konstellation war es möglich mit nur einem PCR-Ansatz zwischen WT- und ANT1tg-Tieren zu unterscheiden. Das Primerpaar ANT1 35 und ANT1 37 identifizierte die ANT1-transgene DNA durch die Amplifikation eines 350 bp großen Fragmentes, wohingegen durch das Primerpaar ANT1 37 und pOBGH3 in WT-Proben ein 750 bp großes Fragment amplifiziert wurde. Die

WT und ANT1tg Proben ließen sich also eindeutig voneinander unterscheiden. Der Reaktionsansatz wurde wie in Tabelle 2.12 dargestellt zusammen pipettiert.

Tabelle 2.12: Zusammensetzung einer PCR-Reaktion.

Komponente	Volumen in μl
Polymerasepuffer (10x)	2,5
dNTP's	0,5
Primer: ANT1 35	0,5
Primer: ANT1 37	0,5
Primer: pOBGH3	0,5
Wasser	18,75
AmpliTaq-DNA-Polymerase	0,25
DNA	1,5

Die Proben wurden in einem PCR-Thermocycler der Firma PeqLAB amplifiziert. Das verwendete Programm bestand aus dem in Tabelle 2.13 dargestellten Schema.

Tabelle 2.13: PCR Reaktionsschema.

Temperatur in $^{\circ}\text{C}$	Dauer in s	Funktion	Anzahl der Zyklen
120 $^{\circ}\text{C}$	120	Aufheizphase	1x
94 $^{\circ}\text{C}$	180	Aktivierung der Polymerase	1x
94 $^{\circ}\text{C}$	30	Denaturierung der DNA	} 34x
61 $^{\circ}\text{C}$	30	Primeranlagerung	
72 $^{\circ}\text{C}$	60	Elongation	
72 $^{\circ}\text{C}$	600	finale Elongation	1x
4 $^{\circ}\text{C}$	∞	Lagerung	1x

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden im Anschluss mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

2.2.6.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient zur Analyse von DNA-Fragmenten. Diese werden in einem elektrischen Feld mit Hilfe ihrer Ladung transportiert und anhand ihrer Größe aufgetrennt. Die Auftrennung von PCR-Fragmenten (Abschnitt 2.2.6.2) erfolgte in Agarosegelen, welche vor der Verwendung frisch hergestellt wurden. Dazu wurde 1 % w/v Agarose in TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht, mit 1 μl Ethidiumbromid versetzt und anschließend in eine dafür vorgesehene Apparatur gegossen. Ethidiumbromid ist ein DNA-interkalierender Farbstoff, welcher die Visualisierung von DNA unter UV-Licht (254-366 nm) ermöglicht. Er lagert sich in der DNA ein, während diese durch das Gel wandert. 10 μl des PCR-Produktes wurden mit 5 μl DNA-Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Zur Größenabschätzung wurden 3 μl eines 100 bp Markers aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in TAE-Puffer bei einer Spannung von 6-8 V/cm² über eine Dauer von 30-45 min. Nach ausreichender Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte die Detektion der DNA-Banden mit Hilfe einer CCD-Kamera.

2.2.7 Statistische Evaluierungen

Aufgrund der kleinen Probenanzahl ($n < 20$) musste davon ausgegangen werden, dass den Messwerten keine Normalverteilung zugrunde lag. Aus diesem Grund erfolgte der statistische Vergleich zweier Gruppen mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests. Wenn mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen wurden, wurde der einfaktorielle ANOVA bzw. Kruskal-Wallis-Test angewendet. Die statistische Evaluierung erfolgte mit Hilfe von Graphpad Prism 5. Alle Angaben erfolgten als Mittelwert \pm SEM, Signifikanz wurde für p-Werte kleiner als 0,05 postuliert, wobei * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ galt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Interaktom des kardialen Adenin-Nukleotid-Translokators

3.1.1 Analyse des basalen ANT1-Interaktoms mittels IP/MS

Eine myokardiale ANT1-Überexpression beeinflusst nicht nur den Energiestoffwechsel des Herzens, sondern nimmt auch Einfluss auf andere Prozesse wie Apoptose und Signaltransduktion. Wir ermittelten daher, welche Proteine ANT-assoziert vorliegen und in welche Prozesse diese Komponenten involviert sind. Dazu wurden Gewebelysate aus WT-Rattenherzen und Lysate aus isolierten WT-NRCM generiert, der Translokator zusammen mit seinen Interaktionspartnern durch Immunpräzipitation (IP) gefällt und die Präzipitate anschließend mittels Massenspektroskopie (MS) analysiert (siehe Kapitel 2.2.4.9 und 2.2.4.10). Komponenten, die sowohl in den Präzipitaten aus WT-Gewebe, als auch in denen der WT-NRCM vorkamen, stellten das Grundgerüst des ANT-Interaktoms, das sogenannte „Core-Interaktom“, dar. In den Präzipitaten dieser Proben war nur ANT1 nachweisbar, weshalb im Folgenden von einem ANT1-spezifischen Interaktom ausgegangen wird. Dieses Interaktom enthielt 115 Proteine (vollständige Liste siehe Anhang, Tabelle A1). 55 % dieser Komponenten sind laut uniprot.org (Spezies: *Rattus norvegicus*) mitochondrial lokalisiert. Die zweitgrößte Gruppe der ANT1-interagierenden Komponenten bestand mit 21 % aus zytoplasmatischen Komponenten und die drittgrößte Gruppe aus Proteinen des Zytoskelettes (Abb 3.1).

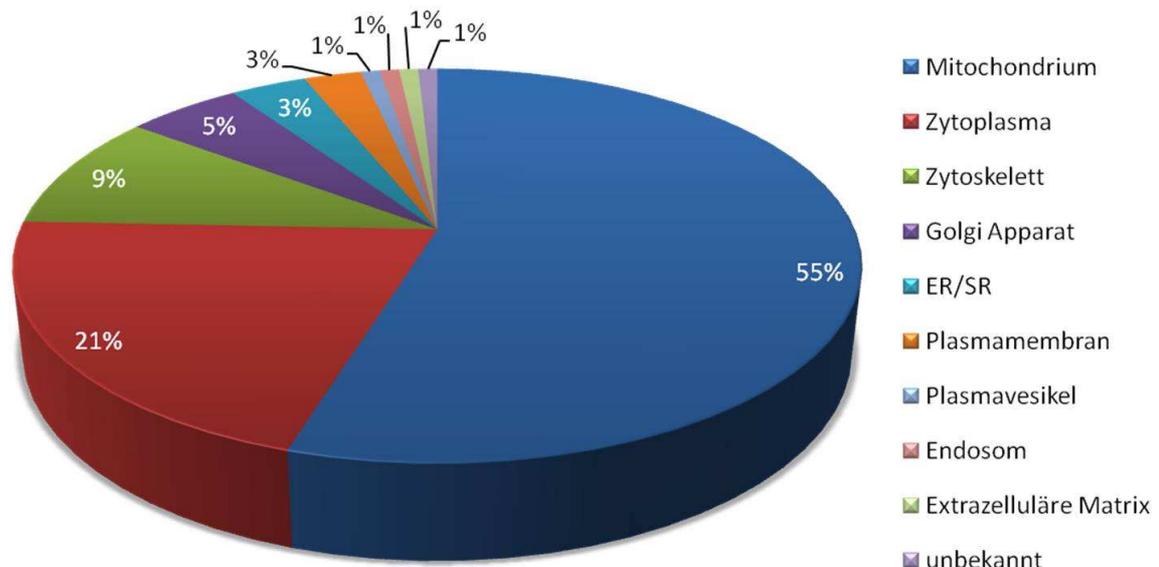


Abb. 3.1: Lokalisation der ANT1-Interaktionspartner. Die Interaktionspartner des ANT1 wurden mittels IP/MS bestimmt und anschließend mit Hilfe von uniprot.org ihrer zellulären Lokalisation zugeordnet. ER Endoplasmatisches Retikulum, SR Sarcoplasmatisches Retikulum.

Die ermittelten Proteine des ANT1-Interaktoms wurden mit Hilfe von Onlineanalysen (uniprot.org, david.abcc.ncifcrf.gov, pantherdb.org) 12 zellulären Prozessen zugeordnet, welche in Tabelle 3.1. dargestellt sind.

Tabelle 3.1: ANT1-assozierte Signalwege in Rattenherzen. Dargestellt sind die ermittelten zellulären Prozesse, die Anzahl der zugeordneten Komponenten und deren Gensymbole. ANT wurde aus Rattenherzgewebe und NRCM immunpräzipitiert und das Präzipitat anschließend massenspektroskopisch analysiert. Die ermittelten Komponenten wurden mit Hilfe von Onlineanalysen den dargestellten zellulären Prozessen zugeordnet. Ein Prozess wurde aufgeführt wenn ihm mindestens drei Komponenten zugeordnet werden konnten.

Zellulärer Prozess	Anzahl der Komponenten	Beteiligte Komponenten [Gen-ID]
Apoptose	18	Acaa2, Actc1, Aldh2, Arf4, Cryab, Gnb2l1, Hk2, Hsp90ab1, Hspb1, Ldha, Opa1, Slc25a3, Slc25a4, Tcp1, Tgm2, Trap1, Vdac2, Ywahz
Oxidative Phosphorylierung	14	Acad9, Atp5a1, Atp5b, Atp5c1, Atp5f1, Atp5h, Cox4i1, Cox5a, Gbas, Ndufa10, Ndufs1, Ndufs3, Sdha, Uqcrc2
Membrantransport	14	Cltc, Dpysl2, Ehd4, Rab1, Rab11b, Rab14, Rab18, Rab2a, TfGdi2, Timm44, Tomm22, Arf4, Hsp90ab1, Tcp1
Proteindegradation	12	Afg3l2, Dnpep, Lonp1, Npepps, Pitrm1, Psmc, Psmc3, Psmc5, Psm14, Psm2, Psm3, Spg7
Muskelkontraktion und Muskelentwicklung	10	Acta1, Actc1, Afg3l2, Ak3, Atp2a2, Casq2, Mybpc3, Myh6, Myh7, Slc25a4
Fettsäuremetabolismus	10	Acaa2, Acadvl, Acat1, Acot2, Acsl1, Aldh2, Aldh9a1, Cpt1b, Got2, Hsd17b10
Glycolyse/Gluconeogenese	10	Aldh2, Aldh9a1, Dld, Hk2, Ldha, Ldhb, Pdha1, Pdhb, Pfk, Ogdh
Aminosäuremetabolismus	8	Aldh2, Aldh9a1, Bckdha, Dld, Got2, Hsd17b10, Mccc2, Ogdh
Tricarbonsäurezyklus	8	Dld, Idh2, Idh3B, Ogdh, Pdha1, Pdhb, Sdha, Sucla2
Mechanische Zellstabilisierung	8	Acta1, Actb, Dpysl2, Dync1h1, Ldb3, Tuba1b, Tubb2c, Tubb5
Proteinfaltung	7	Cct3, Cryab, Hsp90ab1, Hspb1, Lonp1, Tcp1, Trap1
Ca ²⁺ -Signaling	6	Atp2a2, Casq2, Immt, Pygm, Ryr2, Tgm2

Der ANT1 war mit Proteinen assoziiert, die an der Muskelkontraktion, dem Energiestoffwechsel, dem Proteinmetabolismus, am Membrantransport, der mechanischen Zellstabilisierung oder dem Ca²⁺-Signaling beteiligt sind. Auffällig war, dass die größte Gruppe der ANT1-interagierenden Proteine in die Regulation der Apoptose involviert ist. Es fanden sich sowohl pro- als auch anti-apoptotische Komponenten unter den ANT1-Interaktionspartnern (Tabelle 3.2, Einordnung nach uniprot.org).

Tabelle 3.2: Apoptose-assozierte ANT1-Interaktionspartner. Dargestellt ist die Proteinbezeichnung, der Gennamen, die Zugangsnummer, die Gen-ID und der Einfluss der ANT1-Interaktionspartner auf die Apoptose (↑ pro-apoptotisch, ↓ anti-apoptotisch).

Proteinbezeichnung	Gensymbol	Zugangsnummer	Gen-ID	Regulation der Apoptose
<i>3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial</i>	Acaa2	P13437	ACAA2	↓
<i>Actin, alpha cardiac muscle 1</i>	Actc1	P68035	ACTC	↓
<i>Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial</i>	Aldh2	P11884	ALDH2	↓
<i>ADP-ribosylation factor 4</i>	Arf4	P61751	ARF4	↓
<i>Alpha-crystallin B chain</i>	Cryab	P23928	CRYAB	↓
<i>Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1</i>	Gnb2l1	P63245	GBLP	↑

Proteinbezeichnung	Gensymbol	Zugangsnummer	Gen-ID	Regulation der Apoptose
<i>Hexokinase-2</i>	Hk2	P27881	HXK2	↓
<i>Heat shock protein HSP 90-beta</i>	Hsp90ab1	P34058	HS90B	↓
<i>Heat shock protein beta-1</i>	Hspb1	P42930	HSPB1	↓
<i>L-lactate dehydrogenase A chain</i>	Ldha	P04642	LDHA	↑
<i>Isoform 3 of Dynamin-like 120 kDa protein, mitochondrial</i>	Opa1	Q2TA68	OPA1	↑
<i>Inorganic phosphate carrier</i>	Slc25a3	Q6IRH6	Slc25a3	↓
<i>ADP/ATP translocase 1</i>	Slc25a4	Q05962	ADT1	↓
<i>T-complex protein 1 subunit alpha</i>	Tcp1	P28480	TCPA	↓
<i>Tissue-type transglutaminase</i>	Tgm2	Q9WVJ6	Q9WVJ6	↑
<i>Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial</i>	Trap1	Q5XH20	TRAP1	↓
<i>Voltage-dependent anion-selective channel protein 2</i>	Vdac2	P81155	VDAC2	↓
<i>14-3-3 protein zeta/delta</i>	Ywhaz	P63102	1433Z	↓

Die Apoptose regulierenden Komponenten des ANT1-Interaktoms wurden mit Hilfe von string-db.org hinsichtlich bekannter Zusammenhänge untersucht und in Cluster eingeteilt. Mit Ausnahme von OPA1 waren alle Komponenten über Coexistenz, Coexpression, Homologie, experimentelle Daten, Literatur oder weitere Informationen in hinterlegten Datenbanken miteinander assoziiert. Es wurden vier Cluster ermittelt, von denen das größte die Hitzeschockproteine HSP90AB1, HSPB1, TRAP1 und CRYAB sowie kardiales a-Aktin enthielt (Abb. 3.2).

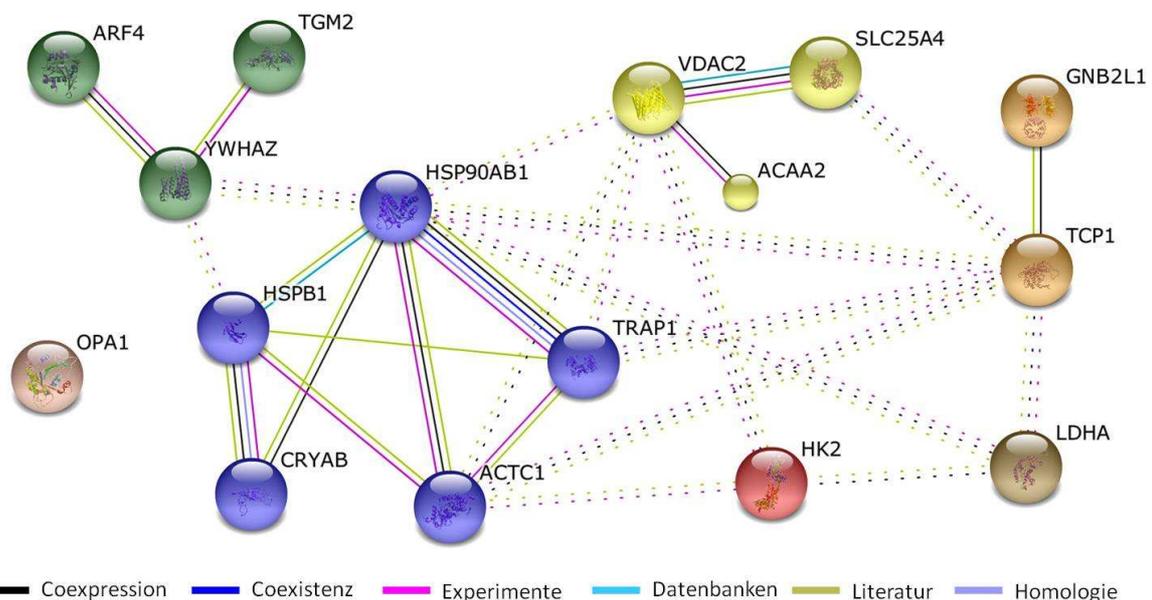


Abb. 3.2: Apoptose regulierende ANT1-Interaktionspartner. Die Apoptose regulierenden ANT1-Interaktionspartner wurden mit Hilfe von string-db.org hinsichtlich bekannter Zusammenhänge untersucht und in MCL-Cluster eingeteilt. Welche Art der Verbindung unter den Komponenten besteht, ist durch die Farbe der Verbindungslinien gekennzeichnet. Gepunktete Linien deuten die Assoziationen an, durchgezogene verdeutlichen die verstärkte Gruppierung einzelner Komponenten. Das zugrunde gelegte mittlere Konfidenzintervall lag bei 0,4.

Durch die Assoziation des ANT1 mit Komponenten, die unabhängig von der Regulation der MPTP in die Apoptose eingreifen, zeichnet sich ab, dass ANT1 auch über die Regulation der MPTP hinaus,

einen Einfluss auf die Apoptose und damit auf das Zellüberleben nimmt. Aus diesem Grund lag der Schwerpunkt in den weiteren Untersuchungen auf den Komponenten der Apoptoseregulation.

3.1.2 Verifizierung des basalen ANT1-Interaktoms mittels IP/WB

Um das Interaktom zu verifizieren, wurden die Immunpräzipitate zusätzlich mittels Westernblot analysiert und einige Komponenten stichprobenartig nachgewiesen. Der Schwerpunkt lag dabei auf Komponenten, die die Apoptose regulieren. Es wurden CRYAB, OPA1, 14-3-3, VDAC, HSP75 und HSP27 analysiert. HSP75 und HSP27 konnten weder in der Negativkontrolle (NK) noch im Präzipitat mittels Westernblot detektiert werden (o. Abb.). Die anderen Komponenten reicherten sich mit ANT1 im Präzipitat an (Abb. 3.3). Zusätzlich wurden auch ANT1-Interaktionspartner der anderen Signalwege begutachtet. Sowohl LDHB, welches eine Rolle in der Glykolyse spielt, als auch α -Tubulin, welches als Komponente des Zytoskelettes zur Zellstabilisierung beiträgt, reicherten sich mit ANT1 im Immunpräzipitat an. Komponenten, wie beispielsweise HSP60, die zuvor nicht mittels MS als „Core-Komponenten“ identifiziert wurden, waren auch bei Analyse mittels Westernblot nicht verstärkt im Präzipitat nachweisbar.

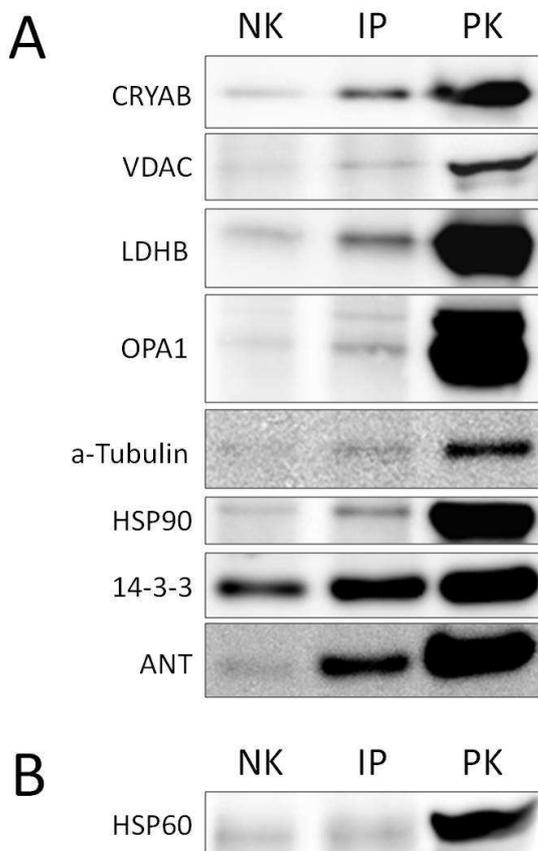


Abb. 3.3: Copräzipitierte Interaktionspartner von ANT1. ANT1 wurde aus Gesamtzellgewebelysaten 3 Monate alter WT-Ratten immunpräzipitiert und das Präzipitat mittels Westernblot hinsichtlich copräzipitierter Interaktionspartner, die (A) zuvor mittels Massenspektroskopie (MS) ermittelt wurden, analysiert. Dargestellt sind die Negativkontrolle (NK), welche das unspezifisch an die Beads gebundene Protein darstellt, die ANT-Immunpräzipitation (IP) und das aufgetragene Gewebelysate (PK). Proteine die zuvor nicht via MS als Komponenten des ANT1-Core-Interaktomes identifiziert wurden, wie beispielsweise HSP60 (B), reicherten sich nicht in der IP-Fraktion an.

3.1.3 Veränderung des ANT1-Interaktoms bei transgener ANT1-OE und Induktion von Hypoxie

Es wurde beobachtet, dass unter Basalbedingungen besonders viele Proteine mit dem ANT1-Interaktom assoziiert waren, die einen Einfluss auf die Apoptose und damit das Zellüberleben ausüben. Dem größten Cluster dieser Komponenten gehörten die Hitzeschockproteine HSP90, HSP75, HSP27 und CRYAB an. Da von HSPs ein enormes Potential zur Sicherung des Zellüberlebens ausgeht, wurden deren Assoziation mit dem ANT1 im Folgenden genauer analysiert. Es stellte sich die Frage, wie sich die HSP-Interaktionen mit dem ANT1-Interaktom unter Hypoxie und bei transgener Überexpression von ANT1 verändern. Aus diesem Grund wurden WT- und ANT1tg-NRCM 24 Stunden normoxisch oder hypoxisch kultiviert und deren Proteinlysate mittels ANT1-IP und anschließender MS analysiert und verglichen. In Abb. 3.4 ist die Menge der HSPs, die an das ANT1-Interaktom bindet, dargestellt.

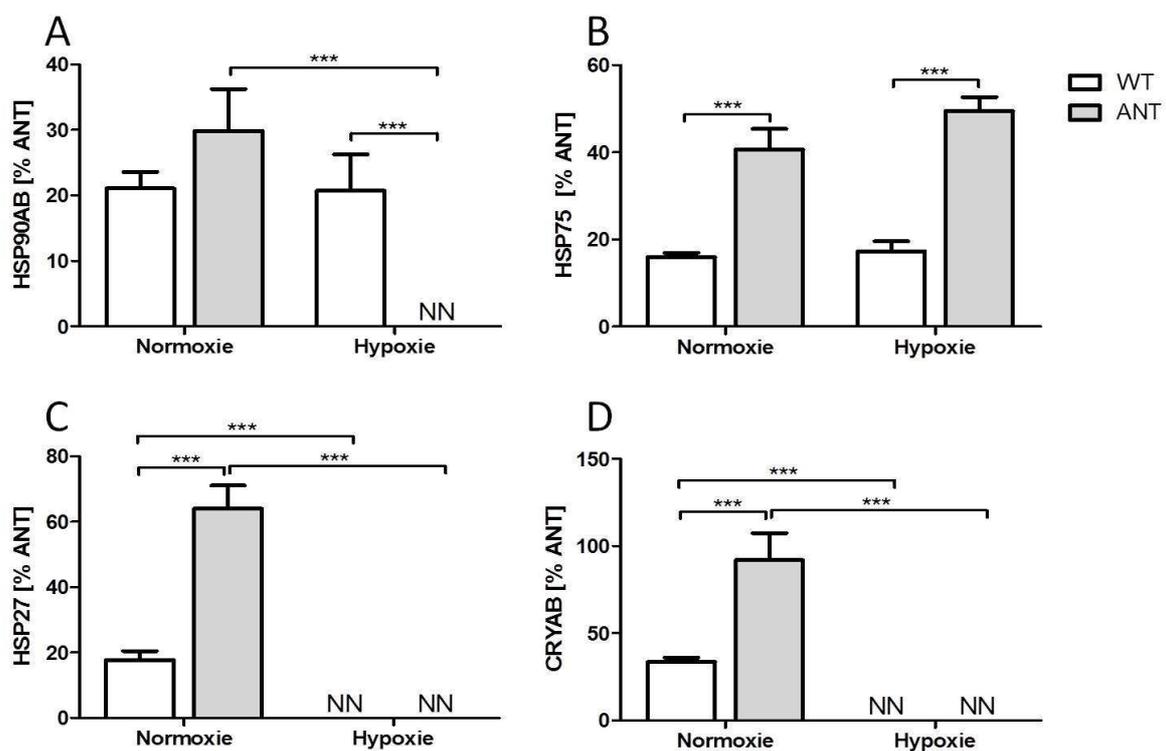


Abb. 3.4: Änderung der Menge der an das ANT1-Interaktom gebundenen HSPs. WT- und ANT1tg-NRCM wurden 24 Stunden normoxisch oder hypoxisch in Vollmedium kultiviert, anschließend Gesamtzellextrakte generiert und diese mittels IP/MS analysiert. Dargestellt ist die normalisierte Spektrenanzahl der Hitzeschockproteine (A) HSP90AB, (B) HSP75, (C) HSP27 und (D) CRYAB in % der normalisierten Spektren von ANT1. NN= nicht nachweisbar; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 zwischen den beiden verbundenen Bedingungen; n=7-9.

Die transgene Überexpression von ANT1 wirkte sich in NRCM unter normoxischen Kultivierungsbedingungen nicht auf die Bindung von HSP90AB an das ANT1-Interaktom aus. Unter Hypoxie war die Bindung von HSP90AB an das ANT1-Interaktom in WT-NRCM, im Vergleich zur normoxischen Kultivierung, ebenfalls unverändert. In ANT1tg-NRCM hingegen war eine Assoziation von HSP90AB mit dem ANT1-Interaktom unter Hypoxie nicht mehr nachweisbar. Die durch Stress

induzierbare Form von HSP90 (HSP90AA), war weder unter normoxischen noch unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen im ANT1-Interaktom vertreten.

Bei ANT1-OE war mehr Trap1, welches auch HSP75 genannt wird, an das ANT1-Interaktom gebunden als in WT-NRCM. Hypoxische Kultivierungsbedingungen wirkten sich in keiner der beiden Zellformen auf die Bindung von HSP75 an das ANT1-Interaktom aus.

Die kleinen HSPs, welche durch Hspb1 (HSP27) und Cryab (CRYAB) vertreten werden, banden unter normoxischen Kultivierungsbedingungen in ANT1tg-NRCM stärker an das ANT1-Interaktom als in WT-NRCM, lösten sich unter Hypoxie jedoch in beiden Zellformen vom Interaktom ab und waren nicht mehr nachweisbar (NN).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die ANT1-OE zu einer vermehrten Bindung der interagierenden Hitzeschockproteine HSP75, CRYAB und HSP27 an das ANT1-Interaktom führte. Darüber hinaus wurden HSP90, HSP27 und CRYAB unter hypoxischen Bedingungen vermehrt von ANT1tg-NRCM aus dem ANT1-Interaktom freigesetzt.

3.2 Proteinexpression der ANT1-interagierenden HSP90, HSP75, CRYAB und HSP27

3.2.1 Expression der ANT1-interagierenden HSPs in NRCM

Um zu überprüfen, ob eine vermehrte Bindung der HSPs an ANT1 in ANT1tg-NRCM auf eine veränderte HSP-Expression zurückzuführen war, wurde der HSP-Proteingehalt in normoxisch und hypoxisch kultivierten NRCM mittels Westernblot ermittelt (Abb. 3.5).

Die Expression von HSP27 war bereits unter normoxischen Kultivierungsbedingungen in ANT1tg-NRCM um 24,5 % erhöht. Hypoxieinduktion führte in keiner der beiden Zellformen zu einer signifikanten Veränderung der HSP27-Menge. Die Expression von CRYAB unterschied sich unter normoxischen Bedingungen nicht zwischen beiden Zelltypen. Hypoxieinduktion führte in beiden Zellformen zu einer Verringerung der CRYAB-Proteinmenge (ANT1tg-NRCM auf 78,99 % und WT-NRCM auf 72,05 % des normoxischen WT).

Auch die Expression von HSP75 unterschied sich nicht zwischen beiden Zellformen bei normoxischer Kultivierung. Unter Hypoxie kam es sowohl in WT- als auch in ANT1tg-NRCM zu einem signifikanten Anstieg der HSP75-Expression auf ca. 200 % des normoxischen WT.

Der HSP90-Gehalt unterschied sich unter normoxischen Kultivierungsbedingungen nicht zwischen WT- und ANT1tg-NRCM. Unter Hypoxie blieb der HSP90-Gehalt in WT-Zellen unverändert. In ANT1tg Zellen kam es hingegen zu einem signifikanten Anstieg von HSP90 auf 120,2 % des normoxischen WT.

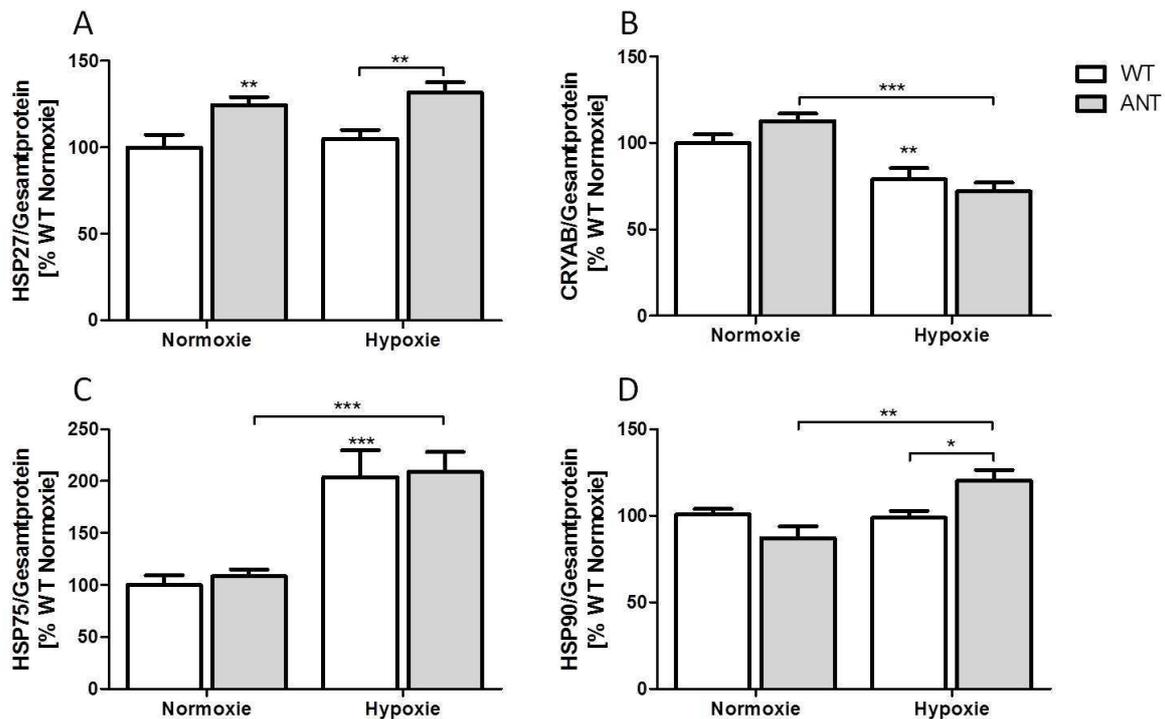


Abb. 3.5: Expression von Hitzeschockproteinen (HSP) unter Basalbedingungen und Hypoxie. Graphische Darstellung von Proteinmengen der Gesamtzellextrakte aus WT- und ANT1tg-NRCM. Die Zellen wurden 24 Stunden unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen kultiviert, Gesamtzellextrakte generiert und diese mittels Westernblot analysiert. Dargestellt sind (A) HSP27, (B) CRYAB, (C) HSP75 und (D) HSP90 in Prozent zum normoxischen WT. Die Quantifizierung erfolgte in Relation zum mit Coomassie gefärbten Gesamtprotein. *p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 vs. WT/Normoxie oder zwischen den beiden verbundenen Bedingungen; n=6-12.

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass die ANT1-OE unter normoxischen Bedingungen mit einer verstärkten HSP27-Expression einherging. Diese wurde unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen aufrechterhalten. Zusätzlich war die ANT1-OE unter Hypoxie mit einem Anstieg der HSP90-Expression assoziiert. Die veränderte Bindungsstärke der HSPs an das ANT1-Interaktom bei ANT1-OE ist nicht auf eine erhöhte Expression dieser Komponenten zurückzuführen. Stattdessen ist das veränderte ANT1-Bindungsverhalten ein durch die ANT1-OE bedingter Prozess.

3.2.2 Hitzeschockproteingehalt von Kulturüberständen neonataler

Rattenkardiomyozyten

Hitzeschockproteine werden unter Stresssituationen wie Hypoxie verstärkt exprimiert. Da eine erhöhte Expression der ANT1-interagierenden HSPs unter Hypoxie in WT-NRCM ausschließlich für HSP75 und in ANT1tg-NRCM nur für HSP75 und HSP90 nachweisbar war, stellte sich die Frage, ob HSPs möglicherweise vermehrt aus hypoxischen Zellen heraus geschleust werden. Jin *et al.* zeigten, dass HSP27 von humanem Myokardium nach Hypoxie sekretiert wurde [164]. Auch die Freisetzung von HSP60 aus adulten Rattenkardiomyozyten unter Hypoxie ist bekannt [183]. Um die Sekretion der ANT1-interagierenden HSPs aus NRCM zu bestätigen, erfolge die Bestimmung des Gehaltes dieser Proteine im Kulturüberstand mit Hilfe spezifischer Antikörper mittels Westernblot. Da die Detektion

der HSPs im Kulturmedium mit Serum wegen zu großer Hintergrundsignale nicht möglich war (o. Abb.), erfolgte die Kultivierung der NRCM in Medium ohne Serum (Mangelmedium, C-).

Hsp27 (Abb. 3.6) wurde von ANT1tg-NRCM bereits unter normoxischen Bedingungen wesentlich stärker (173,6 %) in den Kulturüberstand abgegeben als von WT-NRCM. Hypoxische Bedingungen führten sowohl in WT- als auch in ANT1tg-NRCM zu einem signifikanten Anstieg der HSP27-Proteinmenge im Kulturüberstand. Der größte Proteingehalt an HSP27, war mit 201,1 % des normoxischen WT, im Kulturüberstand hypoxisch generierter ANT1tg-NRCM nachweisbar.

CRYAB wurde ebenfalls vermehrt von ANT1tg-NRCM in den Kulturüberstand freigesetzt. Hypoxie führte jedoch im Vergleich zur normoxischen Kultivierung, in keiner der beiden Zelltypen, zu einer Veränderung der abgegebenen CRYAB-Proteinmenge.

Auch HSP90 wurde von ANT1tg-NRCM unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen verstärkt in den Kulturüberstand abgegeben (Abb. 3.6). Weder in den WT noch den ANT1tg Kardiomyozyten verstärkten hypoxische Bedingungen die Freisetzung von HSP90.

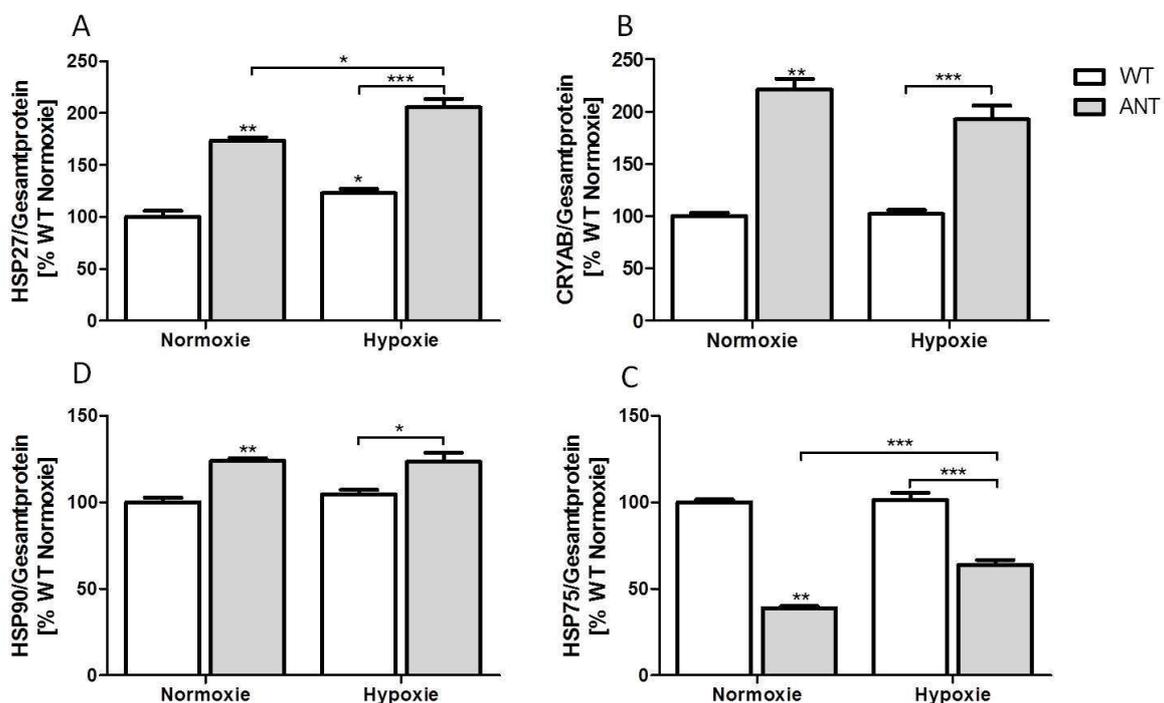


Abb. 3.6: Gehalt von Hitzeschockproteinen im Kulturüberstand (KÜ). WT- und ANT1tg-NRCM wurden 24 Stunden unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen in Mangelmedium ohne Serum kultiviert und die Kulturüberstände anschließend mittels Westernblot analysiert. Dargestellt sind (A) HSP27, (B) CRYAB, (C) HSP90 und (D) HSP75 in Prozent zum normoxischen KÜ der WT-Zellen. Die Quantifizierung erfolgte in Relation zum mit Coomassie gefärbten Gesamtprotein. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 vs. WT/Normoxie oder zwischen den beiden verbundenen Bedingungen; n=4-11.

HSP75 hingegen wurde sowohl unter Basalbedingungen (38,8 % des WT) als auch bei hypoxischer Kultivierung (63,8 % des normoxischen WT) in geringerem Maße von ANT1tg-NRCM als von WT-NRCM in den Kulturüberstand freigesetzt (Abb. 3.6). Hypoxische Bedingungen führten in

WT-NRCM zu keiner Veränderung der HSP75-Proteinmenge im Kulturüberstand. Bei ANT1tg-NRCM kam es hingegen zu einem leichten Anstieg der abgegebenen Menge an HSP75.

Es lässt sich also festhalten, dass HSP75 im Gegensatz zu HSP27, CRYAB und HSP90, weder unter normoxischen, noch unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen vermehrt von ANT1tg-NRCM in den Kulturüberstand freigesetzt wurde. Dies deutet auf eine aktive Sekretion der HSPs und nicht auf eine unspezifische Freisetzung durch Zellyse hin. HSP27, CRYAB und HSP90 wurden zwar unter normoxischen Bedingungen vermehrt von ANT1tg-NRCM in den Kulturüberstand freigesetzt, eine weitere Erhöhung der HSP-Proteinmenge im Kulturüberstand hypoxisch kultivierter NRCM wurde jedoch nur für HSP27 beobachtet.

3.2.3 Proteinexpression ANT1-interagierender HSPs bei Kultivierung von NRCM in Mangelmedium

Da die Analyse der sekretierten HSPs nur bei Kultivierung in Mangelmedium erfolgen konnte, wurde kontrolliert, ob sich deren Proteinexpression unter Serumangel von der bei Kultivierung in Vollmedium (siehe Abb. 3.5) unterschied. Die Detektion der Proteine erfolgte im Westernblot mit Hilfe spezifischer Antikörper.

Auffällig war, dass die Hypoxieinduktion bei Kultivierung in Mangelmedium zu einer Abnahme der HSP90-Expression in beiden Zellformen führte. Dennoch enthielten hypoxisch kultivierte ANT1tg-NRCM mehr HSP90 als vergleichbar kultivierte WT-NRCM (Abb. 3.7). Unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen ging die ANT1-OE demnach, unabhängig vom Serumgehalt des Kulturmediums, mit einer größeren Menge an intrazellulärem HSP90 einher.

Die Expression von HSP75 wurde sehr stark durch den Serumgehalt des Kulturmediums beeinflusst. Bereits unter normoxischen Kultivierungsbedingungen kam es in ANT1tg-NRCM zu einer vermehrten Expression von HSP75. Diese blieb in ANT1tg-NRCM unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen aufrechterhalten, wohingegen es in WT-NRCM bei Hypoxie und gleichzeitigem Serumangel zu einer Abnahme der HSP75 Proteinmenge kam. Bei Kultivierung in Vollmedium unterschied sich die HSP75-Expression nicht zwischen beiden Zelltypen. Hypoxieinduktion führte in WT- und in ANT1tg-NRCM zu einem Anstieg der HSP75-Expression.

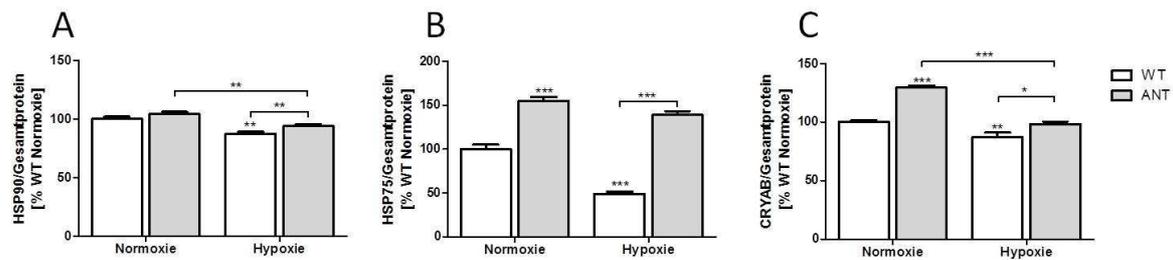


Abb. 3.7: Expression von Hitzeschockproteinen unter Basalbedingungen und Hypoxie. Graphische Darstellung von Proteinmengen der Gesamtzellextrakte aus WT- und ANT1tg-NRCM. Die Zellen wurden 24 Stunden unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen kultiviert, Gesamtzellextrakte generiert und diese mittels Westernblot analysiert. Dargestellt sind (A) HSP90, (B) HSP75 und (C) CRYAB in Prozent zum normoxischen WT. Die Quantifizierung erfolgte in Relation zum mit Coomassie gefärbten Gesamtprotein. *p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 vs. WT/Normoxie oder zwischen den beiden verbundenen Bedingungen; n=8-16.

Die Expression von CRYAB bei Kultivierung in Mangelmedium wich leicht von der Expression in Vollmedium ab. ANT1tg-NRCM zeigten bei Kultivierung in Mangelmedium eine erhöhte CRYAB-Expression (Abb. 3.7). Diese trat in Vollmedium nur tendenziell, nicht aber signifikant auf. Auch unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen enthielten ANT1tg-NRCM mehr CRYAB als WT-NRCM.

Der HSP27-Proteingehalt unterschied sich bei Kultivierung in Mangelmedium nur minimal zu der in Vollmedium. Lediglich in WT-NRCM kam es unter Hypoxie zu einer Verringerung der HSP27-Expression (Abb. 3.8). Damit zeigten ANT1tg-NRCM sowohl bei normoxischer als auch bei hypoxischer Kultivierung eine höhere HSP27-Expression als WT-NRCM.

Die Expression der HSPs bei Kultivierung in Mangelmedium entsprach demnach nicht dem Gehalt der im KÜ detektierten HSPs. Dies ist ein weiteres Indiz für die aktive Sekretion der ANT1 interagierenden HSPs durch NRCM. Darüber hinaus wird ersichtlich, dass ANT1tg-NRCM auf Stresssituationen wie Serumangel, mit erhöhter HSP-Expression reagieren. Auch unter Hypoxie ging die ANT1-OE mit einer vermehrten HSP-Expression in den NRCM einher.

3.2.4 Phosphorylierungszustand von HSP27 in ANT1tg-NRCM

Wie bereits erwähnt, wurden HSP27, CRYAB und HSP90 unter normoxischen Bedingungen vermehrt von ANT1tg-NRCM in den Kulturüberstand freigesetzt. Eine weitere Erhöhung der HSP-Proteinmenge im Kulturüberstand hypoxisch kultivierter NRCM wurde jedoch nur für HSP27 beobachtet. Da gerade phosphoryliertem HSP27 eine Rolle bei der ischämischen Präkonditionierung zugeordnet wird [189-191], wurde zusätzlich zur Proteinexpression auch der Phosphorylierungszustand von HSP27 ermittelt (Abb. 3.8). Durch den Phosphorylierungszustand von HSP27 wird die Funktion und der Oligomerisierungszustand dieses Proteins beeinflusst.

Die Phosphorylierung von HSP27 an Serin 15 (pSer15Hsp27) war in ANT1tg Kardiomyozyten bereits unter Normoxie um 85,2 % erhöht. Unter Hypoxie stieg die Phosphorylierung in beiden Zellformen an. In normoxisch kultivierten ANT1tg-NRCM war die p15HSP27/HSP27-Ratio im Vergleich zu WT-NRCM erhöht. Unter Hypoxie stieg das Verhältnis von p15HSP27/HSP27 in beiden Zelltypen an. Da WT-NRCM sowohl eine verringerte Expression von HSP27 als auch eine erhöhte Phosphorylierung an Serin 15 zeigten, stieg die sich daraus ergebende Ratio sehr stark (auf 294,1 % des normoxischen WT) an und war signifikant höher als die Ratio in ANT1tg-NRCM (erhöht auf 216,2 %).

Die Phosphorylierung an Serin 85 (p85Hsp27) war in ANT1tg-NRCM bereits unter normoxischen Bedingungen erhöht (um 67,5 %). Unter Hypoxie stieg diese in WT-NRCM auf 168,5 %, in ANT1tg Kardiomyozyten sogar auf 337,5 % des normoxischen WT an.

Für das Verhältnis von p85HSP27/HSP27 (Abb. 3.8/E) ergab sich für ANT1tg unter Normoxie eine Erhöhung von 32,5 % im Vergleich zum WT. Unter Hypoxie erhöhte sich das Verhältnis in WT- um 134,7 %, in ANT1tg-NRCM stieg es auf 285,1% des normoxischen WT (um 152,6 %) an. Dies war vor allem auf die, in ANT1tg-NRCM sehr starke, Phosphorylierung zurückzuführen.

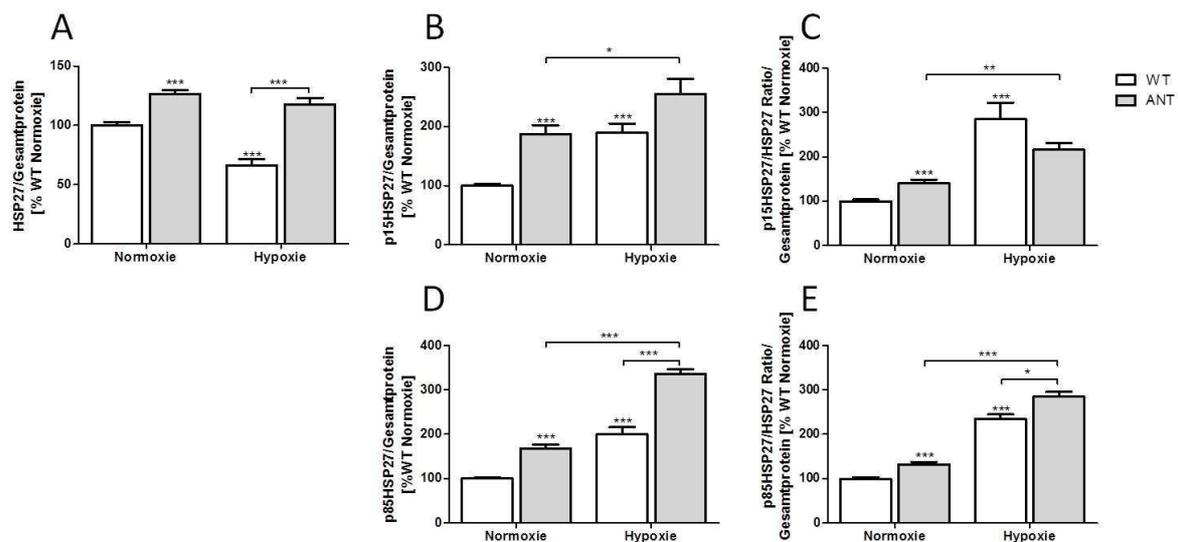


Abb. 3.8: HSP27-Expression und -Aktivierung unter Basalbedingungen und Hypoxie. Graphische Darstellung von Proteinmengen der Gesamtzellextrakte aus WT- und ANT1tg-NRCM. Die Zellen wurden 24 Stunden unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen kultiviert, Gesamtzellextrakte generiert und diese mittels Westernblot analysiert. Dargestellt sind (A) Gesamt-HSP27, (B) p15HSP27, (C) das p15HSP27/HSP27-Verhältnis, (D) p85HSP27 und (E) das p85HSP27/HSP27-Verhältnis in Prozent zum normoxischen WT. Die Quantifizierung erfolgte in Relation zum mit Coomassie gefärbten Gesamtprotein. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 vs. WT/Normoxie oder zwischen den beiden verbundenen Bedingungen; n=8-16.

Es lässt sich also festhalten, dass die transgene ANT1-OE neben der verstärkten Expression von HSP27 mit einer vermehrten Phosphorylierung an Ser15 und Ser85 assoziiert war. Die Phosphorylierung war für beide Phosphorylierungsstellen in ANT1tg-NRCM unter Hypoxie am höchsten.

3.3 Caspase 3-/7-Aktivität

Es stellte sich die Frage, ob eine mit der ANT1-OE einhergehende, verstärkte Expression und Sekretion der HSPs, speziell unter hypoxischen Bedingungen, mit einer zellstabilisierenden Wirkung und damit verringerter Zellzerstörung einhergeht. Aus diesem Grund wurde die Caspase-3/7-Aktivität, als Marker für apoptotischen und nekrotischen Zelltod, in normoxisch und hypoxisch kultivierten NRCM ermittelt (Abb. 3.9).

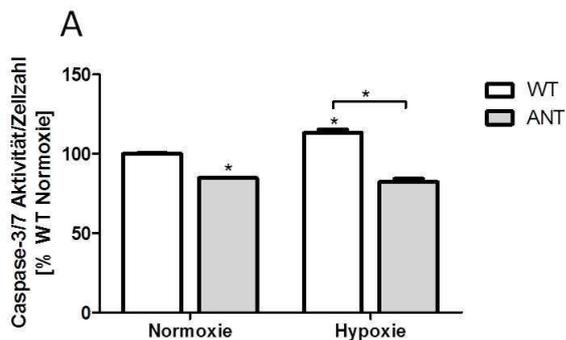


Abb. 3.9: Caspase-3/7Aktivität in NRCM unter Hypoxie. WT- und ANT1tg-NRCM wurden 24 Stunden normoxisch oder hypoxisch in Mangelmedium kultiviert und anschließend mittels Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay der Firma Promega analysiert. Dargestellt ist die Caspase-3/7 Aktivität, normalisiert auf die Zellzahl, in Prozent zum normoxischen WT. * $p < 0,05$ vs. WT/Normoxie, $n=4$.

Bereits unter normoxischen Bedingungen war in ANT1tg-NRCM eine geringere Caspaseaktivierung zu beobachten. Hypoxieinduktion führte in WT-NRCM zu einem Anstieg der Caspaseaktivität auf 113,2 % des normoxischen WT. In ANT1tg-NRCM hingegen blieb die Caspase-3/7 Aktivierung unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen unverändert. Diese Ergebnisse zeigen, dass die ANT1-OE sowohl bei Serumangel als auch bei Hypoxie, mit einer geringeren Caspaseaktivierung und damit verringertem intrazellulärem Stress einhergeht.

3.4 Einfluss sekretierter Proteine auf kardioprotektive Signalwege

ANT1tg-NRCM geben Hitzeschockproteine in ihre Umgebung ab. Unter Hypoxie wurde dies vermehrt für HSP27 beobachtet. Um zu überprüfen, ob NRCM durch Komponenten des Kulturüberstandes die Aktivierung zellprotektiver Signalwege induzieren, wurden WT- und ANT1tg-Zellen mit Kulturüberstand von hypoxisch kultivierten ANT1tg-NRCM (KÜAH) inkubiert. Zudem wurde in Parallelversuchen das freigesetzte HSP27 mit Hilfe spezifischer Antikörper blockiert und zusätzlich ein Stimulationsversuch mit rekombinantem, humanem HSP27 (rhHSP27) durchgeführt. Die Stimulationsversuche erfolgten für beide Genotypen über 30 Minuten unter normoxischen und für 24 Stunden unter normoxischen sowie hypoxischen Kultivierungsbedingungen in Mangelmedium.

Die Detektion der Expression ANT1-interagierender, protektiver Hitzeschockproteine wie HSP90, HSP75, CRYAB und HSP27 sowie die Detektion der Aktivierung der protektiven Kinasen AKT und Erk1/2 erfolgte durch spezifische Antikörper mittels Westernblot.

3.4.1 Einfluss von Komponenten eines hypoxisch generierten Überstandes auf die Expression von HSP90, HSP75 und CRYAB in NRCM

Weder die kurzzeitige noch eine 24 stündige Inkubation mit KÜAH oder rhHSP27 führte in NRCM zu einer relevanten Veränderung der HSP90-Proteinexpression (o. Abb.).

Die kurzzeitige Stimulation mit KÜAH reduzierte die HSP75-Proteinmenge in ANT1tg-NRCM um 41,1 %. Diese konnte nicht durch die Antikörper-Blockade des im KÜAH enthaltenen HSP27 aufgehoben werden und ist daher nicht auf im KÜAH enthaltenes HSP27 zurückzuführen (o. Abb.). Auch die kurzzeitige Stimulation von ANT1tg-NRCM mit rhHSP27 führte zu einer vergleichbaren Reduktion der HSP75-Proteinmenge um 39,6 %. In WT-NRCM wurde die HSP75-Expression nicht durch die 30 minütige Stimulation mit KÜAH oder rhHSP27 beeinflusst (Abb. 3.10).

Eine 24 stündige Stimulation mit KÜAH hatte weder unter normoxischen, noch unter hypoxischen Bedingungen einen Einfluss auf die HSP75-Proteinexpression in einer der beiden Zellformen. Die 24 stündige Stimulation mit rhHSP27 hingegen führte sowohl in WT- (28 %) als auch in ANT1tg-NRCM (122,5 %) zu einem signifikanten Anstieg der HSP75-Proteinmenge (Abb. 3.10).

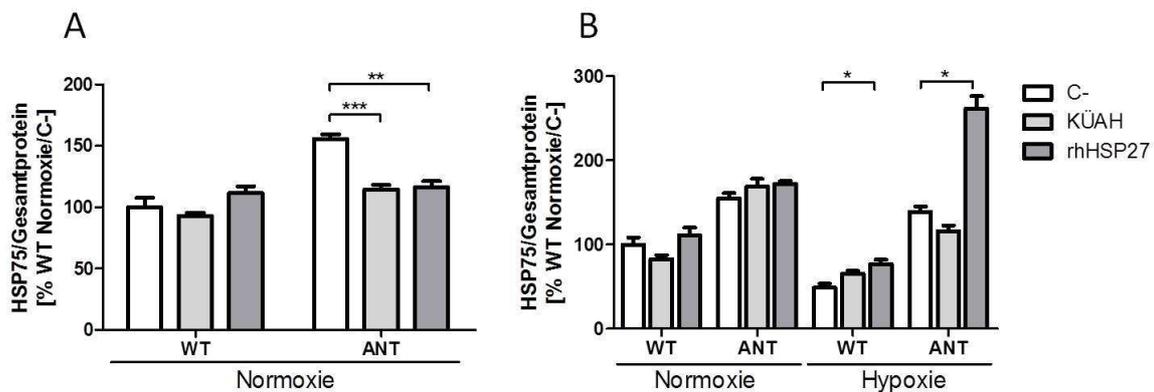


Abb. 3.10: HSP75-Expression in NRCM bei Stimulation mit KÜAH oder rhHSP27. Die Zellen wurden (A) 30 Minuten unter normoxischen oder (B) 24 Stunden unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen mit Mangelmedium (C-), Kulturüberstand von 24 Stunden hypoxisch kultivierten ANT1tg-NRCM (KÜAH) oder rekombinantem, humanem HSP27 (rhHSP27) inkubiert. Anschließend wurden Gesamtzellextrakte generiert und diese mittels Westernblot analysiert. Dargestellt ist die HSP75-Proteinmenge in Prozent zum normoxischen WT in C-. Die Quantifizierung erfolgte in Relation zum mit Coomassie gefärbten Gesamtprotein. Die statistische Auswertung für diese Abbildung erfolgte nur für den Vergleich der unterschiedlichen Stimulationsreagenzien miteinander. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 vs. normoxischem WT/C-; n=4-12.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Stimulation mit KÜAH keine Erhöhung der HSP75-Expression induzierte. Eine Stabilisierung der NRCM durch eine Kulturüberstand-vermittelte Expressionserhöhung von HSP75 ist demnach nicht möglich. RhHSP27 hingegen induzierte unter hypoxischen Bedingungen in beiden Zellformen eine Erhöhung des HSP75-Proteingehaltes. WT-NRCM reagierten dabei wesentlich schwächer auf die Stimulation als ANT1tg-NRCM. Die erhöhte HSP75-Expression in ANT1tg-NRCM ist demnach nicht als eine Reaktion auf die Stimulation mit Komponenten des KÜAH

zu interpretieren, sondern muss durch andere Mechanismen, die mit der ANT1-OE einhergehen, induziert werden.

Bei kurzzeitiger Stimulation mit KÜAH kam es in ANT1tg-NRCM zu einem leichten Anstieg der CRYAB-Expression um 17,5 %. Dieser Effekt wurde durch HSP27-Antikörper neutralisiert (o. Abb.). Die 30 minütige Stimulation mit rhHSP27 hatte jedoch in keiner der beiden Zelltypen einen Einfluss auf die CRYAB-Expression. Eine langzeitige Stimulation mit KÜAH hatte unter normoxischen Kultivierungsbedingungen keinen signifikanten Effekt auf die CRYAB-Expression, unter Hypoxie verringerte sich diese jedoch in beiden Zellformen. Die Stimulation mit rhHSP27 hingegen hatte einen anderen Effekt. Bei langzeitiger Kultivierung kam es, im Vergleich zur Kultivierung in Mangelmedium unter normoxischen Bedingungen, in ANT1tg-NRCM zu einer deutlichen Erhöhung der CRYAB-Menge. Unter hypoxischen Bedingungen war diese in WT- und ANT1tg-NRCM erhöht (Abb. 3.11). Auffällig war, dass bei Stimulation mit rhHSP27 die CRYAB-Expression unter Hypoxie in beiden Zelltypen etwa jener unter Normoxie in Mangelmedium auftretenden Basalexpression entsprach. Die Kultivierung mit rhHSP27 verhindert demnach in beiden Zellformen den Hypoxie-induzierten Verlust der CRYAB-Proteinmenge.

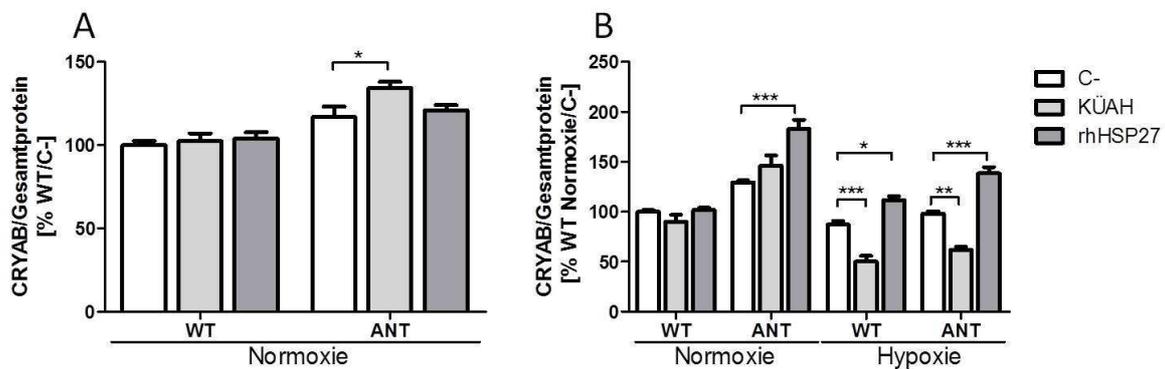


Abb. 3.11: CRYAB-Expression in NRCM bei Stimulation mit KÜAH oder rhHSP27. Die Zellen wurden (A) 30 Minuten unter normoxischen oder (B) 24 Stunden unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen mit Mangelmedium (C-), Kulturüberstand von 24 Stunden hypoxisch kultivierten ANT1tg-NRCM (KÜAH) oder rekombinantes, humanem HSP27 (rhHSP27) inkubiert. Anschließend wurden Gesamtzellextrakte generiert und diese mittels Westernblot analysiert. Dargestellt ist die CRYAB-Proteinmenge in Prozent zum normoxischen WT in C-. Die Quantifizierung erfolgte in Relation zum mit Coomassie gefärbten Gesamtprotein. Die statistische Auswertung für diese Abbildung erfolgte nur für den Vergleich der unterschiedlichen Stimulationsreagenzien miteinander. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 vs. normoxischem WT/C-; n=4-12.

Die Stimulation mit rhHSP27 erhöhte die Menge an CRYAB unter hypoxischen Bedingungen in beiden Zelltypen. Dieser Effekt trat bei Kultivierung mit KÜAH jedoch nur bei kurzzeitiger Stimulation in ANT1tg-NRCM auf. Die Stimulation der CRYAB-Expression durch HSP27 im Kulturüberstand, war in ANT1tg-NRCM jedoch möglich.

3.4.2 Einfluss von Komponenten eines hypoxisch generierten Überstandes auf die Expression und den Aktivierungszustand von HSP27 in NRCM

Die Funktion von HSP27 ist abhängig vom Phosphorylierungszustand des Proteins. Es wurde beschrieben, dass vorwiegend unphosphoryliertes HSP27 Chaperonaktivität zeigt. Phosphoryliertes HSP27 hingegen stabilisiert das Zytoskelett, wandert in den Zellkern und induziert dort die Expression von Proteinen. Andererseits aggregiert es an dieser Stelle aber auch wieder und übernimmt dort Chaperonfunktion [140;141;152]. Außerdem übt HSP27 in den unterschiedlichsten Phosphorylierungszuständen Einfluss auf die Apoptose aus [192]. Das HSP27 der Ratte besitzt zwei bedeutende Phosphorylierungsstellen, ein Serinrest an Position 15 (Ser15) und einen an Position 85 (Ser85) [193]. Aus diesem Grund wurde der Phosphorylierungszustand an diesen beiden Serinresten während der Stimulationsversuche untersucht.

WT-NRCM zeigten bei der kurzzeitigen Stimulation mit KÜAH keine Veränderung in ihrer HSP27-Expression (Abb. 3.12). In ANT1tg-NRCM hingegen kam es zu einer Erhöhung der HSP27-Proteinmenge. Die Phosphorylierung von HSP27 war bei kurzzeitiger Stimulation mit KÜAH in beiden Zelltypen identisch reguliert. Die Phosphorylierung an Ser15 blieb unverändert und wirkte sich daher nicht auf die p15HSP27/HSP27-Ratio aus. Die Phosphorylierung an Ser85 war in beiden Zellformen erhöht. In WT-NRCM kam es daher zu einer erhöhten p15HSP27/HSP27-Ratio. In ANT1tg-NRCM änderte sich das Verhältnis von p85HSP27/HSP27 nicht, da sowohl die HSP27-Expression, als auch

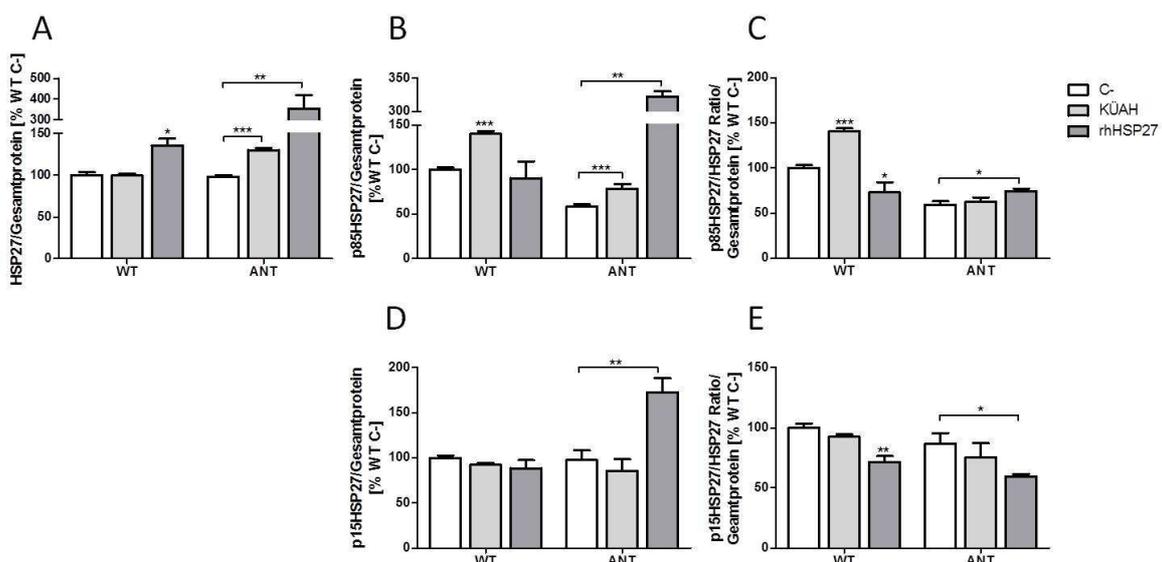


Abb. 3.12: HSP27-Expression und -Aktivierung in NRCM bei kurzzeitiger Stimulation mit Komponenten des KÜAH. Die Zellen wurden 30 Minuten unter normoxischen Bedingungen mit Mangelmedium (C-), Kulturüberstand von 24 Stunden hypoxisch kultivierten ANT1tg-NRCM (KÜAH) oder rekombinantem humanem HSP27 (rhHSP27) inkubiert. Anschließend wurden Gesamtzellextrakte generiert und diese mittels Westernblot analysiert. Dargestellt sind (A) Gesamt-HSP27, (B) p85HSP27, (C) das p85HSP27/HSP27-Verhältnis, (D) p15HSP27 und (E) das p15HSP27/HSP27-Verhältnis in Prozent zum normoxischen WT in C-. Die Quantifizierung erfolgte in Relation zum mit Coomassie gefärbten Gesamtprotein. Die statistische Auswertung für diese Abbildung erfolgte nur für den Vergleich der unterschiedlichen Stimulationsreagenzien miteinander. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 vs. normoxischem WT/C-; n=4-17.

p85HSP27 zunahm. Die kurzzeitige Stimulation mit rhHSP27 war nicht komplett identisch zu der mit KÜAH, zeigte aber eine vergleichbare Regulationsrichtung. Die HSP27-Proteinexpression war in beiden Zellformen bei 30 minütiger Stimulation mit rhHSP27 erhöht, allerdings war der Anstieg in ANT1tg-NRCM wesentlich stärker (WT: 23,9 % vs. ANT1tg: 254,8 %). Die Phosphorylierung an HSP27 in WT-NRCM war in diesem Ansatz unverändert, was zur Abnahme der p15HSP27/HSP27-Ratio und der p85HSP27/HSP27-Ratio führte (Abb. 3.12). In ANT1tg-NRCM kam es an beiden Phosphorylierungsstellen zu einer verstärkten Phosphorylierung. Da diese an Ser15 im Vergleich zur Proteinexpression jedoch weniger erhöht war, kam es zu einer verringerten p15HSP27/HSP27-Ratio. Die Phosphorylierung an p85HSP27 war in ANT1tg-NRCM um 264 % erhöht, was sich auf die Ratio mit einem minimalen Anstieg auswirkte. Auch auf die kurzzeitige Stimulation mit rhHSP27 reagierten WT-NRCM schwächer als ANT1tg-NRCM. Auch hier konnten die Effekte des KÜAH größtenteils durch die Stimulation mit rhHSP27 reproduziert werden. Lediglich die verstärkte Phosphorylierung an Ser85 in WT-NRCM schien nicht durch im KÜAH enthaltenes HSP27 induziert worden zu sein.

Auf die langzeitige Stimulation mit KÜAH reagierten ANT1tg-NRCM sensitiver als WT-NRCM (Abb. 3.13). WT Zellen zeigten unter normoxischen Kultivierungsbedingungen keine signifikanten Veränderungen in ihrem HSP27-Signaling. Lediglich unter Hypoxie führte die Stimulation mit KÜAH zu einer Reduktion der p15/p85HSP27 zu HSP27-Ratios. In ANT1tg-NRCM führte die Stimulation mit KÜAH unter normoxischen Bedingungen zu erhöhten p15HSP27 und p85HSP27 zu HSP27-Ratios, was

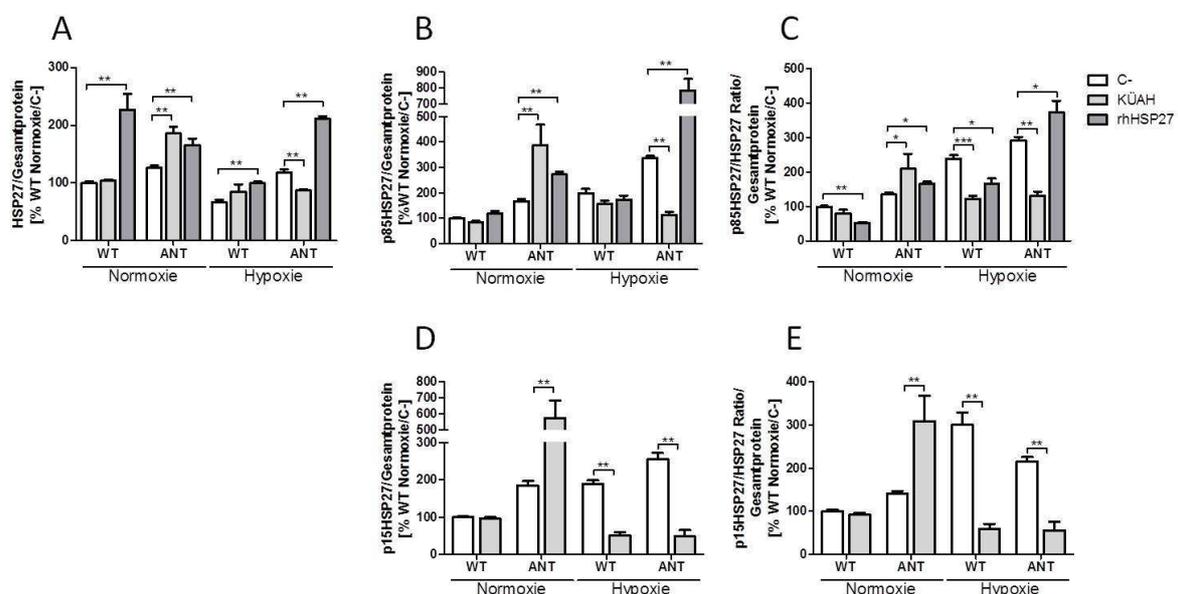


Abb. 3.13: HSP27-Expression und -Aktivierung in NRCM bei 24 stündiger Stimulation mit Komponenten des KÜAH. Die Zellen wurden 24 Stunden unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen mit Mangelmedium (C-), Kulturüberstand von 24 Stunden hypoxisch kultivierten ANT1tg-NRCM (KÜAH) oder rekombinatem humanem HSP27 (rhHSP27) inkubiert. Anschließend wurden Gesamtzellextrakte generiert und diese mittels Westernblot analysiert. Dargestellt sind (A) Gesamt-HSP27, (B) p85HSP27, (C) das p85HSP27/HSP27-Verhältnis, (D) p15HSP27 und (E) das p15HSP27/HSP27-Verhältnis in Prozent zum normoxischen WT in C-. Die Quantifizierung erfolgte in Relation zum mit Coomassie gefärbten Gesamtprotein. Die statistische Auswertung für diese Abbildung erfolgte nur für den Vergleich der unterschiedlichen Stimmulationsreagenzien miteinander. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 vs. normoxischem WT/C-; n=4-16.

vor allem durch eine erhöhte Phosphorylierung an beiden Positionen zustande kam. Unter hypoxischen Bedingungen nahmen zum einen die Phosphorylierung in ANT1tg-NRCM an beiden HSP27-Phosphorylierungsstellen und zum anderen auch die damit verbundenen Ratios ab. Dies war vor allem auf die reduzierte Phosphorylierung an beiden Serinresten zurückzuführen. Diese Effekte waren nur für normoxisch kultivierte ANT1tg-NRCM durch langzeitige Stimulation mit rhHSP27 reproduzierbar. Die Stimulation mit rhHSP27 führte sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen zu einer Erhöhung der HSP27-Expression. Vergleichbar zu CRYAB konnte auch der Verlust der HSP27-Proteinmenge, der durch Hypoxie bei Kultivierung in Mangelmedium induziert wurde, durch Behandlung der NRCM mit rhHSP27 in beiden Zelltypen aufgehoben werden. Die Phosphorylierung an Ser85 wurde bei langzeitiger Stimulation mit rhHSP27 nur in ANT1tg-NRCM erhöht. Das hatte zur Folge, dass unter beiden Begasungszuständen die p85HSP27/HSP27-Ratio in ANT1tg-NRCM anstieg, in WT-NRCM jedoch abfiel. Die Phosphorylierung an Ser15 war bei langzeitiger Kultivierung mit rhHSP27 in keinem der Ansätze detektierbar.

Es wird ersichtlich, dass WT- und ANT1tg-NRCM unterschiedlich auf die Stimulation mit rhHSP27 reagierten. Der Einfluss des KÜAH auf normoxisch kultivierte ANT1tg-NRCM hinsichtlich der Expression und Aktivierung war identisch zu dem bei Stimulation mit rhHSP27 und kann daher durch im KÜAH enthaltenes HSP27 erklärt werden. Unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen scheint HSP27 im Kulturüberstand nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, da die aktivierenden Effekte des KÜAH auf die HSP27-Phosphorylierung unter diesen Bedingungen nicht mehr nachweisbar waren. Zusätzlich fiel auf, dass ANT1tg-NRCM wesentlich sensitiver auf die Stimulation mit rhHSP27 und KÜAH reagierten als WT-NRCM.

3.4.3 Aktivierung von AKT durch ins Kulturmedium freigesetzte Proteine

Eine kurzzeitige Stimulation mit KÜAH hatte in ANT1tg-NRCM keinen Effekt auf die pAKT/AKT-Ratio, in WT-NRCM wurde diese jedoch reduziert (Abb. 3.14). Dies war sowohl auf eine erhöhte AKT-Expression, als auch auf eine verringerte AKT-Phosphorylierung zurückzuführen. Dieser Effekt konnte nicht durch Stimulation mit rhHSP27 simuliert werden. Die 30 minütige Stimulation mit rhHSP27 führte in beiden Zelltypen zu einer erhöhten pAKT/AKT-Ratio, was in beiden Fällen auf die reduzierte AKT-Expression und auf die erhöhte AKT-Phosphorylierung zurückzuführen war.

Die langzeitige Stimulation mit KÜAH verursachte nur in ANT1tg-NRCM und nur unter normoxischen Bedingungen eine Erhöhung der pAKT/AKT-Ratio und damit eine Aktivierung des AKT-Signalings. Dies war einerseits auf eine reduzierte AKT-Expression, andererseits auch auf eine erhöhte

AKT-Phosphorylierung zurückzuführen. Auch dieser Effekt konnte nicht durch rhHSP27 induziert werden (Abb. 3.14).

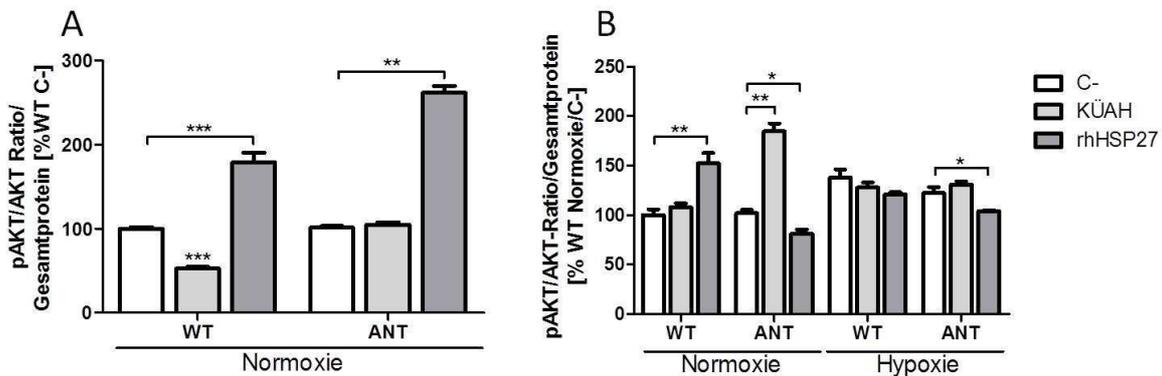


Abb. 3.14: AKT-Aktivierung in NRCM bei Stimulation mit KÜAH oder rhHSP27. Die Zellen wurden (A) 30 Minuten unter normoxischen oder (B) 24 Stunden unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen mit Mangelmedium (C-), Kulturüberstand von 24 Stunden hypoxisch kultivierten ANT1tg-NRCM (KÜAH) oder rekombinatem, humanem HSP27 (rhHSP27) inkubiert. Anschließend wurden Gesamtzellextrakte generiert und diese mittels Westernblot analysiert. Dargestellt ist das pAKT/AKT-Proteinverhältnis in Prozent zum normoxischen WT in C-. Die Quantifizierung erfolgte in Relation zum mit Coomassie gefärbten Gesamtprotein. Die statistische Auswertung für diese Abbildung erfolgte nur für den Vergleich der unterschiedlichen Stimulationsreagenzien miteinander. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 vs. normoxischem WT/C-; n=4-16.

Die Aktivierung des AKT-Signalings erfolgte zwar durch rhHSP27, eine AKT-aktivierende Funktion des KÜAH war aber nur bei langzeitiger, normoxischer Kultivierung von ANT1tg-NRCM beobachtbar. RhHSP27 hingegen hatte unter diesen Bedingungen keine aktivierende Funktion auf das AKT-Signaling. Es ist daher davon auszugehen, dass das HSP27 des KÜAH nur eine untergeordnete Rolle bei der Aktivierung des AKT-Signalings spielt.

3.4.4 Aktivierung von Erk1/Erk2 durch ins Kulturmedium freigesetzte Proteine

Die kurzzeitige Stimulation mit KÜAH beeinflusste das Erk1/2-Signaling sowohl in WT- als auch in ANT1tg-NRCM. Erk1 und Erk2 wurden bei kurzzeitiger Stimulation mit KÜAH zwar identisch reguliert, allerdings unterschieden sich die Reaktionen zwischen beiden Zelltypen. In WT-NRCM kam es zu einer Verringerung der Erk1/2-Aktivierung, was auf die erhöhte Erk1/2-Proteinexpression bei gleichzeitig reduzierter Erk1/2-Phosphorylierung zurückzuführen war. ANT1tg-NRCM reagierten entgegengesetzt. Sowohl für Erk1 als auch für Erk2 kam es zur Erhöhung der Ratio der phosphorylierten zur unphosphorylierten Form (Abb. 3.15). Dies war auf eine erhöhte Phosphorylierung von Erk1/2 zurückzuführen. Die Effekte, die bei kurzzeitiger Stimulation mit KÜAH hinsichtlich der Erk1/2-Aktivierung auftraten, konnten in beiden Zellformen durch HSP27-Antikörper reduziert, aber nicht neutralisiert werden (o. Abb.). Die durch KÜAH induzierten Effekte sind daher nicht oder nur teilweise auf darin enthaltenes HSP27 zurückzuführen. Diese Beobachtung wurde dadurch bekräftigt, dass beide Zellformen auf die kurzzeitige Stimulation mit rhHSP27 anders reagierten, als auf die Stimulation mit KÜAH. Es kam in WT-NRCM zu einer verstärkten Aktivierung des Erk1-Signalings. Die Erhöhung der pErk1/Erk1-Ratio war durch eine reduzierte

Erk1-Expression und eine erhöhte Erk1-Phosphorylierung zu erklären. In ANT1tg-NRCM hingegen führte die Stimulation mit rhHSP27 zu einer Verringerung von pErk1 und damit auch zu einer Reduktion des pErk1/Erk1-Verhältnisses. Erk2 war in beiden Zelltypen bei 30 minütiger Stimulation mit rhHSP27 identisch reguliert. Die Erk2-Expression war erhöht und die Erk2-Phosphorylierung nahm in WT- tendenziell, in ANT1tg-NRCM sogar signifikant ab. In beiden Zellformen trug sowohl die reduzierte Erk2-Phosphorylierung als auch die erhöhte Proteinexpression dazu bei, dass die pErk2/Erk2-Ratio im Vergleich zu den jeweiligen Kultivierungen unter Basalbedingungen reduziert und damit die Erk2-Aktivierung verringert war.

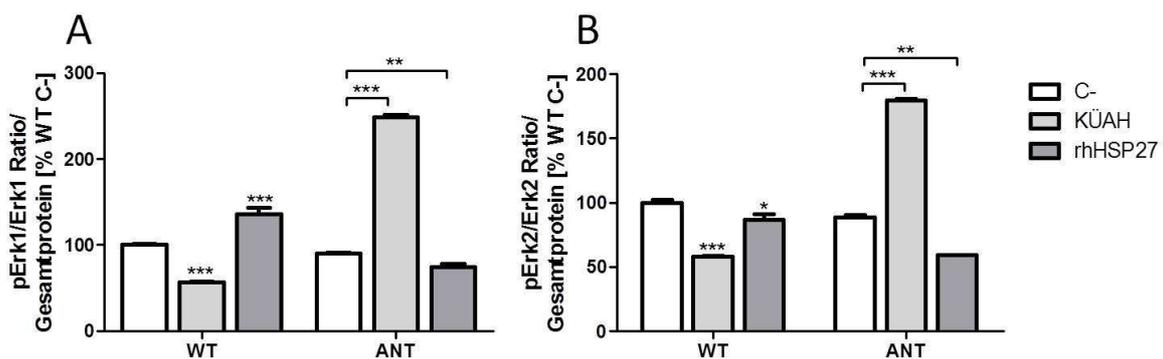


Abb. 3.15: Erk1/2-Aktivierung bei kurzzeitiger Stimulation mit Komponenten des Kulturüberstandes. Dargestellt ist der Erk1/2-Aktivierungszustand von WT- und ANT1tg-NRCM im Vergleich zur Kultivierung in Mangelmedium (C-). Die Zellen wurden 30 min unter normoxischen Bedingungen mit unterschiedlichen Ansätzen stimuliert (C- = Mangelmedium ohne Serum, KÜAH = Kulturüberstand von ANT1tg-NRCM die 24 Stunden hypoxisch kultiviert wurden, rhHSP27 = rekombinantes, humanes HSP27). Anschließend wurden Gesamtzellextrakte generiert und diese mittels Westernblot analysiert. Dargestellt sind (A) das pErk1/Erk1-Verhältnis und (B) das pErk2/Erk2-Verhältnis in Prozent zum WT in C-. Die Quantifizierung erfolgte in Relation zum mit Coomassie gefärbten Gesamtprotein. Die statistische Auswertung für diese Abbildung erfolgte nur für den Vergleich der unterschiedlichen Stimulationsreagenzien miteinander. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 vs. WT/C- oder zwischen den beiden verbundenen Bedingungen; n=4-15.

Bei 24 stündiger Stimulation mit KÜAH kam es nicht nur bei Normoxie sondern auch bei Hypoxie zu einer Aktivierung des Erk1-Signalings in WT-NRCM (Abb. 3.16). Unter Normoxie war dies zum einen auf eine verringerte Proteinexpression und zum anderen auf eine erhöhte Erk1-Phosphorylierung zurückzuführen (o. Abb.). Unter Hypoxie wurde die Erhöhung der pErk1/Erk1-Ratio vor allem durch eine verringerte Proteinexpression hervorgerufen. In ANT1tg-NRCM wurde die Erk1-Aktivierung sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie herunter reguliert. Die Blockade des im KÜAH befindlichen HSPs durch Hsp27-AK wirkte der erhöhten Erk1-Aktivierung in WT-NRCM nicht entgegen (Daten nicht gezeigt). Die Erhöhung ist damit nicht auf im KÜAH enthaltenes HSP27 zurückzuführen. Das Erk2-Signaling wurde bei 24 stündiger Kultivierung mit KÜAH weder normoxisch noch hypoxisch von einer der beiden Zellformen aktiviert.

Die 24 stündige Stimulation mit rhHSP27 reproduzierte die Effekte des KÜAH nicht und führte nur unter Hypoxie in beiden Zelltypen zu einer Erhöhung der pErk1/Erk1- und pErk2/Erk2-Ratio und damit zur verstärkten Aktivierung des Erk1/2-Signalings. Neben der erhöhten Erk1/2-Expression, war auch die Erk1/2-Phosphorylierung verstärkt. Dabei hatte jeweils die Erhöhung der Phosphorylierung den entscheidenden Einfluss auf die ermittelten Ratios (o. Abb.).

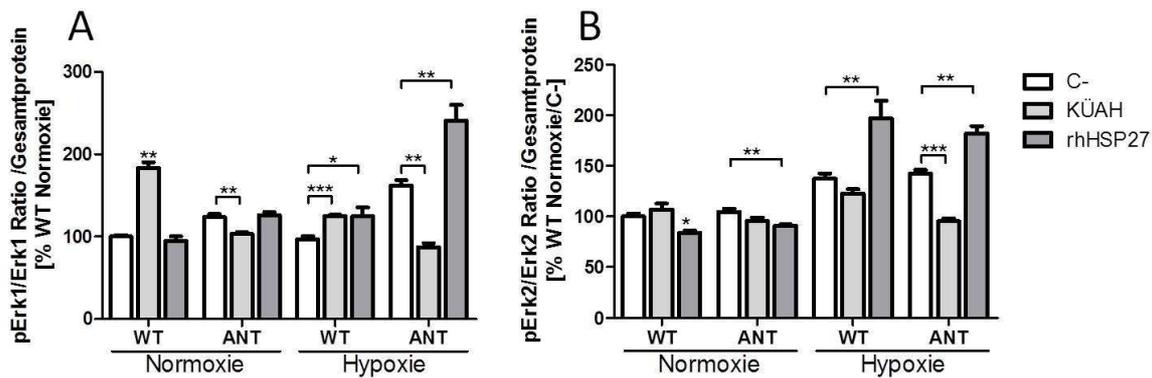


Abb. 3.16: Erk1/2-Aktivierung bei 24 stündiger Stimulation mit Komponenten des Kulturüberstandes. Dargestellt ist der Erk1/2-Aktivierungszustand von WT- und ANT1tg-NRCM im Vergleich zur Kultivierung in Mangelmedium (C-). Die Zellen wurden 24 Stunden unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen mit unterschiedlichen Ansätzen stimuliert (C- = Mangelmedium ohne Serum, KÜAH = Kulturüberstand von ANT1tg-NRCM die 24 Stunden hypoxisch kultiviert wurden, rhHSP27 = rekombinantes, humanes HSP27). Anschließend wurden Gesamtzellextrakte generiert und diese mittels Westernblot analysiert. Dargestellt sind (A) das pErk1/Erk1-Verhältnis und (B) das pErk2/Erk2-Verhältnis in Prozent zum normoxischen WT in C-. Die Quantifizierung erfolgte in Relation zum mit Coomassie gefärbten Gesamtprotein. Die statistische Auswertung für diese Abbildung erfolgte nur für den Vergleich der unterschiedlichen Stimulationsreagenzien miteinander. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 vs. WT/C- oder zwischen den beiden verbundenen Bedingungen; n=4-16.

Es bleibt festzuhalten, dass die langzeitige Stimulation mit KÜAH nur das Erk1-Signaling in normoxisch und hypoxisch kultivierten WT-NRCM aktivierte. Dieser Effekt war nicht auf im KÜAH enthaltenes HSP27 zurückzuführen. Es sei jedoch erwähnt, dass sowohl das Erk1- als auch das Erk2-Signaling in beiden Zellformen unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen durch rhHSP27 aktiviert wurden. Damit zeigt rhHSP27 ein großes Potential zur Induktion protektiver Signalwege unter Stresssituationen wie Hypoxie.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die unterschiedlichen Zelltypen hinsichtlich ihres Erk1/2-Signalings unterschiedlich auf die Stimulation mit KÜAH und rhHSP27 reagierten. KÜAH aktivierte im Kurzzeitversuch zum einen das Erk1- zum anderen auch das Erk2-Signaling in ANT1tg-NRCM. Bei langzeitiger Kultivierung aktivierte KÜAH jedoch nur das Erk1-Signaling in WT-NRCM. Die Effekte die durch die Stimulation mit KÜAH induziert wurden, waren nicht identisch zu denen in den vergleichbaren Experimenten mit rhHSP27. Dennoch führte die Blockade des im KÜAH enthaltenen HSP27 zu einer Reduktion der induzierten Veränderungen.

Insgesamt fiel auf, dass vor allem ANT1tg-NRCM auf die Stimulation mit KÜAH reagierten. Es kam in diesen Zellen bei normoxischer Langzeitkultivierung zu einer verstärkten Aktivierung des AKT-Signalings. Dieses wurde nicht durch HSP27 im KÜ induziert und war unter Hypoxie nicht mehr nachweisbar. Auch die Expression von CRYAB und HSP27 sowie die Phosphorylierung von HSP27 waren in normoxischen ANT1tg-NRCM verstärkt. Auch diese Effekte konnten unter Hypoxie nicht beibehalten werden, wurden allerdings durch HSP27 des KÜAH vermittelt. Auf die Aktivierung von Erk1/2 wirkte sich die Stimulation mit KÜAH anders aus. Hier kam es zwar bei kurzzeitiger Stimulation zu einer verstärkten Aktivierung von Erk1 und Erk2 in ANT1tg-NRCM, bei langzeitiger Stimulation mit

KÜAH war jedoch nur das Erk1-Signaling in WT-NRCM verstärkt aktiviert. Diese Erhöhung konnte auch unter Hypoxie aufrechterhalten werden und war nicht auf im KÜAH enthaltenes HSP27 zurückzuführen. Eine Expressionserhöhung von HSP90 oder HSP75 als Reaktion auf die Stimulation mit KÜAH war nicht zu beobachten.

3.4.5 Caspaseaktivität bei Stimulation mit Komponenten des Kulturüberstandes

Die Stimulation mit KÜAH führte unter normoxischen Kultivierungsbedingungen in WT-NRCM und unter Hypoxie in beiden Zelltypen zu einer verstärkten Caspaseaktivierung (Abb. 3.17/A). In normoxisch kultivierten ANT1tg-NRCM hingegen blieb die Caspaseaktivität bei Behandlung mit KÜAH unverändert.

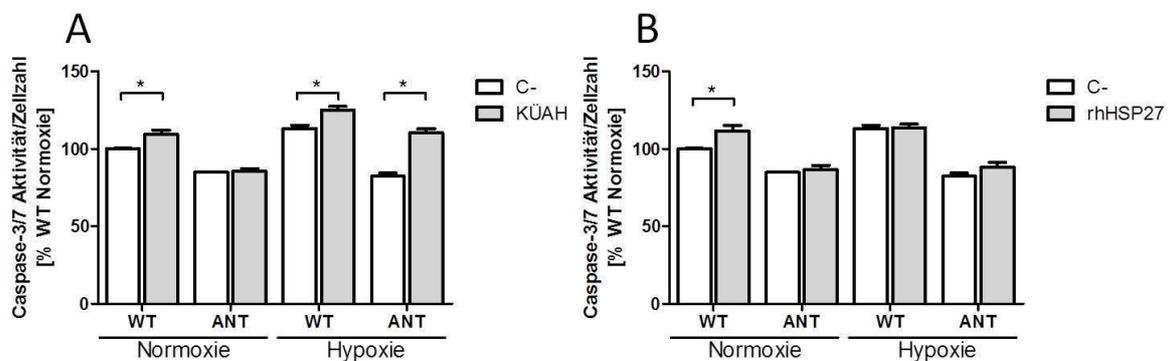


Abb. 3.17: Caspase-3/7 Aktivität in NRCM bei Stimulation mit KÜAH oder rhHSP27. WT- und ANT1tg-NRCM wurden 24 Stunden normoxisch oder hypoxisch mit (A) Kulturüberstand hypoxisch kultivierter ANT1tg-NRCM (KÜAH) oder (B) rekombinanten, humanem HSP27 (rhHSP27) in Mangelmedium behandelt und anschließend mittels Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay der Firma Promega analysiert. Dargestellt ist die Caspase-3/7 Aktivität im Vergleich zur Kultivierung mit Mangelmedium (C-), normalisiert auf die Zellzahl, in Prozent zum normoxischen WT/C-. Die statistische Auswertung für diese Abbildung erfolgte nur für den Vergleich der unterschiedlichen Stimulationsreagenzien miteinander. * $p < 0,05$, $n = 4$.

Die Stimulation mit rhHSP27 hingegen führte nur in normoxisch kultivierten WT-NRCM zu einer Aktivierung der Caspase (Abb. 3.17/B). Die Unterschiede in der Caspaseaktivierung zwischen beiden Zellformen, welche bei Kultivierung in Mangelmedium (C-) auftraten, wurden weder bei Stimulation mit KÜAH, noch bei Stimulation mit rhHSP27 aufgehoben. Es kam auch nicht zu einer Reduktion der Caspaseaktivität in WT-NRCM.

Es wird ersichtlich, dass keines der beiden Stimulationsreagenzien einen protektiven Effekt auf WT-NRCM, welcher sich durch eine verringerte Caspaseaktivität im Vergleich zur Kultivierung mit Mangelmedium (C-) ausdrücken würde, ausübte. Die Stimulation mit rhHSP27 wirkte sich auf ANT1tg-NRCM jedoch auch nicht toxisch aus, da es weder unter Hypoxie, noch unter Normoxie zu einer vermehrten Caspaseaktivierung in diesen Zellen kam. Auch die Stimulation mit KÜAH war unter normoxischen Kultivierungsbedingungen nicht toxisch. Unter Hypoxie jedoch, kam es neben den WT-NRCM auch in ANT1tg-NRCM zu einem Anstieg der Caspaseaktivität.

3.5 Einfluss kardialer Toll-Like-Rezeptoren auf die Regulation von Signalwegen in ANT1tg-NRCM

Wie bereits erwähnt kann die Stimulation mit HSPs die Aktivierung von Toll-Like-Rezeptoren induzieren [164]. Außerdem wurde beschrieben, dass eine TLR-Aktivierung zur Aktivierung von Erk1/2 oder auch AKT führen kann [144;173]. Da ANT1tg-NRCM sich von WT-NRCM in ihrer Reaktion auf die Stimulationsreagenzien unterschieden, stellte sich die Frage, ob die Rezeptorexpression bereits durch eine ANT1-OE oder hypoxische Kultivierungsbedingungen verändert war. Aus diesem Grund wurde zunächst der Gehalt der kardialen TLR2/4 in ANT1tg- und WT-NRCM unter normoxischen und hypoxischen Kultivierungsbedingungen bestimmt.

3.5.1 Toll-Like-Rezeptor 2/4-Expression nach 24 Stunden hypoxischer Inkubation

Die Toll-Like-Rezeptor 2 (TLR2)-Expression war in ANT1tg Kardiomyozyten unter normoxischen Bedingungen 54,7 % höher als in WT-NRCM (Abb. 3.18). Unter hypoxischen Bedingungen war sowohl in WT- als auch in ANT1tg-NRCM eine Absenkung des TLR2-Gehaltes zu beobachten. Es kam zur Aufhebung des Expressionsunterschiedes zwischen beiden Zelltypen.

Auch die Toll-Like-Rezeptor 4 (TLR4)-Expression war basal in ANT1tg-NRCM im Vergleich zu den WT-Zellen leicht erhöht (27,6 %). Hypoxieinduktion führte in ANT1tg-NRCM zu einer Erhöhung des TLR4-Gehaltes um 145,3 %. In WT-NRCM blieb die TLR4-Expression unter Hypoxie unverändert.

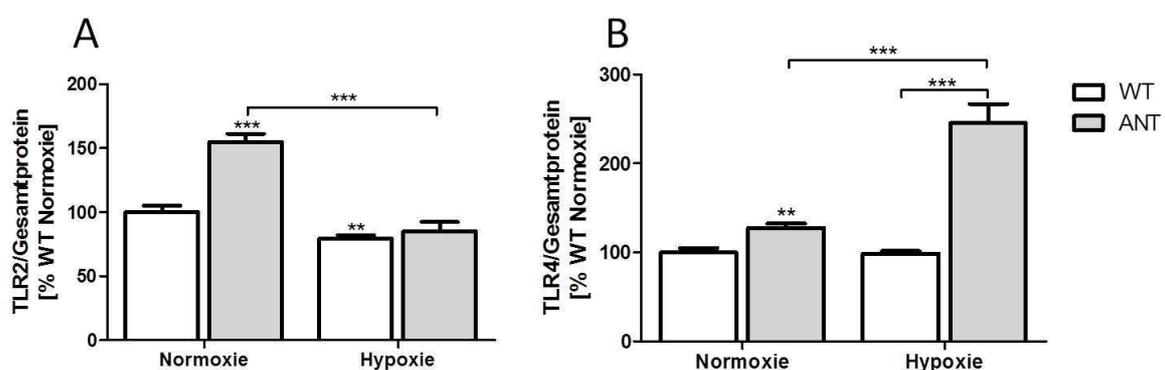


Abb. 3.18: Expression von Toll-Like-Rezeptor 2/4 unter Basalbedingungen und Hypoxie. Graphische Darstellung von Proteinmengen der Gesamtzellextrakte aus WT- und ANT1tg-NRCM. Die Zellen wurden 24 Stunden unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen kultiviert, Gesamtzellextrakte generiert und diese mittels Westernblot analysiert. Dargestellt sind (A) Toll-Like-Rezeptor 2 und (B) Toll-Like-Rezeptor 4 in Prozent zum normoxischen WT. Die Quantifizierung erfolgte in Relation zum mit Coomassie gefärbten Gesamtprotein. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 vs. WT/Normoxie oder zwischen den beiden verbundenen Bedingungen; n=8-16.

WT-NRCM blieben unter Hypoxie nahezu konstant in der Expression von TLR2 und TLR4. ANT1tg Zellen hingegen zeigten bereits basal eine erhöhte TLR2/4-Expression im Vergleich zu WT-Zellen. Darüber hinaus regulierten ANT1tg-NRCM TLR2 unter Hypoxie herunter, TLR4 hingegen wurde unter Hypoxie stärker exprimiert. Die ANT1-OE ging damit unter normoxischen und auch unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen mit einer Veränderung der Expression der kardialen TLR2 und TLR4 einher.

3.5.2 Caspaseaktivierung bei Blockade von TLR2/4

Die Blockade von TLR2 und TLR4 in NRCM führte in jedem Ansatz zu einem Anstieg der Caspaseaktivierung, was für eine anti-apoptotische Funktion der kardialen TLR2/4 in NRCM spricht (Abb. 3.19). Darüber hinaus wurde ersichtlich, dass der Anstieg der Caspaseaktivität in ANT1tg-NRCM sowohl unter Normoxie (WT: 29,5 ±3,2 % vs. ANT1tg: 70,9 ±0,9 %) als auch unter Hypoxie (WT: 87,7 ±4,9 % vs. ANT1tg: 117,51 ±1,4 %) wesentlich stärker erfolgte als in WT-NRCM. Eine verringerte Caspaseaktivierung in ANT1tg-NRCM war bei Blockade der TLR2/4 nicht mehr nachweisbar.

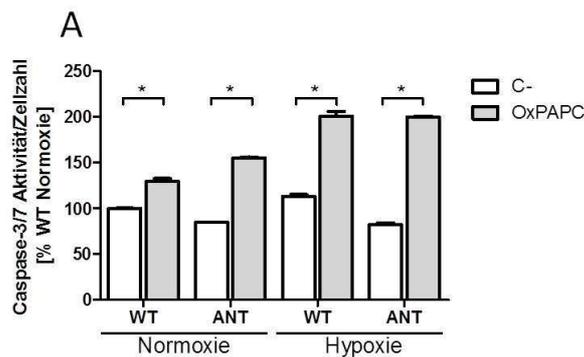


Abb. 3.19: Caspase-3/7 Aktivität in NRCM bei Blockade von TLR2 und TLR4. WT- und ANT1tg-NRCM wurden 24 Stunden normoxisch oder hypoxisch in Mangelmedium (C-) oder mit TLR2/4 Inhibitor OxPAPC kultiviert und anschließend mittels Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay der Firma Promega analysiert. Dargestellt ist die Caspase-3/7 Aktivität, normalisiert auf die Zellzahl, in Prozent zum normoxischen WT/C-. Die statistische Auswertung für diese Abbildung erfolgte nur für den Vergleich der unterschiedlichen Stimulationsreagenzien miteinander. * p<0,05, n=4.

3.5.3 Beeinflussung der Expression kardialer TLR 2/4 durch ins Kulturmedium

freigesetzte Proteine

Um zu überprüfen, ob die in ANT1tg-NRCM veränderte Expression von TLR2 und TLR4 durch die im KÜAH enthaltenen Komponenten induziert wurde, erfolgte die Analyse der TLR-Expression auch nach entsprechenden Stimulationsversuchen mit KÜAH und rhHSP27.

Die 30 minütige Stimulation mit KÜAH hatte nur einen geringen Einfluss auf die TLR-Expression. Lediglich TLR2 war in WT-NRCM erhöht (26,3±7,76 %). Die kurzzeitige Stimulation mit rekombinantem humanem HSP27 hingegen führte in WT und in ANT1tg-NRCM zu einer signifikant erhöhten Expression von TLR2 und TLR4 (Abb. 3.20). Die Blockade des im KÜAH enthaltenen HSP27 durch Hsp27-AK neutralisierte die erhöhte TLR2-Expression in WT-NRCM (o. Abb.). Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Erhöhung der TLR2-Expression, wie sie in normoxisch kultivierten ANT1tg-NRCM zu beobachten war, grundsätzlich durch HSP27 induzierbar ist, in ANT1tg-NRCM jedoch nicht durch KÜAH erfolgte.

Die Expression von TLR4 ist unter normoxischen Bedingungen zwar theoretisch auch durch HSP27 stimulierbar, wurde jedoch in keiner der Zelltypen durch KÜAH induziert. Eine Expressionserhöhung

von TLR4 unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen, so wie man sie in ANT1tg-NRCM bei Kultivierung in Basalmedium (Abschnitt 3.5.1) beobachten konnte, wurde in keiner der beiden Zellformen durch KÜAH oder rhHSP27 induziert (o. Abb.). Die erhöhte Expression von TLR4 in hypoxisch kultivierten ANT1tg-NRCM ist daher nicht auf einen externen Stimulus durch Komponenten des KÜAH zurückzuführen.

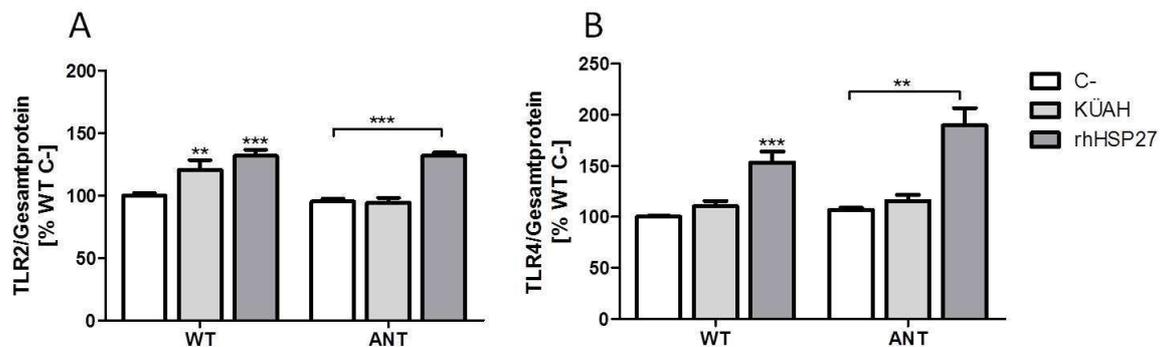


Abb. 3.20: Toll-Like-Rezeptor 2/4 Expression unter Stimulation mit KÜAH oder rhHSP27. Toll-Like-Rezeptor 2/4 (TLR2/4) Proteingehalt von WT- und ANT1tg-NRCM. Die Zellen wurden 30 min unter normoxischen Bedingungen mit Mangelmedium (C-), Kulturüberstand von 24 Stunden hypoxisch kultivierten ANT1tg-NRCM (KÜAH) oder rekombinantem, humanem HSP27 (rhHSP27) stimuliert. Anschließend wurden Gesamtzellextrakte generiert und diese mittels Westernblot analysiert. Dargestellt sind (A) TLR2 und (B) TLR4 in Prozent zum WT in C-. Die Quantifizierung erfolgte in Relation zum mit Coomassie gefärbten Gesamtprotein. Die statistische Auswertung für diese Abbildung erfolgte nur für den Vergleich der unterschiedlichen Stimulationsreagenzien miteinander. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 vs. WT/C- oder zwischen den beiden verbundenen Bedingungen; n=4-16.

3.5.4 Einfluss der kardialen TLR2/4 auf die Aktivierung und Expression der protektiven Signalwege und Komponenten

Um zu analysieren, ob der Einfluss der Komponenten des KÜAH auf die Expression und die Aktivierung protektiver Signalkomponenten in NRCM durch die kardialen TLR2 und TLR4 vermittelt wurde, erfolgte die Blockade von TLR2/4 mit OxPAPC bei gleichzeitiger Stimulation mit KÜAH oder rhHSP27 über eine Dauer von 30 min.

Die durch kurzzeitige rhHSP27-Stimulation induzierte Aktivierung des AKT-Signalings in WT- und ANT1tg-NRCM konnte vollständig durch die Blockade der TLR2/4 mit OxPAPC neutralisiert werden. Auch die Reduktion der AKT-Aktivierung in WT-NRCM bei Stimulation mit KÜAH wurde vollständig durch die Blockade der TLR2/4 neutralisiert. Die AKT-Aktivierung durch Komponenten des Kulturüberstandes wurde demnach durch TLR2/4 vermittelt (o. Abb.).

In WT-NRCM führte die kurzzeitige Stimulation mit KÜAH zu einer Reduktion und die Stimulation mit rhHSP27 zu einer Aktivierung des Erk1-Signalings. Beide Effekte konnten nicht durch Blockade der Toll-Like-Rezeptoren verhindert werden. In ANT1tg-NRCM hingegen in denen die Stimulation mit KÜAH zu einer Aktivierung und die Stimulation mit rhHSP27 zu einer Reduktion der Erk1-Aktivierung führte, wirkte die Blockade der TLR2/4 den beobachteten Effekten entgegen (o. Abb.). Dies zeigt, dass die Aktivierung von Erk1 nur in ANT1tg-NRCM über die Aktivierung von Toll-Like-Rezeptoren erfolgt.

Die kurzzeitige Stimulation mit rhHSP27 führte zu einer Reduktion der Erk2-Aktivierung in beiden Zelltypen. Auch diese konnte durch die Blockade der Toll-Like-Rezeptoren 2/4 mit OxPAPC neutralisiert werden. Die Effekte der Stimulation mit KÜAH auf Erk1/2 hingegen wurden in keiner der Zellformen durch OxPAPC verhindert. Das bedeutet, dass rhHSP27 sowohl in WT- als auch in ANT1tg-NRCM über die Stimulation von TLR2/4 Einfluss auf die Aktivierung von Erk2 nimmt, die Änderungen die durch den KÜAH induziert wurden, aber nicht via TLR2/4 vermittelt werden.

Die Expression von HSP75 wurde nur in ANT1tg-NRCM nicht nur durch KÜAH sondern auch durch die Stimulation mit rhHSP27 reduziert. Nur die Reduktion durch rhHSP27 konnte durch die Blockade der TLR2/4 verhindert werden (o. Abb). Der Effekt des KÜAH blieb trotz Blockade der TLR2/4 bestehen. Dies lässt schlussfolgern, dass die Reduktion der HSP75-Expression nicht über TLR2/4 vermittelt wird. Da die rhHSP27 vermittelte Stimulation durch OxPAPC neutralisiert wurde, ist davon auszugehen, dass die KÜAH vermittelte Reduktion von HSP75 nicht auf im KÜAH enthaltenes HSP27 zurückzuführen ist und unterstützt die Beobachtungen die bei Blockade des im KÜAH enthaltenen HSP27 gemacht wurden. Auch die Blockade des HSP27 im KÜAH konnte der Reduktion der HSP75-Proteinmenge nicht entgegen wirken.

Die Expression von CRYAB wurde nur bei kurzzeitiger Stimulation von ANT1tg-NRCM mit KÜAH erhöht und konnte durch Blockade der TLR2/4 verhindert werden. Die KÜAH vermittelte Stimulation der CRYAB-Expression in ANT1tg-NRCM wird demnach durch TLR2/4 vermittelt.

Auch die bei kurzzeitiger Stimulation mit KÜAH und rhHSP27 auftretenden Veränderungen in der Expression und der Phosphorylierung von HSP27 (siehe Abschnitt 3.4.2) wurden durch die Blockade der TLR2/4 neutralisiert. Die Regulation des Phosphorylierungszustandes und der Expression von HSP27 erfolgt demnach ebenfalls durch Signaltransduktion mit Hilfe der kardialen TLR2 und TLR4 (o.Abb).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass TLR2 und TLR4 an der Expressionserhöhung protektiver HSPs und der Aktivierung des protektiven AKT- und Erk1/2-Signalings sowohl in WT- als auch in ANT1tg-NRCM beteiligt sind. Ausnahmen stellen die KÜAH vermittelte Expressionsveränderung von HSP75 und die Regulation des Erk1/2-Signalings dar. Die Aktivierung des Erk1-Signalings wird nicht nur bei Stimulation mit rhHSP27 sondern auch bei Stimulation mit KÜAH ausschließlich in ANT1tg-NRCM durch die Signalweiterleitung von TLR2/4 vermittelt. Die Aktivierung von Erk2 hingegen erfolgte unabhängig vom Phänotyp der Zellen, aber abhängig vom Stimulationsreagenz durch TLR2/4. Hier kommt es nur bei Stimulation mit rhHSP27 zu einer Signalweiterleitung durch die genannten Toll-Like-Rezeptoren.

4. DISKUSSION

Hypoxische Zellschädigungen sind mit einer verringerten ANT-Aktivität, ATP-Mangel, verstärkter ROS-Produktion und damit verbundenem Zelltod assoziiert [40;41]. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass eine ANT1-OE unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen in NRCM protektiv wirkte, indem sie mit einer verstärkten Aktivierung des Erk1/2- und AKT-Signalings sowie verringerter Apoptose einherging. Im ersten Teil der Dissertation sollte untersucht werden, welche Proteine mit dem ANT1 assoziiert sind. Es wurde ermittelt, ob der ANT1 mit Komponenten assoziiert ist, die eine Aktivierung von AKT oder Erk1/2 stabilisieren.

4.1. ANT als Komponente intrazellulärer Signalwege

Mittels ANT-spezifischer Immunpräzipitation und anschließender Massenspektroskopie wurde das ANT-Interaktom aus Zelllysaten von Herzgewebeproben und NRCM bestimmt. Komponenten, die unter allen Bedingungen im ANT-Interaktom vorhanden waren, bildeten das „Core“ des Interaktoms. In den Präzipitaten der zur Ermittlung des Core-Interaktoms verwendeten Proben war ausschließlich ANT1 detektierbar, weswegen von einem ANT1-spezifischen Core-Interaktom ausgegangen werden kann. Die Interaktionspartner wurden zusätzlich stichprobenartig mittels Westernblotanalyse verifiziert. Das ANT1-Core-Interaktom bestand aus 115 Proteinen. 54,8 % dieser Proteine waren mitochondriale Proteine, unter welchen sich auch bekannte ANT-Interaktionspartner wie der VDAC oder PiC befanden [21;194;195]. Neben den mitochondrialen, befanden sich vor allem zytoplasmatische Proteine, Proteine des Zytoskelettes, des Golgi Apparates, aber auch der Plasmamembran und des Endoplasmatischen Retikulums im Interaktom. Dies ist dadurch zu erklären, dass auch indirekte Interaktionspartner des ANT1 detektiert wurden. Das bedeutet, dass direkte Interaktionspartner des ANT1 als Bindeglied zwischen ANT1 und anderen, wie beispielsweise zytosolischen Proteinen fungieren können. Der VDAC, welcher in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist, stellt eine solche Komponente dar. Es ist bekannt, dass Tubulin mit dem VDAC interagiert und so, zusammen mit dem ANT, der mitochondrialen Kreatinkinase (mtCK), dem PiC und der ATP-Synthase (CV), ein sogenanntes „Mitochondriales Interaktosom“ bildet [196;197]. Mit Ausnahme der mtCK, konnten alle Komponenten des kardiomyozytären „Mitochondriales Interaktosomes“ auch in unserem ANT1-Interaktom nachgewiesen werden. Die Komponenten dieses Interaktosoms sind jedoch variabel. Pedersen *et al.* entwickelten ein Modell, indem das Mitochondriale Interaktosom von Krebszellen ohne mtCK gebildet wird. Eine weitere Modifikation des Interaktosoms kanzerogener Zellen besteht in der

Bindung von HK2 anstelle von Tubulin [198]. Es wird vermutet, dass die genannten Modifikationen einen erhöhten glykolytischen Stoffwechsel in Krebszellen begünstigen und so zu dem sogenannten „Warburg-Effekt“ beitragen [197]. Das von uns ermittelte *Core*-Interaktom besteht aus Komponenten, die sowohl in Gewebeproben adulter Ratten als auch in NRCM mit ANT1 coimmunpräzipitiert wurden. Da die mtCK nur in den Gewebeproben adulter Rattenherzen im ANT1-Interaktom nachweisbar war (Daten nicht gezeigt), ist davon auszugehen, dass das detektierte Interaktom in adulten Tieren, trotz der fehlenden mtCK im *Core*-Interaktom, dem bereits beschriebenen Interaktosom von Kardiomyozyten ähnelt. Für NRCM jedoch lassen die ermittelten Daten den Schluss zu, dass das Mitochondriale Interaktosom eher dem von Krebszellen entspricht. Wie bereits erwähnt gehen die in diesen Zellen auftretenden Modifikationen mit einem erhöhten glykolytischen Stoffwechsel einher [197;199]. Auch wenn man bei NRCM nicht vom Warburg-Effekt sprechen kann, ist auch für diese Zellen ein erhöhter glykolytischer Stoffwechsel beschrieben worden [200] und unterstützt die Vermutung über die Zusammensetzung des in diesen Zellen auftretenden Mitochondrialen Interaktosoms. Die von Pedersen und Saks beschriebenen Modelle des Mitochondrialen Interaktosoms [197;198] zeigen als zytoplasmatische Interaktionspartner entweder HK2, oder Tubulin. In unserem *Core*-Interaktom treten jedoch beide Komponenten auf. Dies könnte auf die unterschiedliche Behandlung der Zellen zurückzuführen sein. Der Nachweis des Interaktosoms bei Saks *et al.* erfolgte in permeabilisierten Zellen in denen die Stabilisierung der Mitochondrien durch Interaktion mit Zytoskelettkomponenten erhalten blieb [197]. Da in unseren Versuchen eine Lyse des verwendeten Probenmaterials zur Proteinisolation durchgeführt wurde, kam es mit der Zerstörung der Zellstruktur wahrscheinlich auch zur partiellen Ablösung des Tubulins vom Interaktosom. Eine vermehrte Bindung von HK2 wäre unter diesen Bedingungen möglich und könnte den gleichzeitigen Nachweis von HK2 und Tubulin im ANT1-Interaktom erklären.

Eine weitere Erklärung für die Detektion nicht mitochondrial lokalisierter „ANT-Interaktionspartner“ ist, dass der ANT nicht nur in der inneren Mitochondrienmembran, sondern auch in der Plasmamembran lokalisiert ist und so auch Proteinen anderer Zellkompartimente zugänglich sein kann [26-28]. Ob der ANT tatsächlich in der Plasmamembran von Kardiomyozyten lokalisiert ist, ist bisher noch nicht untersucht worden.

Darüber hinaus sind die Lokalisationsorte der Interaktionspartner möglicherweise noch nicht vollständig bekannt. Wird die Lokalisation der Komponenten des ANT1-Interaktoms mit Hilfe der Datenbank „*Compartments*“ (compartments.jensenlab.org) bestimmt, welches neben Onlinedatenbanken auch bestimmte Algorithmen zur Lokalisationsvorhersage verwendet, finden sich unter den 115 Proteinen nur noch 24 (21 %), die in der Ratte nicht mitochondrial auftreten. Siebzehn von diesen 24 Komponenten wird in Human- oder Mauszellen eine mitochondriale Lokalisation zugeordnet. Damit sind 93,3 % der ANT1-*Core*-Interaktionspartner in einer der drei Spezies

mitochondrial lokalisiert. Es wäre denkbar, dass auch Proteine, denen bisher nur in Maus und Mensch eine mitochondriale Lokalisation zugeordnet wurde, auch in Rattenzellen mitochondrial vorkommen.

4.1.1 ANT1 als Komponente des Energiestoffwechsels

Komponenten des ANT1-Interaktoms konnten vor allem dem Energiestoffwechsel, wie dem Fettsäuremetabolismus, der Glykolyse/Gluconeogenese, dem Tricarbonsäurezyklus und der Oxidativen Phosphorylierung zugeordnet werden.

Während der β -Oxidation von Fettsäuren, der Glykolyse und auch im Zitratzyklus werden Reduktionsäquivalente (NADH, FADH₂) gebildet, deren Elektronen mit Hilfe der Atmungskettenkomplexe I-IV (CI-CIV) unter Bildung von Wasser auf Sauerstoff übertragen werden. Dabei wird gleichzeitig ein Protonengradient zwischen Matrix und Intermembranraum aufgebaut. Diesen Protonengradienten nutzt die ATP-Synthase (Komplex V, CV) um ATP aus ADP und anorganischem Phosphat (P_i) zu generieren [201]. Damit dieser Prozess ungehindert ablaufen kann, muss ausreichend ADP als Substrat in der mitochondrialen Matrix zur Verfügung stehen. Der ANT tauscht mitochondriales ATP gegen zytosolisches ADP aus und ist so maßgeblich an der Bereitstellung von ADP im Mitochondrium beteiligt. Bei ANT-Fehlfunktion ist dies nicht gewährleistet und es kommt zur Inhibierung der ATP-Produktion [38]. Die Funktion des ANT ist demnach eng mit der Funktionalität der Oxidativen Phosphorylierung (OxPhos) gekoppelt [18;19;202]. Der ANT1 ist mit besonders vielen Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe CI (Ndufa10, Ndufs1, Ndufs3) und CV (Atp5a1, Atp5b, Atp5c1, Atp5f1, Atp5h) assoziiert. Es ist bekannt, dass der ANT zusammen mit dem PiC und der ATP-Synthase einen Proteinkomplex, das sogenannte „ATP-Synthasom“ bildet [203]. Chen *et al.* [203] vermuteten, dass entweder der ANT, oder der PiC mit dem C-Ring der ATP-Synthase interagieren. Diese Hypothese konnte nicht durch unsere Ergebnisse bestätigt werden, da die im ANT1-Interaktom detektierten Untereinheiten der ATP-Synthase keine Komponenten des C-Rings sind. Stattdessen fanden sich zwei andere Untereinheiten des F₀-Teils (Atp5f1, b1-Untereinheit und Atp5h, d-Untereinheit), also des membranlokalisierten Teils der ATP-Synthase, im ANT1-Interaktom. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Assoziation von ANT1 mit der ATP-Synthase eher über diese Untereinheiten erfolgt. Möglicherweise kommt es durch die zur Lyse verwendeten Detergenzien zu einer Dissoziation der anderen ATP-Synthase-Untereinheiten vom detektierten ANT1-Core-Interaktom, was die Abwesenheit dieser Komponenten im ANT1-Interaktom erklären könnte. Sowohl die b1- als auch die d-Untereinheit des F₀-Teils, bilden eine Verbindung mit dem F₁-Teil über einen peripheren Ast [201]. Das könnte erklären, warum die α -, β - und γ -Einheit des F₁-Teils der Synthase ebenfalls im ANT1-Interaktom detektierbar waren. Darüber hinaus wird der

C-Ring der ATP-Synthase (CV) als strukturelle Komponente der MPTP diskutiert [204;205]. Auch wenn die Komponenten des C-Rings nicht als Bestandteile des ANT1-Interaktoms identifiziert wurden, könnte die Assoziation des ANT1 mit den detektierten Untereinheiten der ATP-Synthase bei der Induktion der Apoptose zu strukturellen Veränderungen, indirekt auch zu Veränderungen des C-Ringes und einer vermehrten Porenöffnung beitragen. Auch Komplex I der Atmungskette ist an der Regulation der Porenöffnung beteiligt, denn die Blockade dieses Komplexes mit Rotenon hatte eine Inhibition der MPTP zur Folge [206]. Die Assoziationen von CI und CV mit dem ANT1 lassen demnach vermuten, dass eine Porenöffnung bei Apoptoseinduktion durch die Assoziation von ANT1 mit den genannten Untereinheiten modifiziert wird. Dafür spricht auch, dass sich einige Untereinheiten von CI und CV unter Hypoxie aus dem ANT1-Interaktom ablösen und andere sich anlagern (Abb. A1, siehe Anhang). Es wäre denkbar, dass der ANT1 bei den strukturellen Änderungen der beiden Komplexe, welche während der Porenöffnung durchlaufen werden [207;208], eine Rolle spielt, indem er je nach eigener Konformation den offenen oder den geschlossenen Zustand der MPTP durch Assoziation mit den jeweiligen Untereinheiten stabilisiert. Dass der ANT in seinem *c-State* die Öffnung der MPTP und in seinem *m-State* die geschlossene Pore stabilisiert, ist mehrfach gezeigt worden [209-211]. Eine weitere Erklärung für die Assoziation von ANT1 mit den Atmungskettenkomplexen ist die Ausbildung sogenannter „mitochondrialer Superkomplexe“ [212]. Unter anderem zeigten Acín-Pérez *et al.*, dass CI, CIII und CV miteinander assoziiert sind [213]. Die Beobachtung, dass neben den Untereinheiten von CI und CV auch Untereinheiten von CIII im ANT1-Interaktom zu finden sind, lässt vermuten, dass der ANT1 eine weitere Komponente in diesem Superkomplex darstellt.

Auch bei der Fettsäure-vermittelten Entkopplung der Atmungskette spielt der ANT eine Rolle [214]. Wenn die β -Oxidation z.B. durch hypoxischen Stress zum Erliegen kommt, reichert sich langkettiges Acyl-CoA an, welches an den ANT bindet und ihn in seiner Funktion inhibiert [40]. Neben Acyl-CoA inhibiert auch Palmitoylcarnithin die Funktion des ANT [215;216]. Möglicherweise erfolgt durch die Assoziation des ANT1 mit der Carnithin-Palmitoyl-Transferase (CPT1b), welche die Fettsäuren an Carnithin bindet um diese für den Membrantransport vorzubereiten und damit sowohl die Menge an Acyl-CoA als auch an Acylcarnithin beeinflusst, eine Rückkopplung auf die ANT-Aktivität. Dies wäre ein weiterer denkbarer Mechanismus, durch den die Atmungskette beeinflusst werden könnte. Die Blockade des ANT durch Acyl-CoA wirkt sich auch auf die Glykolyse aus. Die ANT-Funktion beeinflusst das ATP/ADP-Verhältnis im Zytoplasma und bestimmt so, ob der Zellmetabolismus oxidativ oder glykolytisch abläuft. Eine ANT-Fehlfunktion führt zu einer Reduktion der ATP/ADP-Ratio im Zytosol und stimuliert dadurch die ATP-Produktion durch Glykolyse [217]. Die Interaktion des ANT mit Komponenten der Glykolyse-Enzyme ist noch nicht beschrieben worden. Eine Ausnahme bildet die HK2. HK2 ist bei der Ausbildung der MPTP indirekt, über den VDAC, mit ANT assoziiert [194]. Es wäre

denkbar, dass die Assoziation der Glykolyse-Komponenten mit dem ANT1-Interaktom Einfluss auf deren Enzymaktivität und damit den glykolytischen Stoffwechsel nimmt.

Ähnliches lässt sich auch für die Komponenten des TCA-Zyklus schlussfolgern, mit denen der ANT assoziiert ist. Es wird zwar diskutiert, dass die Aktivität des ANT auch Einfluss auf die Aktivität der am TCA-Zyklus beteiligten Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) und 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase (2OGDH) nimmt [218;219], aber Assoziationen zwischen Proteinen des TCA-Zyklus und dem ANT über Proteinkomplexe sind bisher noch nicht beschrieben worden. Möglicherweise kommt es bei der Bindung der Enzyme an das ANT1-Interaktom zu einer Konformationsänderung, welche mit einer Änderung der Enzymaktivität (allosterischer Effekt) einhergeht. Eine Blockade der aktiven Zentren der Enzyme durch die Bindung an das ANT1-Interaktom wäre ebenfalls denkbar und könnte den vermuteten Zusammenhang zwischen ANT-Aktivität und der Aktivität von PDH und 2OGDH erklären [218;219].

4.1.2 ANT1 als Komponente des Calcium-Signalings und der Muskelkontraktion

Das Endoplasmatische Retikulum, ist der größte Speicher des zellulären Calciums und daher eine wichtige Zellorganelle bei der Betrachtung des Ca^{2+} -Signalings. Eine Interaktion von Endoplasmatischem Retikulum (ER), in dessen Membranen ANT1-Interaktomkomponenten wie z.B. der Ryr2 oder Atp2a2 (SERCA2A) lokalisiert sind, mit Mitochondrien ist vielfach beschrieben worden [220-222]. Die „Bindungsstellen“ zwischen beiden Zellorganellen werden als sogenannte Mitochondrien-assoziierte-Membranen (MAM) bezeichnet und ermöglichen den Austausch von Ca^{2+} zwischen Mitochondrium und ER [221;222]. Komponenten, von denen bekannt ist, dass sie in den MAMs vertreten sind, sind der VDAC und SERCA2A. Allerdings ist SERCA2A vorwiegend unter apoptotischen Bedingungen in MAMs lokalisiert [223]. Unter Hypoxie, bei der es in WT-NRCM verstärkt zur Apoptoseinduktion kommt [46], ist allerdings keine vermehrte Anreicherung von SERCA2A im ANT1-Interaktom nachzuweisen (Daten nicht gezeigt). Dies spricht gegen eine Beteiligung des ANT1 oder Komponenten des ANT1-Interaktoms, an MAMs unter Hypoxie. Ein weiteres Argument dafür, dass die Assoziation von ANT mit Komponenten des Ca^{2+} -Signalings nicht durch die Beteiligung an MAMs zu erklären ist, ist, dass der VDAC in diesen „Bindungsstellen“ über HSP70 mit IP3R des ER verbunden ist [224]. Im ANT1-Interaktom finden sich weder HSP70 noch IP3R (siehe Tabelle A1, Anhang). Auch andere Proteine, die an der Ausbildung von MAMs beteiligt sind, sind nicht im Interaktom nachweisbar [222;223]. Unter den untersuchten Bedingungen lässt sich das ANT1-Interaktom daher nicht als Bestandteil der klassischen Bindungsstelle zwischen ER und Mitochondrium einordnen. Möglicherweise stellt das ANT1-Interaktom, oder zumindest einige Komponenten dieses Proteinkomplexes, eine bisher nicht bekannte Proteinassoziation in den MAMs

dar. Eine Assoziation von ANT1 mit Komponenten des Ca^{2+} -Signalings ist für die Zelle sinnvoll, da die ANT-Aktivität und die damit verbundene Regulation der Oxidativen Phosphorylierung von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration abhängig ist [225;226]. Darüber hinaus ist Ca^{2+} auch für die Kontraktion von Muskeln wichtig. Es konnte gezeigt werden, dass der ANT auch in diesen Prozess involviert ist. Eine durch Palmitoylcarnithin induzierte Fehlfunktion des ANT führt beispielsweise zu post-translationalen Veränderungen des Ryr2-Rezeptors. Dies induziert eine fehlerhafte Ca^{2+} -Freisetzung und geht mit Muskelkontraktionsstörungen einher [216]. Die ANT1-OE hingegen ist mit einer vermehrten kontraktilen Funktion, begleitet von einer erhöhten Proteinexpression myofibrilärer Proteine, wie Aktin, Troponin I oder Myosin (MHC) aber auch einer erhöhten SERCA2A-Expression und vermehrter Ca^{2+} -Aufnahme ins ER assoziiert [44]. Die selbe Arbeit demonstriert auch, dass die ANT1-OE in Kardiomyozyten mit morphologischen Veränderungen wie einer erhöhten Zelllänge oder erhöhtem Zellvolumen einhergeht. Eine Stabilisierung von Aktinfilamenten durch ANT1 könnte die anti-apoptotische Wirkung der ANT1-OE bestärken, da eine Aktindegredation mit verstärkter Apoptose assoziiert ist [227]. Darüber hinaus kann durch die räumliche Nähe von Aktin und Myosin zu ANT1 das ATP, welches für die Muskelkontraktion benötigt wird, dem Kontraktionsapparat schneller zur Verfügung gestellt werden.

4.1.3 ANT1 als Komponente des Zytoskelettes

Im ANT1-Core-Interaktom finden sich auch Proteine wie Tubulin, die an der mechanischen Zellstabilisierung beteiligt sind. Wie bereits beschrieben, ist die Funktion der Mitochondrien und deren Aufbau sehr stark mit der Bindung von Tubulin an den VDAC assoziiert [197]. Der Nachweis von Tubulin a und Tubulin b im ANT1-Interaktom kann daher auf die indirekte Interaktion des ANT1 mit Tubulin über den VDAC zurückgeführt werden. Darüber hinaus ist der Transport von Zellorganellen, wie z.B. Mitochondrien, entlang der Mikrotubuli ATP-abhängig [201;228]. Die räumliche Nähe von ANT1 zu Proteinen, die an solchen Transportmechanismen beteiligt sind, könnte daher die ausreichende Versorgung dieser Prozesse mit ATP sicherstellen.

4.1.4 ANT1 als Komponente des Proteinmetabolismus

Weitere Proteine die im ANT1-Interaktom zu finden waren, sind am Transport von Proteinen durch und zu biologischen Membranen und an der Proteinfaltung beteiligt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass hydrophobe, membranständige Proteine, wie der ANT, durch bestimmte Transportmechanismen an ihren Bestimmungsort gelangen müssen, damit sie im hydrophilen Zytoplasma nicht aggregieren. Beispielsweise sind Timm44 und Tomm22 am Transport von Proteinen

durch die Mitochondrienmembran beteiligt [229]. Aber auch Chaperone, wie HSP90, verhindern die Proteinaggregation von ANT im Zytosol [124]. Dass der ANT auch durch andere Chaperone, wie sie neben HSP90 im Interaktom zu finden waren (z.B. HSP27, CRYAB, HSP75, CCT3, TCP1, etc.), stabilisiert wird, ist wahrscheinlich. Möglicherweise stabilisieren diese Chaperone auch andere Komponenten die im ANT1-Interaktom zu finden waren und interagieren nur indirekt mit dem ANT1. Ein Beispiel dafür wäre HSP75. Es wird vermutet, dass dieses Chaperon an der Ausbildung der MPTP beteiligt ist, indem es über Cyclophilin D (CypD) mit der ATP-Synthase und damit indirekt auch mit dem ANT assoziiert ist [21].

Die zweite Gruppe von Proteinen des ANT1-Interaktoms, welche mit dem Proteintransport assoziiert wird, ist die Gruppe der Rab-Proteine. Sie sind am Transport von Proteinen mit Hilfe von Vesikeln und so an der Organisation von Membranen und der Sekretion von Proteinen beteiligt [230;231]. Möglicherweise wird über einen solchen Mechanismus der putative Einbau des ANT in die Plasmamembran von Kardiomyozyten gewährleistet. Auch diese Hypothese ist noch nicht bestätigt worden und bietet viel Potential für weitere Untersuchungen. Darüber hinaus könnten diese Proteine auch an der Freisetzung der ANT1-interagierenden HSPs aus den NRCM durch Exosomen in den Kulturüberstand beteiligt sein [232;233].

Darüber hinaus sind einige Komponenten des ANT1-Core-Interaktoms Proteine, die an der Proteindegradation beteiligt sind. Unter ihnen finden sich zahlreiche Peptidasen und andere Komponenten des Proteasoms. Proteine, die z.B. durch oxidativen Stress modifiziert, bzw. geschädigt wurden, werden in den Zellen durch Ubiquitin markiert und so dem Proteinabbau zugeführt [201]. Ubiquitin reicherte sich zwar nicht mit ANT1 im Präzipitat an, war aber sowohl in der Immunpräzipitation des ANT als auch in den entsprechenden Kontrollen detektierbar (Daten nicht gezeigt). Es ist also davon auszugehen, dass die Assoziation von Komponenten des ANT1-Interaktoms mit Proteasen auf den in jeder Zelle stattfindenden Proteinkatabolismus zurückzuführen ist. Eine vermehrte Anreicherung von ANT1 in der räumlichen Nähe von Proteasen und Proteasomkomponenten würde die Bereitstellung der zur Proteinspaltung benötigten Menge an ATP gewährleisten [201;234].

4.1.5 ANT1 als Apoptose regulierende Komponente

Eine weitere Gruppe der ANT1-assoziierten Proteine kann die Apoptose beeinflussen und diese an unterschiedlichen Stellen regulieren. Beispielsweise greift YWAH2 (14-3-3 ζ) an vielen Stellen, unabhängig von der MPTP, in die Regulation der Apoptose ein [235]. Auch OPA1 ist an einem MPTP

unabhängigen Mechanismus zur Permeabilisierung von Mitochondrien beteiligt [236;237]. Dabei stabilisiert OPA1 unter nicht apoptotischen Bedingungen die Cristae-Struktur in den Mitochondrien. Diese Stabilisierung führt zur Assemblierung der mitochondrialen Superkomplexe [238], welche wie bereits beschrieben, aus unterschiedlichen Komplexen der Atmungskette zusammengesetzt sind [212;213]. OPA1 nimmt demnach Einfluss darauf, ob die Zusammensetzung der mitochondrialen Superkomplexe erfolgt und damit auch auf deren Aktivität. Walther *et al.* zeigten, dass eine ANT1-OE mit einer vermehrten Aktivierung von CII, CIII und CIV einher ging [43]. Es wäre daher denkbar, dass ein Zusammenhang zwischen der Assoziation von OPA1 mit dem ANT1-Interaktom und der Aktivität der Atmungskettenkomplexe besteht. Die ANT1-OE in NRCM führte zur Dissoziation von OPA1 aus dem ANT1-Interaktom (Abb. A2, Anhang). Die vermehrte Freisetzung von OPA1 aus dem ANT1-Interaktom könnte einer apoptoseinduzierten Modifikation der Cristae-Struktur entgegen wirken [237] und so zum anti-apoptotischen Effekt der ANT1-OE beitragen [46].

Auch die Assoziation von Aktin mit dem ANT1-Interaktom könnte sich auf die Apoptose auswirken, da die Aufspaltung von Aktinfilamenten zu vermehrter Apoptose führt [227]. Wie bereits erwähnt, ging die ANT1-OE in Kardiomyozyten mit erhöhtem Zellvolumen und einer größeren Zelllänge einher [44]. Ob sich dieser Effekt jedoch tatsächlich auf eine Stabilisierung der Aktinfilamente durch die direkte oder indirekte Interaktion mit ANT1 erklären lässt und ob diese Aktinfilament-Stabilisierung mit einer anti-apoptotischen Wirkung einhergeht, bleibt Inhalt zukünftiger Analysen. Bekannt ist jedoch, dass der ANT, als Regulator der MPTP, Einfluss auf die Apoptose nimmt [194;239]. Neben einigen Komponenten wie VDAC, PiC oder HK2, die zusammen mit ANT an der Regulation der MPTP beteiligt sind, finden sich, wie bereits erwähnt, Chaperone im Interaktom des ANT1. Eine direkte Interaktion des ANT1 mit den Chaperonen HSP75, CRYAB oder HSP27 ist bisher noch nicht beschrieben worden. Es wird jedoch vermutet, dass HSP75, zusammen mit HSP90 und HSP60, direkt Einfluss auf die Apoptose nimmt, indem durch ihre Chaperonfunktion die strukturellen Veränderungen bei der Öffnung der MPTP unterstützt werden [21]. HSPs können neben dem Einfluss auf die MPTP auch an vielen anderen Stellen in die Apoptose eingreifen. Beispielsweise verhindert HSP27 die Aktivierung von Caspasen, komplexiert zytosolisches CytC oder inhibiert die Freisetzung von CytC aus dem Mitochondrium, indem es Bid blockiert [240]. Außerdem stabilisieren kleine pHSP27-Dimere Aktinfilamente und wirken so anti-apoptotisch [241]. Darüber hinaus können HSPs AKT stabilisieren. HSP90 interagiert zum Beispiel mit AKT, verhindert dessen Dephosphorylierung und stabilisiert somit seine Aktivität [130]. Auch HSP27 und CRYAB, welche sich ebenfalls im ANT1-Interaktom befinden, regulieren die Apoptose durch die Kontrolle der AKT-Aktivierung [149;161].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der ANT Einfluss auf eine Vielzahl von intrazellulären Prozessen, wie den Energiestoffwechsel, die Muskelkontraktion oder die Apoptose, nimmt. Das

ermittelte ANT1-Interaktom enthält viele Komponenten, die an diesen Prozessen beteiligt sind, was die Relevanz des ANTs für diese Prozesse unterstreicht. Viele der beobachteten Interaktionen sind noch nicht beschrieben und bieten neue Erklärungsmöglichkeiten für bereits bekannte Zusammenhänge.

Besonders interessant ist, dass der ANT möglicherweise auch unabhängig von der MPTP Einfluss auf die Apoptose nimmt. Auffällig sind dabei die Assoziationen mit den Hitzeschockproteinen, da diese die bei ANT1-OE bereits beschriebene Aktivierung protektiver Kinasen wie AKT und Erk1/2 beeinflussen können. Besonders hervorzuheben sind dabei die bisher unbekanntenen Assoziationen von ANT1 mit HSP27 und CRYAB, da diese Komponenten neben der Aktivierung von AKT an einer Vielzahl anti-apoptotischer Mechanismen beteiligt sind.

4.2 Die ANT1-OE beeinflusst die Bindung von Hitzeschockproteinen an das ANT1-Interaktom

Hitzeschockproteine greifen an vielen unterschiedlichen Stellen in die Apoptose ein und sind daher wichtige Komponenten des anti-apoptotischen Signalings. Eine Interaktion von ANT mit Hitzeschockproteinen ist nur für HSP90 bekannt. HSP90 ist am Transport des ANT zum Mitochondrium beteiligt und verhindert dessen Aggregation im Zytosol [124]. Darüber hinaus wird vermutet, dass HSP75 indirekt über CypD und ATP-Synthase, bei der Ausbildung der MPTP, mit dem ANT assoziiert ist [21;242]. Eine Interaktion von ANT mit den kleinen HSPs CRYAB und HSP27 ist bisher noch nicht beschrieben. In dieser Arbeit wurde untersucht, wie sich die Anlagerung von HSP90, HSP75, CRYAB und HSP27 an das ANT1-Interaktom unter Hypoxie verhält und ob die ANT1-OE dieses Verhalten beeinflusst.

Unter Hypoxie kam es bei ANT1-OE zur vermehrten Freisetzung von HSP90 aus dem ANT1-Interaktom (Abb. 3.4). Dies war begleitet von einer erhöhten zellulären HSP90 Expression (Abb. 3.5). Klumpe *et al.* zeigten bereits, dass die ANT1-OE unter Hypoxie mit einer verstärkten HSP90-Expression, AKT-Aktivierung und verringerter Caspase3/7-Aktivierung einhergeht [46]. HSP90 stabilisiert die Aktivität von AKT, welche über NFκB-Aktivierung, Phosphorylierung von Bad oder über Phosphorylierung von Caspase-9 die Apoptose inhibiert (Review [240]). ANT1tg-NRCM sind damit in der Lage, sich effektiver vor Stresssituationen wie Hypoxie zu schützen, indem es zu verstärkter HSP90-Expression und Freisetzung von HSP90 aus dem ANT1-Interaktom kommt. Demzufolge steht HSP90 in ANT1tg-NRCM vermehrt für anti-apoptotische Prozesse zur Verfügung und trägt wahrscheinlich dazu bei, dass es unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen zu verringerter Caspaseaktivierung kommt [46]. Möglicherweise dient ANT dabei als Stresssensor, wobei die Weitergabe des Stresssignals durch die Ablösung von HSPs aus dem ANT1-Interaktom erfolgt.

Außerdem führte die ANT1-OE zu einer vermehrten Bindung von HSP75 an das ANT1-Interaktom, welche unter Hypoxie unverändert bestehen blieb. Es wurde beschrieben, dass Hypoxie zu einer vermehrten Expression von HSP75 in NRCM führt und eine HSP75-OE bei hypoxischem Stress protektiv wirkt, indem es die Öffnung der MPTP blockiert [243]. Ersteres konnte bestätigt werden, da die Expression von HSP75 nach 24 stündiger, hypoxischer Inkubation sowohl in WT- als auch in ANT1tg-NRCM erhöht war. Trotz der unter hypoxischen Bedingungen in beiden Zelltypen erhöhten HSP75-Expression konnte nur in ANT1tg-NRCM eine vermehrte Bindung von HSP75 an das ANT1-Interaktom gezeigt werden. Diese vermehrte Rekrutierung von HSP75 an das ANT1-Interaktom ist auf die ANT1-OE zurückzuführen und nicht vom Sauerstoffgehalt während der Kultivierung abhängig, da diese bereits unter normoxischen Bedingungen in ANT1tg-NRCM zu beobachten war. Die vermehrte Bindung von HSP75 an das ANT1-Interaktom bei ANT1-OE stabilisiert wahrscheinlich Komponenten der Pore, reduziert damit die Öffnung der MPTP und trägt so zu der anti-apoptotischen Wirkung der ANT1-OE bei. Dass die ANT1-OE zu einer verminderten Porenöffnung führt, konnte bereits durch Heger *et al.* gezeigt werden [45] und unterstützt die o.g. Hypothese. Gleichzeitig wird durch unsere Ergebnisse aber auch deutlich, dass die von Xiang *et al.* beschriebene Regulation der MPTP [243] in WT Zellen nicht durch eine vermehrte Bindung von HSP75 an Komponenten der MPTP erfolgt, da eine vermehrte Bindung von HSP75 an das ANT1-Interaktom in WT-NRCM trotz verstärkter HSP75-Expression nicht zu beobachten war. HSP75 muss also noch weitere, nicht durch Interaktionen mit Porenkomponenten vermittelte, protektive Funktionen ausüben, die zur Stabilisierung der MPTP unter Hypoxie führen.

Auch die Expression von CRYAB wurde nicht durch die ANT1-OE beeinflusst, allerdings führte die ANT1-OE unter normoxischen Kultivierungsbedingungen zu einer vermehrten Bindung von CRYAB und HSP27 an das ANT1-Interaktom. Unter Hypoxie wurden beide HSPs sowohl von ANT1tg- als auch von WT-NRCM vollständig aus dem ANT-Interaktom freigesetzt. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die kleinen HSPs unter hypoxischen Bedingungen als Signalproteine aus dem ANT1-Interaktom entlassen werden. Beiden Komponenten werden protektive Wirkungen zugesprochen. Durch die vermehrte Hsp27- und CRYAB-Präsenz im ANT1-Interaktom der ANT1tg-NRCM, könnte deren Loslösung zu einer verstärkten positiven Signaltransduktion in diesen Zellen führen. Sowohl HSP27 als auch CRYAB stabilisieren z.B. die anti-apoptotisch wirkende AKT-Aktivierung [161;244]. Darüber hinaus ging die ANT1-OE mit einer vermehrten Expression von HSP27 einher. Diese blieb auch unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen aufrechterhalten. Da HSP27 anti-apoptotisch wirkt, indem es neben der Aktivierung des AKT-Signalings auch an vielen anderen Stellen in die Apoptose eingreift [240], erhöht dies zusätzlich die protektive Wirkung der ANT1-OE [46].

Die Menge der mit dem ANT1-Interaktom assoziierten HSPs war nicht mit einer vergleichbaren Proteinexpression korreliert. Die Veränderungen der Bindung von HSPs an das ANT1-Interaktom waren demnach nicht auf entsprechende Veränderungen in der Proteinexpression zurückzuführen.

Die ANT1-OE führt zu einer erhöhten Rekrutierung von HSPs an das ANT1-Interaktom. Diese Rekrutierung wird nicht durch Veränderungen in der HSP-Expression bestimmt. Unter Stressbedingungen scheint dies die mitochondriale Integrität zu stabilisieren. Außerdem ermöglicht die vermehrte Bindung von HSPs an das ANT1-Interaktom die Freisetzung einer größeren Menge an Signalkomponenten und ermöglicht damit die Induktion einer verstärkten protektiven Signaltransduktion. Dies ist ein weiterer Mechanismus, durch den der ANT seiner bekannten Rolle als Regulator von Leben und Tod der Zelle gerecht wird.

4.3 Die ANT1-OE beeinflusst die Expression und Sekretion von Hitzeschockproteinen in NRCM

Hypoxisch geschädigtes Myokard entlässt HSPs in den Extrazellularraum und kommuniziert so mit koronaren, vaskulären Endothelzellen oder adulten Kardiomyozyten [164;245]. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine Sekretion der ANT1-interagierenden HSPs durch NRCM erfolgt und wie diese durch Überexpression von ANT1 beeinflusst wird.

Da die Menge an sekretierten HSPs zu gering war, um die durch Serum induzierten Hintergrundsignale im Westernblot zu überdecken, erfolgte die Kultivierung der NRCM in Mangelmedium.

Bereits unter normoxischen Kultivierungsbedingungen kam es zur Freisetzung von HSP90, HSP75, CRYAB und HSP27 in den Kulturüberstand. ANT1tg-NRCM sekretieren HSP90, CRYAB und HSP27 stärker, HSP75 jedoch schwächer als WT-NRCM. Dieser Unterschied deutet auf eine aktive Sekretion und nicht auf einen unspezifischen Mechanismus, wie er beispielsweise bei Zelllyse auftreten würde, hin. Diese Beobachtungen gehen mit denen von Gupta *et al.* und Hunter-Lavin *et al.* einher, welche zeigten, dass HSPs auch unter Basalbedingungen, unabhängig vom Zelltod, aus der Zelle entlassen werden [246;247].

Wie die Sekretion oder der Einbau von HSPs in die Plasmamembran erfolgt, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es werden unterschiedliche Mechanismen, unter anderem die Freisetzung in Form von Exosomen, diskutiert [232;240;246]. Rab11, welches an sekretorischen Prozessen beteiligt ist [248], ist zusammen mit den HSPs im ANT1-Interaktom vorhanden und könnte ein Indiz für die Freisetzung der HSPs aus NRCM durch diesen Mechanismus sein. Die aktive Freisetzung von HSP60 aus adulten Kardiomyozyten in Form von Exosomen ist bereits beschrieben worden [246] und unterstützt die

Hypothese, dass auch andere HSPs in Exosomen aus NRCM freigesetzt werden. Darüber hinaus zeigten Malik *et al.*, dass neben HSP60 auch HSP27, HSP90 und CRYAB in Exosomen aus Rattenkardiomyozyten enthalten sein können [249].

Ein weiteres Indiz für eine aktive Freisetzung der HSPs ist, dass die Zusammensetzung der HSPs in den Kulturüberständen nicht proportional zu den intrazellulären HSP-Mengen war (vergleiche Abb. 3.6 mit Abb. 3.7 und Abb. 3.8/A). Bei unspezifischer Freisetzung wäre dies der Fall.

Darüber hinaus zeigten ANT1tg-NRCM unter normoxischen Kultivierungsbedingungen eine geringere Caspaseaktivierung als WT-NRCM (Abschnitt 3.3). Dies deutet darauf hin, dass ANT1tg-NRCM in einem weniger gestressten Zustand vorliegen als WT-NRCM. Auch dieser Aspekt zeigt, dass die vermehrte Freisetzung von HSP90 und den kleinen HSPs (sHSPs) aus ANT1tg-NRCM nicht unspezifisch durch Freisetzung bei Zellyse, sondern durch einen aktiven Sekretionsmechanismus erfolgen muss. Gleichzeitig wird deutlich, dass sich die sekretierten HSPs nicht schädigend auf die NRCM auswirken, denn auch dies würde von einer erhöhten Caspaseaktivierung angezeigt werden.

Es ist bekannt, dass Serumangel in Kardiomyozyten zur Induktion von Apoptose führt [250]. Die höhere Caspaseaktivität in normoxisch kultivierten WT-NRCM (im Vergleich zu ANT1tg-NRCM) ist wahrscheinlich auf diesen Effekt zurückzuführen. Gleichzeitig wird ersichtlich, dass die ANT1-OE auch Stress durch Serumangel entgegen wirkt und die dadurch induzierte Caspaseaktivierung reduziert, oder sogar verhindert. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass trotz der geringeren Caspaseaktivierung einige Zellen durch Zelltod lysieren und ein gewisser Anteil der nachweisbaren extrazellulären HSPs auf diesem Weg freigesetzt wurde.

Auch unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen kam es in ANT1tg-NRCM nicht zu einer Änderung der Caspaseaktivität. In WT-NRCM hingegen führte Hypoxieinduktion zu einem signifikanten Anstieg dieses Parameters. Dieses Ergebnis zeigt, dass die ANT1-OE nicht nur Serumangel induziertem Stress, sondern auch Hypoxie induziertem Stress entgegen wirkt. Diese in ANT1tg-NRCM auftretende Wirkung könnte durch den erhöhten HSP-Gehalt (sowohl intrazellulär [HSP75,CRYAB,HSP27] als auch extrazellulär [HSP90, CRYAB, HSP27]) zu erklären sein. Eine durch diese HSPs induzierte Präkonditionierung unter normoxischen Kultivierungsbedingungen schützt die ANT1tg-NRCM vermehrt vor Hypoxie und verhindert so die Caspaseaktivierung unter diesen Bedingungen.

Hypoxische Kultivierungsbedingungen führten unter Serumangel in WT-NRCM zu einer reduzierten Expression aller untersuchten HSPs. Diese Beobachtungen gehen mit den Beobachtungen von Marunouchi *et al.* einher, welche zeigten, dass ein Myokardinfarkt in Ratten, welcher mit einer Fehlfunktion des Herzens assoziiert ist, mit einer drastischen Reduktion der sHSPs, wie HSP27, verbunden ist [251]. Es ist demnach denkbar, dass die WT-NRCM aufgrund zu starker Belastung durch Hypoxie und gleichzeitigem Serumangel die Menge an HSPs reduzieren. Die ANT1-OE verringert den HSP-Verlust und wirkt diesem Effekt entgegen. In hypoxischen ANT1tg-NRCM war die

Expression von HSP75 und HSP27 gar nicht und die von HSP90 und CRYAB nur leicht reduziert. Der intrazelluläre Gehalt aller untersuchten HSPs war demnach unter diesen Kultivierungsbedingungen in ANT1tg-NRCM signifikant höher als in WT-NRCM. Diese Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass die ANT1-OE unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen zu einer verringerten Degradation und damit zu einer Stabilisierung des HSP-Gehaltes in NRCM führt. Auch diese Stabilisierung der HSPs durch die ANT1-OE trägt wahrscheinlich zu der ausbleibenden Caspaseaktivierung in ANT1tg-NRCM unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen bei.

Außerdem war die ANT1-OE bereits basal mit einer verstärkten HSP27-Phosphorylierung assoziiert, welche sich unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen noch weiter steigerte. Auch wenn die genauen Mechanismen zur Wirkungsweise von HSP27 noch nicht vollständig aufgeklärt sind, wird mit zunehmendem Kenntnisstand immer deutlicher, dass die protektive Funktion von HSP27 nicht nur allein durch die Proteinmenge, sondern auch durch den Phosphorylierungs- und Oligomerisierungszustand bestimmt wird. Grundsätzlich gilt, unphosphoryliertes HSP27 liegt in großen Oligomeren vor, wohingegen phosphoryliertes HSP27 in kleineren Komplexen oder sogar als Dimer vorliegt [131]. HSP27 greift in den unterschiedlichsten Zuständen in die Apoptose ein. Beispielsweise kann es als Multimer von 150-200 kDa mit Procaspase 3 interagieren und so die Aktivierung dieser verhindern [192]. Ein weiteres Beispiel ist die Inhibition der Fas vermittelten Apoptose durch kleine Phospho-Oligomere [252]. Darüber hinaus wurde kürzlich gezeigt, dass die Aktivierung von AKT von phosphoryliertem HSP27 induziert und so die Apoptose reduziert wird [244]. In den meisten Studien wird der Phosphorylierungszustand von HSP27 jedoch leider nicht betrachtet oder nicht zwischen den unterschiedlichen Phosphorylierungsstellen unterschieden, was eine Aussage über den entsprechenden Zusammenhang zwischen Funktion und Aktivierungszustand oftmals nicht zulässt.

Da die ANT1-OE unter Hypoxie gleichzeitig mit der verstärkten Phosphorylierung von HSP27 an beiden Phosphorylierungsstellen und einer verringerten Caspaseaktivierung einhergeht, ist davon auszugehen, dass in diesem Fall vorwiegend phosphoryliertes HSP27 die verantwortliche Komponente ist, die eine Caspaseaktivierung unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen verhindert. Dafür spricht auch, dass vermehrt phosphoryliertes HSP27 bei ischämischer Präkonditionierung in der Ausbildung der protektiven Funktion involviert ist [189].

Darüber hinaus wirkte sich die ANT1-OE auch auf die Sekretion der HSPs unter Hypoxie aus. Es kam zu einer vermehrten Freisetzung von HSP27, wohingegen in WT-NRCM keine veränderte Sekretion der HSPs zu beobachten war. Es ist daher denkbar, dass die vermehrte Freisetzung von HSP27 aus hypoxisch kultivierten ANT1tg-NRCM an dem protektiven Effekt in diesen Zellen mitwirkt.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass NRCM in der Lage sind HSPs aktiv zu sekretieren. Die ANT1-OE führt dabei zu einer vermehrten Sekretion von HSP90, HSP27 und CRYAB, wohingegen HSP75 trotz

verstärkter Proteinexpression in den NRCM verbleibt. Auch die Expression der kleinen HSPs ist bei ANT1-OE unter normoxischen Kultivierungsbedingungen verstärkt. Unter Hypoxie geht die ANT1-OE mit einer Verringerung des HSP-Verlustes, einer vermehrten Sekretion von HSP27, einer verstärkten Phosphorylierung von HSP27 und einem Ausbleiben der Caspaseaktivierung einher. Insgesamt lässt sich demnach festhalten, dass die ANT1-OE Einfluss auf den HSP27-Haushalt nimmt, wobei die HSP-Proteinexpression, der HSP-Aktivierungszustand und die Lokalisation der HSPs beeinflusst werden. Diese Effekte erklären die verbesserte Stressbewältigung ANT1tg-NRCM bei Serummangel oder Hypoxie und können die positive Wirkung auf das Zellüberleben begründen.

4.4 Einfluss der ANT1-OE auf die interzelluläre Kommunikation

Wie bereits erwähnt, sind NRCM in der Lage Hitzeschockproteine zu sekretieren. Die Funktion extrazellulärer HSPs wird kontrovers diskutiert [232]. Extrazelluläre HSPs wirken sich vor allem auf das Immunsystem aus. Sie können sowohl pro-inflammatorische [240] als auch anti-inflammatorische Signale induzieren [253-255]. Es wird davon ausgegangen, dass extrazelluläre HSPs als Komponenten eines Sensorsystems für Stressbedingungen im Extrazellularraum dienen, welches je nach Bedarf unterschiedliche Reaktionen in den Zellen hervorrufen kann [232;256]. Die Wirkung der ANT1-assoziierten HSPs als extrazelluläre Signalkomponenten auf NRCM ist noch unzureichend geklärt. Wie bereits in Abschnitt 4.3 erwähnt, war die vermehrte Sekretion dieser HSPs in ANT1-OE NRCM nicht von einer Caspaseaktivierung begleitet. Aus diesem Grund kann eine zellschädigende Wirkung der sekretierten HSPs auf ANT1tg-NRCM ausgeschlossen werden. Im dritten Teil dieser Arbeit wurde daher untersucht, wie sich eine Stimulation mit KÜAH und rhHSP27 auf die Aktivierung anti-apoptotischer Kinasen (AKT und Erk1/2) und auf den Gehalt intrazellulärer HSPs in NRCM auswirkt. Darüber hinaus wurde untersucht, ob die ANT1-OE diese Prozesse beeinflusst.

4.4.1 In NRCM erfolgt eine interzelluläre Kommunikation durch Komponenten des

KÜAH

Diese Arbeit zeigt, dass die Stimulation mit KÜAH bereits nach 30 Minuten zu einer erhöhten Aktivierung von Erk1/2 in ANT1tg-NRCM führte. Diese wurde bei langzeitiger Kultivierung wieder gesenkt. Stattdessen kam es zu einer verstärkten Aktivierung von AKT. Zimmermann *et al.* zeigten, dass die Aktivierung von AKT eine Deaktivierung von Erk1/2 induziert [257]. Dies erklärt, warum die verstärkte Aktivierung von AKT in ANT1tg-NRCM bei langzeitiger Stimulation mit KÜAH von einer reduzierten Erk1/2-Aktivierung begleitet ist. Auch WT-NRCM reagierten auf die Stimulation mit KÜAH. In diesen Zellen kam es allerdings erst bei langzeitiger Kultivierung zu einer Aktivierung von Erk1,

nicht aber Erk2. Dies deutet auf unterschiedliche Funktionen von Erk1 und Erk2 in NRCM hin. Dass Erk1/2 unterschiedliche, teilweise sogar entgegengesetzte Funktionen bei der Regulation der Proliferation bzw. der Zellzykluskontrolle zeigen, wurde z.B. von Sturgill *et al.* oder Lloyd *et al.* beschrieben [258;259]. Auch hinsichtlich der Apoptoseregulation wurden Unterschiede beobachtet. Beispielsweise führte eine Reduktion von Erk1, nicht aber von Erk2, in Krebszellen zu vermehrter Expression von anti-apoptotischem XIAP und zur Reduktion von pro-apoptotischem NOXA und PUMA [260]. Die meisten der in dieser Arbeit untersuchten Apoptosekomponenten wurden jedoch bei der Reduktion beider Kinasen identisch reguliert, so dass sich im Endeffekt kein Unterschied in der Überlebensrate der Zellen darstellte. Demnach konnte, obwohl die Beobachtungen für einen größeren Einfluss von Erk1 an der Regulation der Apoptose sprechen, nicht eindeutig gezeigt werden, dass sich Erk1 und Erk2 tatsächlich in ihrem Einfluss auf diesen Prozess unterscheiden.

Neben der Aktivierung von AKT und Erk1/2 führte die Stimulation mit KÜAH in ANT1tg-NRCM auch zu einer vermehrten Expression der kleinen HSPs und zur verstärkten Phosphorylierung von HSP27. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Kommunikation unter NRCM, vor allem bei ANT1-OE erfolgt, indem Komponenten, die in den Kulturüberstand abgegeben werden, intrazelluläre Signale induzieren. Dies unterstützt die Beobachtungen von Kim *et al.*, die demonstrierten, dass extrazelluläres HSP60 in adulten Rattenkardiomyozyten eine Signalinduktion hervorruft [183].

4.4.2 HSP27 als funktionelle Komponente des KÜAH

Extrazelluläres HSP27 wird vor allem mit der Induktion anti-inflammatorischer und damit anti-apoptotischer Komponenten assoziiert [253;254;261;262]. Aus diesem Grund wurde analysiert, ob die durch KÜAH induzierten Effekte auf darin enthaltenes HSP27 zurückzuführen waren. Zu diesem Zweck erfolgte die Blockade des im KÜAH enthaltenen HSP27 mittels spezifischer Antikörper und die Stimulation von NRCM mit rhHSP27.

Die aktivierenden Effekte des KÜAH auf AKT und Erk1/2 waren nicht auf darin enthaltenes HSP27 zurückzuführen. Dies lässt sich daraus schlussfolgern, dass die Blockade des endogenen HSP27 im KÜAH die ermittelten Veränderungen, bezüglich der protektiven Kinasen, nicht verhindern konnte. HSP90, welches in Tumorzellen bereits als externe Signalkomponente mit der Aktivierung von AKT und MAPK assoziiert wird [263], ist ein möglicher Kandidat, der neben HSP27 diese Aktivierungen induzieren kann. HSP90 wurde durch ANT1tg-NRCM ebenfalls verstärkt in den Kulturüberstand sekretiert. Darüber hinaus ist auch HSP70 eine Komponente, welche als extrazelluläres Protein die Aktivierung protektiver Kinasen induziert. Dass exosomales HSP70 zur Aktivierung von Erk1/2, nicht

aber zur Aktivierung von AKT in Kardiomyozyten adulter Ratten führt, ist kürzlich von Vicencio *et al.* beschrieben worden [233]. Die von Vicencio *et al.* durchgeführten Untersuchungen erfolgten über einen Stimulationszeitraum von nur 5 Minuten und unterschieden sich daher von unseren. Die Versuchsanordnung ähnelt demnach unseren Kurzzeitversuchen, in denen auch wir keine AKT-Aktivierung bei Stimulation mit KÜAH beobachtet haben. Das schließt eine AKT-Aktivierung durch exosomales HSP70 bei längerer Kultivierungsdauer aber nicht aus. Da HSP70 keine Komponente des ANT1-Interaktoms darstellte, war die Analyse der Funktion von extrazellulärem HSP70 nicht Bestandteil dieser Arbeit.

Die verstärkte Expression der kleinen HSPs und die vermehrte Aktivierung von HSP27 wurden im Gegensatz zur Aktivierung der protektiven Kinasen jedoch durch HSP27 im Kulturüberstand vermittelt, denn die Blockade des extrazellulären HSP27 durch spezifische Antikörper wirkte diesen Beobachtungen entgegen. Wie bereits erwähnt, geht eine vermehrte Expression und Aktivierung von HSP27 mit anti-apoptotischen Effekten, wie beispielsweise verringerter Caspaseaktivierung, einher (siehe Abschnitt 4.3)[192;240;264]. Dies lässt vermuten, dass die geringere Caspaseaktivierung in ANT1tg-NRCM, sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen, zumindest teilweise als Reaktion auf die Stimulation mit extrazellulärem HSP27 zu interpretieren ist. Allerdings führte weder die Stimulation mit KÜAH, noch die mit rhHSP27 in ANT1tg Kardiomyozyten unter normoxischen Bedingungen zu einer Reduktion der Caspaseaktivität im Vergleich zur Kultivierung in Mangelmedium. Dieses Ergebnis ist so zu interpretieren, dass die ANT1tg-NRCM bei Kultivierung in Mangelmedium bereits durch die Freisetzung der HSPs aus den Zellen während der Kultivierung, vor Apoptose als Reaktion auf Serummangel geschützt sind. Ein weiterer Zusatz von Komponenten des KÜAH zeigte keinen Unterschied zur Kultivierung in Mangelmedium, da es unter diesen Bedingungen nicht zu einer Caspaseaktivierung kam, die unterbunden hätte werden können. Gleiches gilt auch für die Stimulation mit rhHSP27 unter Hypoxie. Die Stimulation mit KÜAH unter Sauerstoffmangel jedoch, führte auch in ANT1tg-NRCM zu einer verstärkten Caspaseaktivierung. Die Stimulation mit KÜAH unter Hypoxie wirkt sich demnach auch bei ANT1-OE nicht protektiv auf die Zellen aus. Dies ist so zu erklären, dass bei Stimulation mit KÜAH, zusätzlich zu den während der Kultivierung freigesetzten Komponenten, auch noch die sekretierten Proteine des zugesetzten Kulturüberstandes enthalten sind. Zusammen mit dem Serummangel und der Hypoxieinduktion ist dies möglicherweise eine zu große Stresssituation für die NRCM, die auch bei zahlreichen Schutzmechanismen durch die ANT1-OE zu einer vermehrten Caspaseaktivierung und damit vermehrter Zellschädigung führt.

Obwohl die Veränderungen bezüglich der Expression der kleinen HSPs und der Aktivierung von HSP27 auf HSP27 als Komponente des Kulturüberstandes zurückzuführen waren, induzierte die Stimulation mit rhHSP27 nicht exakt dieselben Reaktionen wie KÜAH. Beispielsweise war der Effekt

beider Stimulationsreagenzien auf die Expression und Phosphorylierung von HSP27 in ANT1tg-NRCM an sich identisch, unterschied sich allerdings hinsichtlich der Intensität der Reaktionen. An dieser Stelle sei erwähnt, dass sich das endogene HSP27 von dem rhHSP27 im Westernblot durch unterschiedliches Laufverhalten (ohne Abb.) eindeutig voneinander unterscheiden. Eine vermehrte Detektion aufgrund additiver Effekte durch endogenes HSP27 und rhHSP27 kann demnach ausgeschlossen werden. Die Unterschiede in der Intensität der Reaktionen könnten allerdings auf unterschiedliche HSP27-Konzentrationen in den Stimulationsreagenzien zurückzuführen sein. Auch hinsichtlich der Expression von CRYAB gab es Unterschiede zwischen der Stimulation mit KÜAH und rhHSP27. In ANT1tg-NRCM wurde bereits bei kurzzeitiger Stimulation mit KÜAH eine Expressionserhöhung induziert. Die Stimulation mit rhHSP27 hingegen führte erst bei langzeitiger Kultivierungsdauer zu einer erhöhten Expression von CRYAB. Möglicherweise induziert HSP27 indirekt die Stimulation intrazellulärer Signalkaskaden, indem es mit anderen Proteinen interagiert, die erst im Laufe der Kultivierungsdauer freigesetzt werden. Dies würde auch erklären, warum KÜAH, welcher weniger HSP27 enthält als der Ansatz mit rekombinantem HSP27 (Westernblot-Analysen, nicht gezeigt), bereits bei kurzzeitiger Stimulation eine Expressionserhöhung von CRYAB verursacht und rhHSP27 erst bei langzeitiger Kultivierung. Bei der Stimulation mit KÜAH wären solche Komponenten bereits zur Stimulationsinduktion im Ansatz enthalten und können bereits nach 30 minütiger Kultivierungsdauer einen Effekt hervorrufen. Kaiser *et al.* zeigten, dass die Stimulation mit kombinierten extrazellulären HSPs, die Zytokinantwort von Monozyten im Vergleich zur Einzelstimulation variiert [265]. Dabei traten nicht nur additive Effekte auf. Dies spricht für ein „Netzwerkverhalten“ extrazellulärer Komponenten und unterstützt die o.g. Hypothese.

Möglicherweise sind die unterschiedlichen Ergebnisse auch auf die Unterschiede in der Proteinsequenz (Proteinhomologie von 82,2 %) oder einen unterschiedlichen Polymerisierungszustand von endogenem und rekombinantem HSP27 zurückzuführen.

Die Phosphorylierung von HSP27 im KÜAH, welche den Oligomerisierungszustand und auch den Aktivierungszustand des endogenen, extrazellulären HSP27 bestimmt, war mittels Westernblot nicht nachweisbar und deutet auf eine geringe Phosphorylierung und damit einen niedrigen Aktivierungszustand des rhHSP27 (unphosphoryliert) hin. Es wäre allerdings auch denkbar, dass der Anteil an phosphoryliertem HSP27 zwar unterhalb der Nachweisgrenze im Westernblot lag, aber dennoch biologisch aktiv war.

Darüber hinaus könnte das endogene HSP27 extrazellulär auch in membranassoziierter Form vorliegen und so eine höhere Aktivität zeigen. Für HSP70 ist dies in Bezug auf Makrophagen gezeigt worden [266]. HSPs, welche in Exosomen vorliegen, weisen lokal eine höhere Konzentration auf und induzieren dadurch eine effektivere Signalinduktion [232;266]. Dass Kardiomyozyten HSP27 in

Exosomen freisetzen, ist von Malik *et al.* beschrieben worden [249] und könnte ebenfalls die beobachteten Unterschiede zwischen endogenem HSP27 und rhHSP27 erklären.

Die Expression von HSP75 wurde in WT- und ANT1tg-NRCM nicht durch KÜAH und von rhHSP27 nur unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen induziert. Ähnliches galt auch für die Aktivierung von Erk1/2, welche erst unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen bei Stimulation mit rhHSP27 in beiden Zelltypen auftrat. Auch hier wäre eine mögliche Erklärung, dass HSP27 erst in Kombination mit Komponenten, die unter Hypoxie sekretiert werden, eine stimulierende Wirkung auf die HSP75-Expression und die Erk1/2-Aktivierung ausübt. Durch Interaktionen mit HSP27 könnte deren Struktur in einer Konformation gehalten werden, die für eine entsprechende Signalinduktion an Rezeptoren erforderlich ist. Neben der Stabilisierung sekretierter Proteine wäre es denkbar, dass externes HSP27 als Adapterprotein fungiert, die Rezeptoren an der Zelloberfläche moduliert und so die Sensitivität für bestimmte Signalmoleküle im Medium verändert. Dass HSP27 die Aktivität von Rezeptoren wie dem Androgenrezeptor oder Her2 moduliert, ist beschrieben [267;268]. Allerdings wurde nicht untersucht, ob diese Modulationen auf intra- oder extrazelluläres HSP27 zurückzuführen war. Da eine Stimulation von NRCM mit rhHSP27 jedoch stets mit einer erhöhten Expression des endogenen HSP27 einherging, ist eine Modifikation der Rezeptoren sowohl durch extrazelluläres, als auch durch intrazelluläres HSP27 möglich. Wenn die Signalmoleküle dann mit zunehmender Kultivierungsdauer oder unter Stresssituationen wie Hypoxie ins Kulturmedium freigesetzt werden, kann durch eine erhöhte Rezeptoraktivierung die Induktion intrazellulärer Signalkaskaden erfolgen. Ohne HSP27 wäre dies nicht möglich, da der Rezeptor nicht sensitiv genug für entsprechende Moleküle wäre. Ein weiterer Unterschied zwischen der Stimulation mit rhHSP27 und KÜAH lässt sich bezüglich der CRYAB-Expression unter Hypoxie feststellen. Die langzeitige Stimulation mit KÜAH führte sowohl in WT- als auch in ANT1tg-NRCM zu einer Abnahme der CRYAB-Proteinmenge, bei Stimulation mit rhHSP27 kam es jedoch zu einer Zunahme der CRYAB-Expression. Dieser Unterschied lässt sich, ähnlich wie die Caspaseaktivierung bei Stimulation mit KÜAH und gleichzeitiger Hypoxieinduktion so erklären, dass der Kulturüberstand alle Komponenten enthält, die im Endeffekt über einen Zeitraum von 48 h unter hypoxischen Bedingungen ohne Serum von den NRCM freigesetzt wurden. Es ist denkbar, dass dies einen zu hohen Stress signalisiert und so zu einer CRYAB-Degradation führt. Wie bereits erwähnt, war schon nach 24 h Kultivierung in Mangelmedium unter Hypoxie eine Abnahme der CRYAB-Menge im Vergleich zur normoxischen Kultivierung zu beobachten, dieser Effekt wurde durch die zusätzlichen Stresskomponenten im Kulturüberstand verstärkt. Bei Stimulation mit rhHSP27 waren diese zusätzlichen Komponenten des KÜAH nicht enthalten, was das Ausbleiben der Reduktion von CRYAB in diesem Stimulationsansatz erklärt. Mehr noch, durch Stimulation mit rhHSP27 konnte der Verlust des CRYAB, welcher unter hypoxischer Kultivierung ohne Serum auftrat, neutralisiert werden. Gleiches galt auch für die Hypoxie induzierte Reduktion der HSP27-

Proteinmenge in NRCM. Die Stimulation mit rhHSP27 zeigt damit einen präkonditionierenden Effekt auf NRCM hinsichtlich der Expression der kleinen HSPs. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass ANT1tg-NRCM vermehrt HSP27 in den Kulturüberstand freisetzen und so einen Präkonditionierungseffekt induzieren. Dieser geht mit einer Stabilisierung der kleinen HSPs unter Hypoxie einher und erklärt die ausbleibende Caspaseaktivierung bei in Mangelmedium kultivierten, hypoxischen ANT1tg-NRCM. Die Expressionserhöhung und vermehrte Phosphorylierung von HSP27 ist bei ischämischer Präkonditionierung mehrfach beschrieben worden [190;191;269]. Auch bei Präkonditionierung durch andere Stimulanzen wie Hitze oder Isofluran war eine vermehrte Expression und/oder Aktivierung von HSP27 zu beobachten [270;271]. HSP27 ist demnach eine zentrale Komponente beim Schutz von kardialem Gewebe durch Präkonditionierungseffekte. Die ANT1-OE trägt demnach durch die vermehrte Sekretion von HSP27 zur Zellstabilität mittels Präkonditionierung bei. Die Stimulation von WT-NRCM mit rhHSP27 oder KÜAH führte jedoch nicht zu einer verringerten Caspaseaktivierung bei Serumangel oder hypoxischem Stress und konnte den Präkonditionierungseffekt in diesen Zellen nicht bestätigen. Dieses Ergebnis zeigt, dass der protektive Effekt nicht allein auf Komponenten des KÜAH zurückzuführen ist. Eine Erklärung dafür, dass rhHSP27 und KÜAH vor allem in ANT1tg-NRCM präkonditionierend wirken, kann die veränderte Rezeptorausprägung und die damit assoziierte Veränderung der Fähigkeit zur Wahrnehmung extrazellulärer Stimuli sein (siehe Abschnitt 4.4.3).

Die Stimulation mit KÜAH führte bei ANT1-OE zu einer verstärkten Expression der kleinen HSPs. Dass diese unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen nicht aufrechterhalten wurden, ist so zu erklären, dass durch Kultivierung in Mangelmedium in Kombination mit Hypoxie und zusätzlicher Stimulation von KÜAH ein zu großer Stress auf die Zellen ausgeübt wurde, welcher auch durch ANT1-OE nicht kompensiert werden konnte. Diese Hypothese wird auch von der Beobachtung gestützt, dass die Stimulation mit KÜAH bei gleichzeitiger Hypoxieinduktion auch in ANT1tg-NRCM zu einer Caspaseaktivierung führte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass HSP27 nicht die alleinige Komponente des KÜAH ist, die sich auf das intrazelluläre Signaling auswirkt. Die Aktivierung von AKT und Erk1/2 erfolgte zwar durch KÜAH, wurde aber nicht durch darin enthaltenes HSP27 vermittelt. HSP27 nimmt dagegen Einfluss auf den HSP-Haushalt von NRCM, speziell bezüglich der kleinen HSPs, wobei auch hier Unterschiede zwischen den Stimulationen mit KÜAH und rhHSP27 auftraten. Diese könnten auf diverse Unterschiede zwischen endogenem und rekombinantem HSP27, wie z.B. Aktivierungszustand, Homologie, Konzentration und Assoziation mit Membranvesikeln zurückzuführen sein. Besonders hervorzuheben ist dabei, dass rhHSP27 einen präkonditionierenden Effekt auf ANT1tg-NRCM ausübt und so die Degradation der kleinen HSPs unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen verhindert. Dieser Effekt konnte nur unter normoxischen Bedingungen durch KÜAH bestätigt werden, was

wahrscheinlich auf zu viele Stresskomponenten bei der Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen mit KÜAH zurückzuführen ist. Diese überdecken in der Summe mit dem zusätzlichen Stress der hypoxischen Kultivierungsbedingungen vermutlich den protektiven Effekt von sekretiertem HSP27. Die ANT1-OE führt zu einer verstärkten Sekretion von HSP27, was wiederum eine vermehrte HSP27-Expression und HSP27-Phosphorylierung in ANT1tg-NRCM induziert und damit den präkonditionierenden Effekt bei Hypoxie (ohne zusätzliche Stimulation mit KÜAH) unterstützt.

4.4.3 Die ANT1-OE führt zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber extrazelluläre Stimuli

Auffällig ist, dass die ANT1tg-NRCM auf die Stimulation mit KÜAH und teilweise auch auf die Stimulation mit rhHSP27 sensitiver reagierten. Dies bedeutet, dass die Signalwahrnehmung von Kardiomyozyten an ANT1 gekoppelt ist. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist eine Funktion des ANT als Rezeptor. Der ANT ist in der Plasmamembran lokalisiert und kann daher durchaus eine solche Funktion übernehmen [26;28]. Eine erhöhte ANT-Expression wäre demnach mit einer vermehrten Rezeptorpräsenz vergleichbar. Da mehr „Rezeptormoleküle“ vorhanden sind kann die Signalweiterleitung verstärkt erfolgen. Extrazelluläre Komponenten können mit dem ANT interagieren und zur Freisetzung von Komponenten aus dessen Interaktom beitragen. Dies würde zur Induktion intrazellulärer Signale führen. Die Bestätigung der Rezeptorfunktion von ANT bleibt jedoch Bestandteil weiterer Untersuchungen. Loers *et al.* zeigten jedoch, dass ANT, durch die Interaktion mit Oberflächenrezeptoren wie L1, deren Funktion beeinflusst [26]. Außerdem wurde kürzlich von Roussel *et al.* gezeigt, dass eine Palmitoylcarnithin induzierte Fehlfunktion des ANTs zu post-translationalen Modifikationen des Ryr2 führt und so dessen Aktivität beeinflusst [216]. Dass die ANT1-OE mit verringerter TGFβRII-Expression einhergeht, wurde von Heger *et al.* beschrieben [45]. Darüber hinaus konnte durch Jang *et al.* gezeigt werden, dass die Reduktion von ANT2 eine Degradation von Her2/neu, einem weiteren Rezeptor, induziert [272]. Zusätzlich beschreibt diese Dissertation, dass die ANT1-OE unter normoxischen Bedingungen mit einer verstärkten TLR2-Expression und unter Hypoxie mit einer vermehrten TLR4-Expression einhergeht. Dass HSPs über diese Rezeptoren intrazelluläre Signale induzieren, wurde bereits mehrfach bewiesen [164;177;181]. Die ANT1-OE beeinflusst demnach das extrazellulär stimulierte Signaling durch Modulation der Expression oder der Funktion unterschiedlicher Rezeptoren.

Es bleibt festzuhalten, dass die ANT1-OE hinsichtlich der Aktivierung anti-apoptotischer Kinasen und der Expression von HSPs mit einer verstärkten Sensitivität gegen externe Stimuli wie KÜAH und rhHSP27 einhergeht. Die ANT1-OE induziert eine veränderte Expression der kardialen TLR2/4, was die veränderte Signalwahrnehmung der ANT1-transgenen Zellen erklärt.

4.5 Beteiligung der kardialen TLR2 und TLR4 an der in ANT1tg-NRCM veränderten Signalinduktion

Toll-Like-Rezeptoren werden in kardialen Gewebe exprimiert, dabei sind TLR2 und TLR4 die am stärksten exprimierten Isoformen [170]. Die Funktion dieser Rezeptoren ist in nicht immunologisch aktiven Zellen, wie z.B. Kardiomyozyten, noch nicht vollständig aufgeklärt. In dieser Arbeit wurde untersucht, wie sich eine ANT1-OE auf die Expression von TLR2 und TLR4 auswirkt und ob die durch KÜAH und rhHSP27 induzierten Veränderungen bezüglich der HSP-Expression und der Aktivierung anti-apoptotischer Kinasen in NRCM durch TLR2/4 vermittelt wurden.

4.5.1 Die Unterschiede in der TLR-Expression sind nicht allein auf die ANT1-OE zurückzuführen

Diese Arbeit zeigt eine erhöhte TLR2-Expression in ANT1tg-NRCM bei 24 stündiger Kultivierung in Mangelmedium. Diese Erhöhung war bei kurzzeitiger Kultivierung nicht zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass die erhöhte TLR2-Expression ein Anpassungsmechanismus auf den Serummangel im Kulturüberstand darstellt, der verstärkt in ANT1tg-NRCM erfolgt. Unsere Studie zeigt, dass rhHSP27 die Stimulation der TLR2-Expressionserhöhung in beiden Zellformen induziert. Das endogene HSP27 verursachte jedoch nur in WT-NRCM eine Expressionserhöhung von TLR2. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass die TLR2-Expressionserhöhung in ANT1tg-NRCM bei Kultivierung in Mangelmedium ein Anpassungsmechanismus auf Serummangel, nicht aber eine Reaktion auf das durch ANT1tg-NRCM sekretierte HSP27 ist. Die fehlende Anpassung der TLR2-Expression an den Serummangel bei kurzzeitiger Stimulation ist durch einen zeitabhängigen Effekt zu erklären. Möglicherweise verhindern Serumkomponenten eine TLR2-Expressionserhöhung, so dass diese bei Kultivierung in Vollmedium nicht nachweisbar ist. Außerdem wäre es denkbar, dass die Sekretion der HSPs bei Kultivierung in Vollmedium nicht ausreichend stark ist und so eine HSP-vermittelte TLR2-Expressionserhöhung nicht induziert wird. Dies könnte neben dem zu starken Hintergrundsignal durch Serumkomponenten, auch eine Erklärung dafür sein, dass die HSPs im Kulturüberstand in Vollmedium kultivierter NRCM nicht detektierbar waren (Daten nicht gezeigt). Dem widerspricht allerdings, dass viele Arbeiten eine Sekretion von HSPs unter Basalbedingungen beschrieben [246;247;273;274]. Dass HSPs erst unter Serummangel sekretiert werden, ist daher unwahrscheinlich und unterstützt die Hypothese, dass Serumkomponenten die HSP-vermittelte TLR2-Expression verhindern.

Auch die Expression von TLR4 wird nicht per se durch die ANT1-OE induziert. Die enorme TLR4-Expressionserhöhung tritt in diesen Zellen erst bei hypoxischer Kultivierung auf. Diese Beobachtung

zeigt, dass die Expression von TLR4 zwar nur bei ANT1-OE erfolgt, jedoch letztendlich als Anpassungsmechanismus auf hypoxischen Stress stattfindet. Die TLR4-Expression wird nicht durch interzelluläre Kommunikation reguliert, da weder bei kurzzeitiger, noch bei langzeitiger Stimulation mit KÜAH eine Veränderung der TLR4-Expression beobachtet wurde.

Die ANT1-OE an sich führt damit nicht zu einer veränderten TLR-Expression und reguliert deren Expression auch nicht durch interzelluläre Kommunikation. ANT1tg-NRCM sind jedoch flexibler in der Modulation der Rezeptorexpression und passen sich dadurch besser an Stresssituationen wie Serummangel oder Hypoxie an.

4.5.2 Die veränderte TLR2/4-Expression in ANT1tg-NRCM geht mit einer anti-apoptischen Wirkung einher

Die Funktion von kardialen TLR2 wird unterschiedlich diskutiert. Ein TLR2-KO in Doxorubicin behandelten Mäusen wirkte sich durch eine verringerte kardiale Apoptose aus [275]. Andererseits zeigt die Aktivierung von TLR2 in Kardiomyozyten eine anti-apoptische Wirkung bei oxidativem Stress durch H₂O₂ [276]. Auch bei der Chagas-Krankheit, welche mit einer vermehrten Expression von TLR2 in Kardiomyozyten einhergeht, zeigt die TLR2-Aktivierung einen anti-apoptischen Effekt [277]. Der Unterschied zwischen beiden Beobachtungen besteht darin, dass die TLR2-Funktion im ersten Beispiel im gesamten Herzen betrachtet wurde, wohingegen die anti-apoptische Funktion des TLR2 bei der Betrachtung von isolierten Kardiomyozyten auftrat. Diese Beobachtungen zeigen demnach eine anti-apoptische Funktion von TLR2 im Herzen, wenn dieser vermehrt in Kardiomyozyten exprimiert wird. Die ANT1-OE ermöglicht den NRCM, sich an äußere Bedingungen wie Serummangel, durch eine vermehrte TLR2-Expression anzupassen. Diese Arbeit zeigt einen protektiven Effekt der ANT1-OE auf Serummangel induzierten Stress, da nach 24 stündiger Kultivierung bei Serummangel eine geringere Caspaseaktivierung im Vergleich zu WT-NRCM beobachtet wurde. Darüber hinaus führte die Blockade von TLR2/4 durch den Inhibitor OxPAPC sowohl in WT- als auch in ANT1tg-NRCM zu einem signifikanten Anstieg der Caspaseaktivierung (Abb. 3.19). Dieses Ergebnis zeigt, dass TLR2 und TLR4 eine anti-apoptische Wirkung in NRCM ausüben. Darüber hinaus ist der Anstieg der Caspaseaktivierung in ANT1tg-NRCM wesentlich stärker als in WT-NRCM. Das impliziert, dass die erhöhte Menge an TLR auch einen größeren Effekt auf die Caspaseaktivierung nimmt. Die ANT1-OE in NRCM führt demnach bei Serummangel induziertem Stress, zu einer vermehrten TLR2-Expression, welche mit einem anti-apoptischen Effekt einhergeht.

Unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen wird die TLR2-Expression in ANT1tg-NRCM wieder deutlich herunter reguliert. Stattdessen kommt es in diesen Zellen zu einer vermehrten Expression

von TLR4, während sich die TLR4-Expression in WT Zellen nicht verändert. ANT1tg-NRCM reagieren also, wie bereits erwähnt, mit einer veränderten TLR-Präsentation auf Stress. Die vermehrte TLR4-Expression unter hypoxischen Bedingungen spielt bei der vermehrten Stressresistenz der ANT1tg Kardiomyozyten eine wichtige Rolle. Es wurde gezeigt, dass Stresssituationen wie Ischämie zu einer TLR4-Expressionserhöhung im Myokard führen. Eine TLR4 Expressionserhöhung in isolierten Kardiomyozyten nach Hypoxie, wurde jedoch nicht gezeigt (Review [170]). Diese Beobachtung wurde in unserer Studie bestätigt, denn die TLR4-Expression in WT-NRCM war unter Hypoxie, im Gegensatz zu ANT1tg-NRCM, nicht verändert. Auch die Funktion des kardialen TLR4 wird kontrovers diskutiert. Beispielsweise wurde mehrfach gezeigt, dass LPS, ein TLR4-Agonist, bei Ischämie eine anti-apoptotische Wirkung auf Kardiomyozyten hat [278-280]. Auch IL-10, führte zu einer Expressionserhöhung und Aktivierung von TLR4 und war mit einer anti-apoptotischen Wirkung in Kardiomyozyten assoziiert [281]. Zhu *et al.* zeigten ebenfalls, dass eine TLR4-Aktivierung in Kardiomyozyten eine anti-apoptotische Funktion bei Zellschädigung durch Serummangel induziert [282]. Entgegengesetzt zu diesen Beobachtungen, beschrieben andere Studien aber auch eine pro-apoptotische Funktion von TLR4. Beispielsweise besitzen TLR4-KO Mäuse eine bessere myokardiale Funktion nach Ischämie/Reperfusion als vergleichbare WT-Tiere [283]. Riad *et al.* beobachteten sogar eine reduzierte Mortalitätsrate in TLR4-KO Mäusen nach Myokardinfarkt [284]. Es wird vermutet, dass die unterschiedlichen Beobachtungen darin begründet liegen, dass in vitro nur die Effekte der kultivierten Zellen eine Rolle spielen, in Geweben jedoch auch die TLR der Immunzellen eine Funktion übernehmen [282]. Auch unsere Versuche demonstrieren, dass eine erhöhte TLR4-Expression in NRCM eine anti-apoptotische Wirkung hat, da die deutlich stressresistenteren ANT1tg-NRCM verstärkte anti-apoptotische Reaktionen wie beispielsweise verringerte Caspaseaktivierung unter Hypoxie zeigten. Unter diesen Kultivierungsbedingungen führte die Blockade der TLR2/4 zu einer vermehrten Caspaseaktivierung, wobei der Effekt in ANT1tg-NRCM stärker auftrat als in WT-NRCM. Auch diese Beobachtungen belegen die anti-apoptotische Wirkung der ANT1-OE bedingten TLR4-Expressionserhöhung unter Hypoxie.

ANT1tg-NRCM zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber extrazelluläre Stimuli, z.B. bei Stimulation mit KÜAH oder rhHSP27. Diese ist unter normoxischen Kultivierungsbedingungen durch die erhöhte TLR2-Expression und unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen durch die erhöhte TLR4-Expression zu erklären. Diese erhöhte Sensitivität, welche sich durch verstärkte Reaktionen auf extrazelluläre Stimuli und damit verstärkt aktivierte protektive Signalwege darstellt, bietet den NRCM Schutz vor Stress wie Hypoxie oder Serummangel.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die ANT1-OE in NRCM dazu führt, dass eine veränderte TLR-Expression als Antwort auf Stresssituationen erfolgt. Die TLR2-Expression ist zwar durch rhHSP27 stimulierbar, eine Expressionsinduktion durch KÜAH in ANT1tg-NRCM konnte jedoch nicht beobachtet werden. Die TLR2-Modifikation erfolgt daher vorwiegend als Anpassung auf Stress durch Serummangel. Die TLR4-Expression wird ebenfalls nicht durch interzelluläre Kommunikation stimuliert und erfolgt vorwiegend als Anpassung auf hypoxische Kultivierungsbedingungen. Die erhöhte Flexibilität in der Rezeptorpräsentation ANT1tg-NRCM, welche sich durch die erhöhte Expression von TLR2 und TLR4 in ANT1tg-NRCM darstellt, macht die NRCM sensitiver gegenüber extrazelluläre Stimuli und ermöglicht so eine bessere Anpassung an Stresssituationen. Dies wird durch eine geringere Caspaseaktivierung bei hypoxischem Stress oder Serummangel deutlich und zeigt demnach einen protektiven Effekt auf die Zellen. Außerdem wirkt sich die Blockade von TLR2 und TLR4 pro-apoptotisch durch drastische Caspaseaktivierung aus, was die protektive Funktion der TLR2/4 in NRCM untermauert. WT-NRCM sind nicht so anpassungsfähig wie ANT1tg-NRCM. Sie zeigten keine Änderung der TLR2/4-Expression bei extrazellulärem Stress und es kommt zu einer höheren Caspaseaktivierung bei Serummangel und Hypoxie im Vergleich zu ANT1tg-NRCM. Die ANT1-OE in NRCM wirkt sich demnach durch eine veränderte TLR-Expression aus, was den anti-apoptotischen Effekt in diesen Zellen unterstützt.

4.5.3 Die Aktivierung protektiver Signalwege, sowie die Expression anti-apoptotischer HSPs wird durch TLR vermittelt

Die Blockade von TLR2/4 zeigte, dass ein Großteil der durch interzelluläre Kommunikation beobachteten Effekte auf das AKT- und Erk1/2-Signaling sowie auf die HSP- Expression in WT und ANT1tg-NRCM durch TLR2 und/oder TLR4 vermittelt werden. Eine Ausnahme stellte die KÜAH vermittelte Expressionsverringering von HSP75 bei kurzzeitiger Stimulation dar. Die Veränderung in der HSP75-Expression als Reaktion auf rhHSP27 konnte zwar durch die Blockade der TLR verhindert werden, allerdings galt dies nicht für den KÜAH vermittelten Effekt. Dieser war nicht auf das darin enthaltene endogene HSP27 zurückzuführen. Dies wurde dadurch bestätigt, dass die Blockade des im KÜAH enthaltenen HSP27 durch Hsp27-spezifische Antikörper, die induzierte Reduktion der HSP75-Expression nicht neutralisierte. Die Expression von HSP75 wird demnach zwar durch interzelluläre Kommunikation reguliert, ist jedoch nicht auf sekretiertes HSP27 zurückzuführen und erfolgt auch nicht durch TLR2 oder TLR4.

Eine weitere Ausnahme war die Regulation des Erk1/2-Signalings. Es zeigte sich, dass die Regulation von Erk1 sich von der von Erk2 unterschied. Die Aktivierung des Erk1-Signalings wird sowohl bei Stimulation mit rhHSP27, als auch bei Stimulation mit KÜAH nur in ANT1tg-NRCM durch die

Signalweiterleitung der TLR2/4 vermittelt. Dies könnte auf die vermehrte Expression dieser Toll-Like-Rezeptoren und auf die damit verbundene Erhöhung der Rezeptoraktivierung in ANT1tg-NRCM zurückzuführen sein.

Die Erk2-Aktivierung hingegen wird unabhängig vom Phänotyp der Zellen, aber abhängig vom Stimulationsreagenz durch TLR2/4 vermittelt. Hier kommt es nur bei Stimulation mit rhHSP27 zu einer Signalweiterleitung durch TLR. Demnach erfolgt zwar eine interzelluläre Kommunikation durch KÜAH, diese ist aber nicht TLR2/4 vermittelt. Da die rhHSP27 vermittelten Effekte durch Blockade der TLR unterbunden werden konnten, lässt sich schlussfolgern, dass der Effekt, den KÜAH auf die Aktivierung von Erk2 nimmt, nicht, oder nur zu einem geringen Teil, durch darin enthaltenes HSP27 verursacht wurde. Auch an dieser Beobachtung wird deutlich, dass Erk2 und Erk1 unterschiedlich reguliert werden und unterstützt die Hypothese, dass diese zumindest partiell unterschiedliche Funktionen in der Apoptoseregulation übernehmen (vergleiche Abschnitt 4.4.1).

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass die Stimulation anti-apoptotischer Signalwege in NRCM durch extrazelluläre Stimuli in Folge interzellulärer Kommunikation erfolgt. Dabei wird die Expression der kleinen HSPs, sowie die Aktivierung von HSP27, Erk1 und AKT durch TLR2/4 vermittelt. Die Regulation der Aktivierung von Erk2 und die Expressionsänderung von HSP75 erfolgen nicht durch die Stimulation von TLR2/4. Der in ANT1tg-NRCM beobachtete protektive Effekt, der mit einer erhöhten TLR2/4-Expression assoziiert werden kann, ist demnach zwar auf die Aktivierung von Erk1, AKT und HSP27, sowie auf die verstärkte Expression der kleinen HSPs, nicht aber auf die Aktivierung von Erk2 oder die veränderte HSP75-Expression zurückzuführen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Der Adenin-Nukleotid-Translokator (ANT) ist ein vielseitiges Protein, welches neben der Funktion als ADP-ATP-Austauscher in vielen weiteren Prozessen eine Rolle spielt. Die bekanntesten Beispiele hierfür sind die Apoptose und die Oxidative Phosphorylierung. Darüber hinaus ist bekannt, dass eine ANT1-Überexpression (ANT1-OE) unter hypoxischen Bedingungen mit vermehrt aktivierten Proteinkinasen und verringerter Apoptose einhergeht. Wie die Regulation dieser Prozesse in Abhängigkeit von ANT erfolgt, ist noch weitestgehend unbekannt.

Interaktionsstudien bestätigten, dass der ANT mit einer Vielzahl zellulärer Komponenten assoziiert ist, die für das Zellüberleben essentiell sind. Es fanden sich vor allem Komponenten des Energiestoffwechsels, der Muskelkontraktion, des Zytoskelettes, des Proteinmetabolismus und der Apoptose im ANT1-Interaktom. Besonders interessant war dabei die bisher uncharakterisierte Assoziation des ANT1 mit den kleinen Hitzeschockproteinen HSP27 und CRYAB. Neben HSP27 und CRYAB fanden sich auch HSP90 und HSP75 im detektierten Proteinkomplex. Da diese Komponenten an einer Vielzahl anti-apoptotischer Mechanismen beteiligt sind, die über die Regulation der mitochondrialen Permeabilitätspore hinaus gehen, wurden die Expression, die Funktion und die Bindung dieser Komponenten an das ANT1-Interaktom, in Abhängigkeit von einer ANT1-OE, genauer analysiert.

Diese Arbeit zeigt, dass die ANT1-OE zu einer vermehrten Expression und Aktivierung von HSP27 führte, was von einer geringeren Caspaseaktivierung bei Serumangel und hypoxisch induziertem Stress begleitet war.

Darüber hinaus führte die ANT1-OE zu einer vermehrten Bindung, vor allem der kleinen HSPs an das ANT1-Interaktom. Dies ermöglichte unter Hypoxie eine vermehrte Freilassung dieser Komponenten aus dem Proteinkomplex und war von einer verstärkten Sekretion dieser HSPs aus den ANT1tg-NRCM ins Kulturmedium begleitet.

Es stellte sich die Frage, ob sekretierte Proteine, speziell HSP27, eine interzelluläre Kommunikation zwischen NRCM vermitteln und ob die ANT1-OE diese Kommunikation beeinflusst. Sowohl in WT- als auch in ANT1tg-NRCM war eine Signalantwort auf extrazelluläre Stimuli wie KÜAH und rhHSP27 detektierbar, wobei die Reaktionen in ANT1tg-NRCM wesentlich stärker ausfielen als in WT-NRCM.

Das in den Kulturüberstand freigesetzte HSP27, induzierte in ANT1tg-NRCM eine vermehrte Expression und Aktivierung von HSP27, sowie eine vermehrte Expression von CRYAB. Andere Komponenten des KÜAH induzierten, ebenfalls verstärkt in ANT1tg-NRCM, die Aktivierung protektiver Kinasen wie AKT und Erk1/2.

Diese Arbeit zeigt also, dass die ANT1-OE die Aktivierung und Expression protektiver Signalkomponenten nicht nur durch eine vermehrte Sekretion von Proteinen in den Kulturüberstand beeinflusst, sondern auch, dass die ANT1-OE eine erhöhte Sensibilität der NRCM gegenüber extrazelluläre Stimuli induziert.

Da bereits bekannt ist, dass extrazelluläre HSPs Toll-Like-Rezeptoren (TLR) stimulieren, wurde ermittelt ob diese Rezeptoren an dem beschriebenen Effekt beteiligt sind. Dies erfolgte durch die Analyse der Expression und der Funktion der kardialen TLR2 und TLR4.

Es zeigte sich, dass ANT1tg-NRCM auf Stresssituationen wie Hypoxie oder Serummangel, mit einer vermehrten Flexibilität in ihrer TLR-Expression reagieren. ANT1tg-NRCM reagierten auf Serummangel mit einer vermehrten TLR2- und auf hypoxischen Stress mit einer vermehrten TLR4-Expression. In WT-NRCM erfolgte diese Anpassung nicht. Die Blockade der genannten TLRs mit OxPAPC zeigte zusätzlich, dass die Expressionserhöhung und Aktivierung der kleinen HSPs, von Erk1 und AKT, welche durch KÜAH und/oder rhHSP27 vermittelt werden, durch diese Rezeptoren an die ANT1tg-NRCM weitergegeben werden. Darüber hinaus führte die TLR2/4-Blockade, sowohl bei Serummangel als auch bei hypoxischem Stress, zu einem deutlichen Anstieg der Caspaseaktivierung in beiden Zellformen, vermehrt jedoch in ANT1tg-NRCM. Dies unterstreicht die anti-apoptotische Funktion dieser Rezeptoren in NRCM und verdeutlicht, dass der anti-apoptotische Effekt von der Rezeptorexpression abhängt.

Es wird ersichtlich, dass der ANT1 eine zentrale Komponente des intrazellulären Signalings ist, die an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt ist. Eine besondere Funktion wird dem ANT1 als Komponente des anti-apoptotischen Signalings zuteil, da ANT1 dieses an den unterschiedlichsten Stellen modulieren kann. Dabei beeinflusst die ANT1-OE die interzelluläre Kommunikation zwischen NRCM. Dies erfolgt 1. durch die vermehrte Freisetzung von Signalmolekülen in den Kulturüberstand und 2. durch eine Veränderung der Rezeptorpräsentation, die die Zellen zusätzlich sensitiver für externe Stimuli macht. Beide Mechanismen tragen zu einer vermehrten Aktivierung protektiver Prozesse in NRCM bei und bieten Schutz vor Stressstimuli wie Hypoxie oder Serummangel. Damit bietet die kardiomyozytäre Überexpression von ANT1 großes Potential zur Behandlung ischämischer Schädigungen in Herzgewebe.

6. SUMMARY

The adenine nucleotide translocase (ANT) is a multifunctional protein, which, beside its function as ADT/ATP exchanger, is involved in many other cellular processes. Some well known examples are apoptosis and oxidative phosphorylation. Previous findings indicated that overexpression of ANT1 (ANT1-OE) is associated with activation of anti-apoptotic signaling and reduced apoptosis, but it is mostly unknown how these processes are regulated dependent on ANT.

Interaction analysis confirmed that ANT1 is associated with many cellular components, which are essential for cell survival. Most of the identified components of the ANT1-interactome belong to the energy metabolism, muscle contraction, cytoskeleton, protein metabolism and apoptosis. This work identified an so far unknown association of ANT1 with the small heat shock proteins HSP27 and CRYAB. As well as these chaperones, we also identified HSP75 and HSP90 as ANT1 associated proteins. Because of their role as regulators of many anti-apoptotic mechanisms, alongside the regulation of the MPTP, we analyzed the expression, the function and the association of these heat shock proteins with the ANT1-interactome.

This work shows that ANT1-OE led to an increase in expression and activation of HSP27. These findings were accompanied by a decrease in caspase activation at serum deprivation and hypoxic stress.

The ANT1-OE further led to an increased binding of small HSPs to the ANT1-interactome. This higher binding enables an increased release of those components under hypoxia. This release from the ANT1-interactome was accompanied by an increase in the secretion of those HSPs to the extracellular space.

We further investigated if an intercellular communication between NRCM is induced by secreted proteins, especially by HSP27, and if this communication is influenced by the overexpression of ANT1. WT-, as well as ANT1tg-NRCM reacted to extracellular stimuli like KÜAH (culture supernatant generated from hypoxic cultured ANT1tg-NRCM) or rhHSP27. These experiments also exhibit a higher sensitivity of ANT1tg-NRCM in comparison to WT-NRCM.

The HSP27 of KÜAH induced an increase of the expression of HSP27 and CRYAB, as well as an increased activation of HSP27 in ANT1tg-NRCM. Other indefinite components of KÜAH further induced an increase in activation of protective kinases like AKT and Erk1/2, again in ANT1tg-NRCM.

This study indicates that overexpression of ANT1 influences the activation and expression of protective signaling components by secretion of proteins to the extracellular space of NRCM, as well as by elevated sensitivity of NRCM to extracellular stimuli. This led to the question, how the higher sensitivity to extracellular stimuli is realized. It is well established, that extracellular HSPs signal

through Toll like receptors (TLR). For that reason we analyzed the expression and the function of the most abundant TLRs of cardiomyocytes, TLR2 and TLR4 in ANT1tg-NRCM.

The completed experiments indicated that ANT1tg-NRCM exhibit a higher flexibility on presenting their TLRs. Serum deprivation led to increased TLR2 expression in ANT1tg-NRCM, while hypoxia led to increased TLR4 expression. WT-NRCM did not exhibit an adaptive expression of TLRs to stress conditions. Inhibition of TLR-function with OxPAPC indicated that the increase in expression and activation of small HSPs, AKT, and Erk1, which was induced in ANT1tg-NRCM by stimulation with KÜAH or rhHSP27, was mediated by TLR2 and/or TLR4. Furthermore, the inhibition of TLR2/4 led to a drastic increase of caspase activation at serum deprivation and hypoxic stress in both cell types, whereby the increase was higher in ANT1tg-NRCM. This emphasizes the anti-apoptotic function of the TLR2 and TLR4 in NRCM and that this effect is dependent on the amount of expressed TLR2/4.

This work shows that ANT1 is a central component of the intracellular signaling, which is involved in many cellular processes. ANT1 holds a special function as component of the anti-apoptotic signaling, because it regulates this process at many different points. Our results show that overexpression of ANT1 influences the intercellular communication of NRCM. This is due to: 1. Increased secretion of signaling components to the culture supernatant, and 2. Changes in the receptor expression, which leads to higher sensitivity of ANT1tg-NRCM to extracellular stimuli. Both mechanisms take part in mediating an increase of activated protective processes in NRCM and result in protection against stresses like serum deprivation or hypoxia. This shows the high potential of ANT1 in order to reduce ischemic damages in the heart.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
14-3-3ζ	14-3-3 protein zeta/delta
2OGDH	2-Oxoglutarat-Dehydrogenase
<i>A. bidest</i>	zweifach destilliertes Wasser
<i>A. dest</i>	destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
Acyl-CoA	Acyl-Coenzym A
ADP	Adenosindiphosphat
AKT	Proteinkinase B/AKT
ANT1	Adenin-Nukleotid-Translokator1
ANT1-OE	ANT1-Überexpression
ANT1tg	ANT1-transgen
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriophosphat
Bax	Bax-Protein
Bcl2	Bcl2-Protein
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BTB	Bromthymolblau
ca.	Circa
Ca ²⁺	Calciumionen
CCD	<i>Chip-Camera-Detection</i>
CCT3	<i>T-complex protein 1 subunit gamma</i>
CI	Komplex I der Atmungskette
CII	Komplex II der Atmungskette
CIII	Komplex III der Atmungskette
CIV	Komplex IV der Atmungskette
CO ₂	Kohlenstoffdioxid

CpG DNA	Cytosin-Phosphat-Guanin enthaltender DNA-Abschnitt
CPT1b	Carnithin-Palmitoyl-Transferase1, Untereinheit b
CRYAB	Chrystallin AB
<i>c-state</i>	cytosolische Konformation
C-Terminus	Carboxyterminus
CV	Komplex V der Atmungskette
CVB3	Coxsackievirus B3
CypD	Cyclophilin D
CytC	Cytochrom C
DAMP	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
DCM	dilatative Kardiomyopathie
DMEM	<i>Dubelco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribnukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
DTT	DL-Dithiothreitol
ECL	Elektrochemilumineszenz-Substrat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	Englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Erk1	extrazellulär regulierte Kinase 1
Erk2	extrazellulär regulierte Kinase 2
EtOH	Ethanol
FADH2	Flavin-Adenin-Dinukleotid, reduziert
FBS	Fötales Rinderserum
FUDR	5-Fluoro-2'-Deoxyuridin
g	Gramm
Gen-ID	Gen-Identifikationsnummer
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
GSK3-β	Glykogensynthase-Kinase-3 beta
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
Her2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
HRP	<i>Horserradish peroxidase</i>

HSP	Hitzeschockprotein
HSP27	Hitzeschockprotein 27
HSP60	Hitzeschockprotein 60
HSP70	Hitzeschockprotein 70
HSP75	Hitzeschockprotein 75
HSP90	Hitzeschockprotein 90
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IMM	innere Mitochondrienmembran
IP	Immunpräzipitation
IP3R	IP3 (Inositol 1,4,5-trisphosphat) Rezeptor
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KÜ	Kulturüberstand
KÜAH	Kulturüberstand hypoxisch kultivierter ANT1tg-NRCM
l	Liter
L1	Protein L1
LC	Flüssigchromatographie
LDHB	Laktatdehydrogenase B
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LLR	<i>Leucine rich repeat</i>
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol
m	Meter
mA	Milliampere
MAM	Mitochondrien assoziierte Membran
MaMiPu	Magermilchpulver
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase
MAPKKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase-Kinase
max.	Maximal
MCL	Markov Clustering
MEK1	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase 1
MEK2	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase 2

MeOH	Methanol
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
MHC	<i>Myosin Heavy Chain</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
Mos	<i>Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase mos</i>
MPTP	mitochondriale Permeabilitätspore
MS	Massenspektroskopie
<i>m-state</i>	matraxeexponierte Konformation
mtCK	mitochondriale Kreatinkinase
MTP	Mikrotiterplatte
MyD88	<i>Myeloid Differentiation Primary Response 88</i>
n	Individuenanzahl
N ₂	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, reduziert
NFκB	Nuklear Faktor kappa B
ng	Nanogramm
NK	Negativkontrolle
NN	nicht nachweisbar
NOXA	<i>Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>
nQ	Zellzahl pro Großquadrat einer Neubauerzählkammer
NRCM	neonatale Rattenkardiomyozyten
N-Terminus	Aminoterminus
o. Abb.	ohne Abbildung
o. g.	oben genannt
O ₂	Sauerstoff
OPA1	<i>Optic Atrophy 1</i> , Protein OPA1
OxPAPC	Oxidiertes 1-Palmitoyl-2-Arachidoyl-sn-Glycero-3-Phosphorylcholine
OxPhos	Oxidative Phosphorylierung
p	Signifikanzwert
p15HSP27	phosphoryliertes HSP27, Serin15
p85HSP27	phosphoryliertes HSP27, Serin85

p38MAPK	p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase
pAKT	phosphoryliertes AKT
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	<i>Dubelco's Phosphate Buffered Saline</i>
PC	<i>Preclean</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDH	Pyruvatdehydrogenase
Pen	Penicillin
pErk1	phosphoryliertes Erk1
pErk2	phosphoryliertes Erk2
pH	<i>pondus hydrogenii</i>
PH-Domäne	Pleckstrin-Homologie-Domäne
P _i	Phosphat
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PiC	<i>Phosphate Carrier</i>
PIP2	Phosphatidylinositolbiphosphat
PIP3	Phosphatidylinositoltriphosphat
PK	Positivkontrolle
pM	Pikomol
ppm	<i>parts per million</i>
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Raf	Raf-Protein, <i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
Ras	G-Protein Ras, <i>Rat sarcoma</i>
rhHSP27	rekombinantes, humanes HSP27
RNA	Ribonukleinsäure
RNAseA	Ribonuklease A
ROS	reaktive Sauerstoff-Spezies
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
Ryr2	Ryanodin-Rezeptor2
s	Sekunde
s.f.	steril filtriert
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>

SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Ser	Serin
SERCA2A	Calcium ATPase, Typ2A
sHSP	kleines (<i>small</i>) HSP
SpC	Spectral Count
SpC/AS	Spektrenanzahl pro Aminosäure
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
ssRNA	einzelsträngige Ribonukleinsäure
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
Strep	Streptomycin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Saline
TBST	Tris-gepufferte Saline mit Tween
TCA	Tricarbonsäure
TCA-Zyklus	Tricarbonsäurezyklus
TCP1	<i>T-complex protein 1 subunit alpha</i>
TGFβ-1	<i>Transforming growth factor beta 1</i>
TGFβRII	TGFβ-Rezeptor2
Timm44	<i>Translocase Of Inner Mitochondrial Membrane 44 homolog</i>
TIR	Toll-Interleukin-Rezeptor
TLR2	Toll-Like-Rezeptor 2
TLR4	Toll-Like-Rezeptor 4
TLR2-KO	<i>TLR2-Knockout</i>
TLR4-KO	<i>TLR4-Knockout</i>
TNFα	Tumornekrosefaktor alpha
Tomm22	<i>Mitochondrial import receptor subunit TOM22 homolog</i>
Tpl2	<i>Tumor Progression Locus 2 Kinase</i>
TRAP1	<i>TNF Receptor-Associated Protein 1, HSP75</i>
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i>
VDAC	<i>Voltage-Dependant Anion Channel</i>
vs.	<i>Versus, gegen</i>
w/v	<i>weight per volume</i>

WB	Westernblot
WD/EPF-Domäne	Struktuelement im N-Terminus von HSP27
WT	Wildtyp
xg	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>
YWAHZ	14-3-3 Protein zeta/delta
z.B.	zum Beispiel
αMHC	alpha Myosyn Heavy Chain

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Klingenberg M, Nelson DR: **Structure-function relationships of the ADP/ATP carrier.** *Biochim.Biophys.Acta* 1994, **1187**:241-244.
2. Schonfeld P: **Does the function of adenine nucleotide translocase in fatty acid uncoupling depend on the type of mitochondria?** *FEBS Lett.* 1990, **264**:246-248.
3. Dolce V, Scarcia P, Iacopetta D, Palmieri F: **A fourth ADP/ATP carrier isoform in man: identification, bacterial expression, functional characterization and tissue distribution.** *FEBS Lett.* 2005, **579**:633-637.
4. Stepien G, Torroni A, Chung AB, Hodge JA, Wallace DC: **Differential expression of adenine nucleotide translocator isoforms in mammalian tissues and during muscle cell differentiation.** *J.Biol.Chem.* 1992, **267**:14592-14597.
5. Doerner A, Pauschinger M, Badorff A, Noutsias M, Giessen S, Schulze K, Bilger J, Rauch U, Schultheiss HP: **Tissue-specific transcription pattern of the adenine nucleotide translocase isoforms in humans.** *FEBS Lett.* 1997, **414**:258-262.
6. Levy SE, Chen YS, Graham BH, Wallace DC: **Expression and sequence analysis of the mouse adenine nucleotide translocase 1 and 2 genes.** *Gene* 2000, **254**:57-66.
7. Dorner A, Schultheiss HP: **Adenine nucleotide translocase in the focus of cardiovascular diseases.** *Trends Cardiovasc.Med.* 2007, **17**:284-290.
8. Hackenberg H, Klingenberg M: **Molecular weight and hydrodynamic parameters of the adenosine 5'-diphosphate--adenosine 5'-triphosphate carrier in Triton X-100.** *Biochemistry* 1980, **19**:548-555.
9. Nury H, Dahout-Gonzalez C, Trezeguet V, Lauquin GJ, Brandolin G, Pebay-Peyroula E: **Relations between structure and function of the mitochondrial ADP/ATP carrier.** *Annu.Rev.Biochem.* 2006, **75**:713-741.
10. Dahout-Gonzalez C, Nury H, Trezeguet V, Lauquin GJ, Pebay-Peyroula E, Brandolin G: **Molecular, functional, and pathological aspects of the mitochondrial ADP/ATP carrier.** *Physiology.(Bethesda.)* 2006, **21**:242-249.
11. Rey M, Forest E, Pelosi L: **Exploring the conformational dynamics of the bovine ADP/ATP carrier in mitochondria.** *Biochemistry* 2012, **51**:9727-9735.
12. Metelkin E, Goryanin I, Demin O: **Mathematical modeling of mitochondrial adenine nucleotide translocase.** *Biophys.J.* 2006, **90**:423-432.
13. Klingenberg M: **The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier.** *Biochim.Biophys.Acta* 2008, **1778**:1978-2021.
14. Klingenberg M: **The ADP-ATP translocation in mitochondria, a membrane potential controlled transport.** *J.Membr.Biol.* 1980, **56**:97-105.

15. Kramer R, Klingenberg M: **Modulation of the reconstituted adenine nucleotide exchange by membrane potential.** *Biochemistry* 1980, **19**:556-560.
16. Giraud S, Bonod-Bidaud C, Wesolowski-Louvel M, Stepien G: **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.* 1998, **281**:409-418.
17. Kholodenko B, Zilinskiene V, Borutaite V, Ivanoviene L, Toleikis A, Praskevicius A: **The role of adenine nucleotide translocators in regulation of oxidative phosphorylation in heart mitochondria.** *FEBS Lett.* 1987, **223**:247-250.
18. Portman MA, Xiao Y, Song Y, Ning XH: **Expression of adenine nucleotide translocator parallels maturation of respiratory control in heart in vivo.** *Am.J.Physiol* 1997, **273**:H1977-H1983.
19. Jacobus WE, Moreadith RW, Vandegaer KM: **Mitochondrial respiratory control. Evidence against the regulation of respiration by extramitochondrial phosphorylation potentials or by [ATP]/[ADP] ratios.** *J.Biol.Chem.* 1982, **257**:2397-2402.
20. Crompton M: **The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death.** *Biochem.J.* 1999, **341 (Pt 2)**:233-249.
21. Bonora M, Pinton P: **The mitochondrial permeability transition pore and cancer: molecular mechanisms involved in cell death.** *Front Oncol.* 2014, **4**:302.
22. Halestrap AP, Brenner C: **The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death.** *Curr.Med.Chem.* 2003, **10**:1507-1525.
23. Vieira HL, Haouzi D, El HC, Jacotot E, Belzacq AS, Brenner C, Kroemer G: **Permeabilization of the mitochondrial inner membrane during apoptosis: impact of the adenine nucleotide translocator.** *Cell Death.Differ.* 2000, **7**:1146-1154.
24. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jurgensmeier JM, Susin SA, Vieira HL, Prevost MC, Xie Z, Matsuyama S, Reed JC, Kroemer G: **Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis.** *Science* 1998, **281**:2027-2031.
25. Brenner C, Cadiou H, Vieira HL, Zamzami N, Marzo I, Xie Z, Leber B, Andrews D, Duclouhier H, Reed JC, Kroemer G: **Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator.** *Oncogene* 2000, **19**:329-336.
26. Loers G, Makhina T, Bork U, Dorner A, Schachner M, Kleene R: **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.* 2012, **32**:3917-3930.
27. Radichev IA, Remacle AG, Sounni NE, Shiryaev SA, Rozanov DV, Zhu W, Golubkova NV, Postnova TI, Golubkov VS, Strongin AY: **Biochemical evidence of the interactions of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) with adenine nucleotide translocator (ANT): potential implications linking proteolysis with energy metabolism in cancer cells.** *Biochem.J.* 2009, **420**:37-47.
28. Detke S, Elsabrouty R: **Leishmania mexicana amazonensis: plasma membrane adenine nucleotide translocator and chemotaxis.** *Exp.Parasitol.* 2008, **118**:408-419.

29. Schultheiss HP: **The significance of autoantibodies against the ADP/ATP carrier for the pathogenesis of myocarditis and dilated cardiomyopathy--clinical and experimental data.** *Springer Semin.Immunopathol.* 1989, **11**:15-30.
30. Schultheiss HP: **Dysfunction of the ADP/ATP carrier as a causative factor for the disturbance of the myocardial energy metabolism in dilated cardiomyopathy.** *Basic Res.Cardiol.* 1992, **87 Suppl 1**:311-320.
31. Schulze K, Becker BF, Schultheiss HP: **Antibodies to the ADP/ATP carrier, an autoantigen in myocarditis and dilated cardiomyopathy, penetrate into myocardial cells and disturb energy metabolism in vivo.** *Circ.Res.* 1989, **64**:179-192.
32. Schwimbeck PL, Schwimbeck NK, Schultheiss HP, Strauer BE: **Mapping of antigenic determinants of the adenine-nucleotide translocator and coxsackie B3 virus with synthetic peptides: use for the diagnosis of viral heart disease.** *Clin.Immunol.Immunopathol.* 1993, **68**:135-140.
33. Schulze K, Witzembichler B, Christmann C, Schultheiss HP: **Disturbance of myocardial energy metabolism in experimental virus myocarditis by antibodies against the adenine nucleotide translocator.** *Cardiovasc.Res.* 1999, **44**:91-100.
34. Boya P, Roumier T, Andreau K, Gonzalez-Polo RA, Zamzami N, Castedo M, Kroemer G: **Mitochondrion-targeted apoptosis regulators of viral origin.** *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2003, **304**:575-581.
35. Jordens EZ, Palmieri L, Huizing M, van den Heuvel LP, Sengers RC, Dorner A, Ruitenbeek W, Trijbels FJ, Valsson J, Sigfusson G, Palmieri F, Smeitink JA: **Adenine nucleotide translocator 1 deficiency associated with Sengers syndrome.** *Ann.Neurol.* 2002, **52**:95-99.
36. Mayr JA, Haack TB, Graf E, Zimmermann FA, Wieland T, Haberberger B, Superti-Furga A, Kirschner J, Steinmann B, Baumgartner MR, Moroni I, Lamantea E, Zeviani M, Rodenburg RJ, Smeitink J, Strom TM, Meitinger T, Sperl W, Prokisch H: **Lack of the mitochondrial protein acylglycerol kinase causes Sengers syndrome.** *Am.J.Hum.Genet.* 2012, **90**:314-320.
37. Graham BH, Waymire KG, Cottrell B, Trounce IA, MacGregor GR, Wallace DC: **A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator.** *Nat.Genet.* 1997, **16**:226-234.
38. Esposito LA, Melov S, Panov A, Cottrell BA, Wallace DC: **Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999, **96**:4820-4825.
39. Deschauer M, Hudson G, Muller T, Taylor RW, Chinnery PF, Zierz S: **A novel ANT1 gene mutation with probable germline mosaicism in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia.** *Neuromuscul.Disord.* 2005, **15**:311-315.
40. Piper HM, Das A: **Detrimental actions of endogenous fatty acids and their derivatives. A study of ischaemic mitochondrial injury.** *Basic Res.Cardiol.* 1987, **82 Suppl 1**:187-196.
41. Shug AL, Shrago E, Bittar N, Folts JD, Koke JR: **Acyl-CoA inhibition of adenine nucleotide translocation in ischemic myocardium.** *Am.J.Physiol* 1975, **228**:689-692.
42. Le BM, Clement MV, Pervaiz S, Brenner C: **Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death.** *Histol.Histopathol.* 2005, **20**:205-219.

43. Walther T, Tschöpe C, Sterner-Kock A, Westermann D, Heringer-Walther S, Riad A, Nikolic A, Wang Y, Ebermann L, Siems WE, Bader M, Shakibaei M, Schultheiss HP, Dorner A: **Accelerated mitochondrial adenosine diphosphate/adenosine triphosphate transport improves hypertension-induced heart disease.** *Circulation* 2007, **115**:333-344.
44. Vogelpohl I, Vetter R, Heger J, Ebermann L, Euler G, Schultheiss HP, Dorner A: **Transgenic overexpression of heart-specific adenine nucleotide translocase 1 positively affects contractile function in cardiomyocytes.** *Cell Physiol Biochem.* 2011, **27**:121-128.
45. Heger J, Abdallah Y, Shahzad T, Klumpe I, Piper HM, Schultheiss HP, Schluter KD, Schulz R, Euler G, Dorner A: **Transgenic overexpression of the adenine nucleotide translocase 1 protects cardiomyocytes against TGFbeta1-induced apoptosis by stabilization of the mitochondrial permeability transition pore.** *J.Mol.Cell Cardiol.* 2012, **53**:73-81.
46. Klumpe I. Molekularbiologische und biochemische Charakterisierung eines Adeninnukleotid-Translokator (ANT)-transgenen Tiermodells. 1-133. 2013.
Ref Type: Thesis/Dissertation
47. Wang Y, Ebermann L, Sterner-Kock A, Wika S, Schultheiss HP, Dorner A, Walther T: **Myocardial overexpression of adenine nucleotide translocase 1 ameliorates diabetic cardiomyopathy in mice.** *Exp.Physiol* 2009, **94**:220-227.
48. McLeod CJ, Jeyabalan AP, Minners JO, Clevenger R, Hoyt RF, Jr., Sack MN: **Delayed ischemic preconditioning activates nuclear-encoded electron-transfer-chain gene expression in parallel with enhanced postanoxic mitochondrial respiratory recovery.** *Circulation* 2004, **110**:534-539.
49. Ning XH, Xu CS, Song YC, Xiao Y, Hu YJ, Lupinetti FM, Portman MA: **Hypothermia preserves function and signaling for mitochondrial biogenesis during subsequent ischemia.** *Am.J.Physiol* 1998, **274**:H786-H793.
50. Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL: **Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human.** *Physiol Rev.* 1999, **79**:143-180.
51. Akira S, Takeda K: **Toll-like receptor signalling.** *Nat.Rev.Immunol.* 2004, **4**:499-511.
52. Pearson G, Robinson F, Beers GT, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH: **Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions.** *Endocr.Rev.* 2001, **22**:153-183.
53. Songyang Z, Lu KP, Kwon YT, Tsai LH, Filhol O, Cochet C, Brickey DA, Soderling TR, Bartleson C, Graves DJ, DeMaggio AJ, Hoekstra MF, Blenis J, Hunter T, Cantley LC: **A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and Erk1.** *Mol.Cell Biol.* 1996, **16**:6486-6493.
54. Saba-El-Leil MK, Vella FD, Vernay B, Voisin L, Chen L, Labrecque N, Ang SL, Meloche S: **An essential function of the mitogen-activated protein kinase Erk2 in mouse trophoblast development.** *EMBO Rep.* 2003, **4**:964-968.
55. Lenormand P, Sardet C, Pages G, L'Allemain G, Brunet A, Pouyssegur J: **Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts.** *J.Cell Biol.* 1993, **122**:1079-1088.

56. Dumitru CD, Ceci JD, Tsatsanis C, Kontoyiannis D, Stamatakis K, Lin JH, Patriotis C, Jenkins NA, Copeland NG, Kollias G, Tschlis PN: **TNF-alpha induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway.** *Cell* 2000, **103**:1071-1083.
57. Cho J, Tschlis PN: **Phosphorylation at Thr-290 regulates Tpl2 binding to NF-kappaB1/p105 and Tpl2 activation and degradation by lipopolysaccharide.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2005, **102**:2350-2355.
58. Babu GR, Jin W, Norman L, Waterfield M, Chang M, Wu X, Zhang M, Sun SC: **Phosphorylation of NF-kappaB1/p105 by oncoprotein kinase Tpl2: implications for a novel mechanism of Tpl2 regulation.** *Biochim.Biophys.Acta* 2006, **1763**:174-181.
59. Raman M, Chen W, Cobb MH: **Differential regulation and properties of MAPKs.** *Oncogene* 2007, **26**:3100-3112.
60. Cargnello M, Roux PP: **Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases.** *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 2011, **75**:50-83.
61. Gough DJ, Koetz L, Levy DE: **The MEK-ERK pathway is necessary for serine phosphorylation of mitochondrial STAT3 and Ras-mediated transformation.** *PLoS.One.* 2013, **8**:e83395.
62. Yoon S, Seger R: **The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions.** *Growth Factors* 2006, **24**:21-44.
63. Mebratu Y, Tesfaigzi Y: **How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer?** *Cell Cycle* 2009, **8**:1168-1175.
64. Chen Y, Amende I, Hampton TG, Yang Y, Ke Q, Min JY, Xiao YF, Morgan JP: **Vascular endothelial growth factor promotes cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells.** *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2006, **291**:H1653-H1658.
65. Araki T, Chan G, Newbigging S, Morikawa L, Bronson RT, Neel BG: **Noonan syndrome cardiac defects are caused by PTPN11 acting in endocardium to enhance endocardial-mesenchymal transformation.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2009, **106**:4736-4741.
66. Aoki Y, Niihori T, Narumi Y, Kure S, Matsubara Y: **The RAS/MAPK syndromes: novel roles of the RAS pathway in human genetic disorders.** *Hum.Mutat.* 2008, **29**:992-1006.
67. Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, Klevitsky R, Hewett TE, Jones SP, Lefler DJ, Peng CF, Kitsis RN, Molkentin JD: **The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice.** *EMBO J.* 2000, **19**:6341-6350.
68. Lips DJ, Bueno OF, Wilkins BJ, Purcell NH, Kaiser RA, Lorenz JN, Voisin L, Saba-El-Leil MK, Meloche S, Pouyssegur J, Pages G, De Windt LJ, Doevendans PA, Molkentin JD: **MEK1-ERK2 signaling pathway protects myocardium from ischemic injury in vivo.** *Circulation* 2004, **109**:1938-1941.
69. Rose BA, Force T, Wang Y: **Mitogen-activated protein kinase signaling in the heart: angels versus demons in a heart-breaking tale.** *Physiol Rev.* 2010, **90**:1507-1546.
70. Dhingra S, Sharma AK, Arora RC, Slezak J, Singal PK: **IL-10 attenuates TNF-alpha-induced NF kappaB pathway activation and cardiomyocyte apoptosis.** *Cardiovasc.Res.* 2009, **82**:59-66.

71. Das A, Xi L, Kukreja RC: **Protein kinase G-dependent cardioprotective mechanism of phosphodiesterase-5 inhibition involves phosphorylation of ERK and GSK3beta.** *J.Biol.Chem.* 2008, **283**:29572-29585.
72. Das A, Salloum FN, Xi L, Rao YJ, Kukreja RC: **ERK phosphorylation mediates sildenafil-induced myocardial protection against ischemia-reperfusion injury in mice.** *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2009, **296**:H1236-H1243.
73. Brazil DP, Hemmings BA: **Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow.** *Trends Biochem.Sci.* 2001, **26**:657-664.
74. Jones PF, Jakubowicz T, Hemmings BA: **Molecular cloning of a second form of rac protein kinase.** *Cell Regul.* 1991, **2**:1001-1009.
75. Cheng JQ, Godwin AK, Bellacosa A, Taguchi T, Franke TF, Hamilton TC, Tsichlis PN, Testa JR: **AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1992, **89**:9267-9271.
76. Brodbeck D, Cron P, Hemmings BA: **A human protein kinase Bgamma with regulatory phosphorylation sites in the activation loop and in the C-terminal hydrophobic domain.** *J.Biol.Chem.* 1999, **274**:9133-9136.
77. Dummler B, Hemmings BA: **Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease.** *Biochem.Soc.Trans.* 2007, **35**:231-235.
78. Manning BD, Cantley LC: **AKT/PKB signaling: navigating downstream.** *Cell* 2007, **129**:1261-1274.
79. Bellacosa A, Chan TO, Ahmed NN, Datta K, Malstrom S, Stokoe D, McCormick F, Feng J, Tsichlis P: **Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain.** *Oncogene* 1998, **17**:313-325.
80. Alessi DR, Caudwell FB, Andjelkovic M, Hemmings BA, Cohen P: **Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase.** *FEBS Lett.* 1996, **399**:333-338.
81. Lu C, Liu L, Chen Y, Ha T, Kelley J, Schweitzer J, Kalbfleisch JH, Kao RL, Williams DL, Li C: **TLR2 ligand induces protection against cerebral ischemia/reperfusion injury via activation of phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling.** *J.Immunol.* 2011, **187**:1458-1466.
82. Mearow KM, Dodge ME, Rahimtula M, Yegappan C: **Stress-mediated signaling in PC12 cells - the role of the small heat shock protein, Hsp27, and Akt in protecting cells from heat stress and nerve growth factor withdrawal.** *J.Neurochem.* 2002, **83**:452-462.
83. Havasi A, Li Z, Wang Z, Martin JL, Botla V, Ruchalski K, Schwartz JH, Borkan SC: **Hsp27 inhibits Bax activation and apoptosis via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism.** *J.Biol.Chem.* 2008, **283**:12305-12313.
84. Tong H, Imahashi K, Steenbergen C, Murphy E: **Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta during preconditioning through a phosphatidylinositol-3-kinase--dependent pathway is cardioprotective.** *Circ.Res.* 2002, **90**:377-379.

85. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC: **Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation.** *Science* 1998, **282**:1318-1321.
86. Matsui T, Rosenzweig A: **Convergent signal transduction pathways controlling cardiomyocyte survival and function: the role of PI 3-kinase and Akt.** *J.Mol.Cell Cardiol.* 2005, **38**:63-71.
87. Matsui T, Li L, del M, Fukui Y, Franke TF, Hajjar RJ, Rosenzweig A: **Adenoviral gene transfer of activated phosphatidylinositol 3'-kinase and Akt inhibits apoptosis of hypoxic cardiomyocytes in vitro.** *Circulation* 1999, **100**:2373-2379.
88. Li H, Wang Y, Wei C, Bai S, Zhao Y, Li H, Wu B, Wang R, Wu L, Xu C: **Mediation of exogenous hydrogen sulfide in recovery of ischemic post-conditioning-induced cardioprotection via down-regulating oxidative stress and up-regulating PI3K/Akt/GSK-3beta pathway in isolated aging rat hearts.** *Cell Biosci.* 2015, **5**:11.
89. Li H, Wang JK, Zeng YM, Yang CX, Chen HT, Wen XJ, Shui CL, Liang H: **Sevoflurane post-conditioning protects against myocardial reperfusion injury by activation of phosphatidylinositol-3-kinase signal transduction.** *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* 2008, **35**:1043-1051.
90. Chiari PC, Bienengraeber MW, Pagel PS, Krolikowski JG, Kersten JR, Warltier DC: **Isoflurane protects against myocardial infarction during early reperfusion by activation of phosphatidylinositol-3-kinase signal transduction: evidence for anesthetic-induced postconditioning in rabbits.** *Anesthesiology* 2005, **102**:102-109.
91. Shioi T, Kang PM, Douglas PS, Hampe J, Yballe CM, Lawitts J, Cantley LC, Izumo S: **The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice.** *EMBO J.* 2000, **19**:2537-2548.
92. Shioi T, McMullen JR, Kang PM, Douglas PS, Obata T, Franke TF, Cantley LC, Izumo S: **Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice.** *Mol.Cell Biol.* 2002, **22**:2799-2809.
93. Matsui T, Tao J, del MF, Lee KH, Li L, Picard M, Force TL, Franke TF, Hajjar RJ, Rosenzweig A: **Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia in vivo.** *Circulation* 2001, **104**:330-335.
94. Ang D, Liberek K, Skowrya D, Zylicz M, Georgopoulos C: **Biological role and regulation of the universally conserved heat shock proteins.** *J.Biol.Chem.* 1991, **266**:24233-24236.
95. Macario AJ: **Heat-shock proteins and molecular chaperones: implications for pathogenesis, diagnostics, and therapeutics.** *Int.J.Clin.Lab Res.* 1995, **25**:59-70.
96. Ritossa F: **Discovery of the heat shock response.** *Cell Stress.Chaperones.* 1996, **1**:97-98.
97. Richard V, Kaeffer N, Thuillez C: **Delayed protection of the ischemic heart--from pathophysiology to therapeutic applications.** *Fundam.Clin.Pharmacol.* 1996, **10**:409-415.
98. Patel B, Khaliq A, Jarvis-Evans J, Boulton M, Arrol S, Mackness M, McLeod D: **Hypoxia induces HSP 70 gene expression in human hepatoma (HEP G2) cells.** *Biochem.Mol.Biol.Int.* 1995, **36**:907-912.

99. Kukreja RC, Kontos MC, Loesser KE, Batra SK, Qian YZ, Gbur CJ, Jr., Naseem SA, Jesse RL, Hess ML: **Oxidant stress increases heat shock protein 70 mRNA in isolated perfused rat heart.** *Am.J.Physiol* 1994, **267**:H2213-H2219.
100. Yang XM, Baxter GF, Heads RJ, Yellon DM, Downey JM, Cohen MV: **Infarct limitation of the second window of protection in a conscious rabbit model.** *Cardiovasc.Res.* 1996, **31**:777-783.
101. Matz JM, Blake MJ, Tatelman HM, Lavoi KP, Holbrook NJ: **Characterization and regulation of cold-induced heat shock protein expression in mouse brown adipose tissue.** *Am.J.Physiol* 1995, **269**:R38-R47.
102. Deshaies RJ, Koch BD, Werner-Washburne M, Craig EA, Schekman R: **A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides.** *Nature* 1988, **332**:800-805.
103. Cheng MY, Hartl FU, Martin J, Pollock RA, Kalousek F, Neupert W, Hallberg EM, Hallberg RL, Horwich AL: **Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria.** *Nature* 1989, **337**:620-625.
104. Parsell DA, Sauer RT: **Induction of a heat shock-like response by unfolded protein in Escherichia coli: dependence on protein level not protein degradation.** *Genes Dev.* 1989, **3**:1226-1232.
105. Wynn RM, Davie JR, Cox RP, Chuang DT: **Molecular chaperones: heat-shock proteins, foldases, and matchmakers.** *J.Lab Clin.Med.* 1994, **124**:31-36.
106. Raboy B, Sharon G, Parag HA, Shochat Y, Kulka RG: **Effect of stress on protein degradation: role of the ubiquitin system.** *Acta Biol.Hung.* 1991, **42**:3-20.
107. Heads RJ, Latchman DS, Yellon DM: **Stable high level expression of a transfected human HSP70 gene protects a heart-derived muscle cell line against thermal stress.** *J.Mol.Cell Cardiol.* 1994, **26**:695-699.
108. Amrani M, Allen NJ, O'Shea J, Corbett J, Dunn MJ, Tadjkarimi S, Theodoropoulos S, Pepper J, Yacoub MH: **Role of catalase and heat shock protein on recovery of cardiac endothelial and mechanical function after ischemia.** *Cardioscience* 1993, **4**:193-198.
109. Mehta TA, Greenman J, Ettelaie C, Venkatasubramaniam A, Chetter IC, McCollum PT: **Heat shock proteins in vascular disease--a review.** *Eur.J.Vasc.Endovasc.Surg.* 2005, **29**:395-402.
110. Csermely P, Schnaider T, Soti C, Prohaszka Z, Nardai G: **The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review.** *Pharmacol.Ther.* 1998, **79**:129-168.
111. Chen B, Piel WH, Gui L, Bruford E, Monteiro A: **The HSP90 family of genes in the human genome: insights into their divergence and evolution.** *Genomics* 2005, **86**:627-637.
112. Altieri DC, Stein GS, Lian JB, Languino LR: **TRAP-1, the mitochondrial Hsp90.** *Biochim.Biophys.Acta* 2012, **1823**:767-773.
113. Chen CF, Chen Y, Dai K, Chen PL, Riley DJ, Lee WH: **A new member of the hsp90 family of molecular chaperones interacts with the retinoblastoma protein during mitosis and after heat shock.** *Mol.Cell Biol.* 1996, **16**:4691-4699.

114. Ketis NV, Lawler J, Bendena WG: **Extracellular matrix components affect the pattern of protein synthesis of endothelial cells responding to hyperthermia.** *In Vitro Cell Dev.Biol.Anim* 1993, **29A**:768-772.
115. Nishizawa J, Nakai A, Higashi T, Tanabe M, Nomoto S, Matsuda K, Ban T, Nagata K: **Reperfusion causes significant activation of heat shock transcription factor 1 in ischemic rat heart.** *Circulation* 1996, **94**:2185-2192.
116. Picard D: **Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation.** *Cell Mol.Life Sci.* 2002, **59**:1640-1648.
117. Wandinger SK, Richter K, Buchner J: **The Hsp90 chaperone machinery.** *J.Biol.Chem.* 2008, **283**:18473-18477.
118. Wiech H, Buchner J, Zimmermann R, Jakob U: **Hsp90 chaperones protein folding in vitro.** *Nature* 1992, **358**:169-170.
119. Jakob U, Lilie H, Meyer I, Buchner J: **Transient interaction of Hsp90 with early unfolding intermediates of citrate synthase. Implications for heat shock in vivo.** *J.Biol.Chem.* 1995, **270**:7288-7294.
120. Smith DF: **Dynamics of heat shock protein 90-progesterone receptor binding and the disactivation loop model for steroid receptor complexes.** *Mol.Endocrinol.* 1993, **7**:1418-1429.
121. Smith DF, Sullivan WP, Marion TN, Zaitsev K, Madden B, McCormick DJ, Toft DO: **Identification of a 60-kilodalton stress-related protein, p60, which interacts with hsp90 and hsp70.** *Mol.Cell Biol.* 1993, **13**:869-876.
122. Pratt WB, Toft DO: **Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery.** *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 2003, **228**:111-133.
123. Young JC, Obermann WM, Hartl FU: **Specific binding of tetratricopeptide repeat proteins to the C-terminal 12-kDa domain of hsp90.** *J.Biol.Chem.* 1998, **273**:18007-18010.
124. Bhangoo MK, Tzankov S, Fan AC, Dejgaard K, Thomas DY, Young JC: **Multiple 40-kDa heat-shock protein chaperones function in Tom70-dependent mitochondrial import.** *Mol.Biol.Cell* 2007, **18**:3414-3428.
125. Pratt WB, Galigniana MD, Morishima Y, Murphy PJ: **Role of molecular chaperones in steroid receptor action.** *Essays Biochem.* 2004, **40**:41-58.
126. Baulieu EE, Binart N, Cadepond F, Catelli MG, Chambraud B, Garnier J, Gasc JM, Groyer-Schweizer G, Oblin ME, Radanyi C, .: **Receptor-associated nuclear proteins and steroid/antisteroid action.** *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1990, **595**:300-315.
127. Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, Sessa WC: **Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90.** *Nature* 1998, **392**:821-824.
128. Fontana J, Fulton D, Chen Y, Fairchild TA, McCabe TJ, Fujita N, Tsuruo T, Sessa WC: **Domain mapping studies reveal that the M domain of hsp90 serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release.** *Circ.Res.* 2002, **90**:866-873.

129. Amrani M, O'Shea J, Allen NJ, Harding SE, Jayakumar J, Pepper JR, Moncada S, Yacoub MH: **Role of basal release of nitric oxide on coronary flow and mechanical performance of the isolated rat heart.** *J.Physiol* 1992, **456**:681-687.
130. Sato S, Fujita N, Tsuruo T: **Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2000, **97**:10832-10837.
131. Ferns G, Shams S, Shafi S: **Heat shock protein 27: its potential role in vascular disease.** *Int.J.Exp.Pathol.* 2006, **87**:253-274.
132. Kato K, Shinohara H, Goto S, Inaguma Y, Morishita R, Asano T: **Copurification of small heat shock protein with alpha B crystallin from human skeletal muscle.** *J.Biol.Chem.* 1992, **267**:7718-7725.
133. Landry J, Chretien P, Laszlo A, Lambert H: **Phosphorylation of HSP27 during development and decay of thermotolerance in Chinese hamster cells.** *J.Cell Physiol* 1991, **147**:93-101.
134. Kato K, Goto S, Hasegawa K, Inaguma Y: **Coinduction of two low-molecular-weight stress proteins, alpha B crystallin and HSP28, by heat or arsenite stress in human glioma cells.** *J.Biochem.* 1993, **114**:640-647.
135. Chretien P, Landry J: **Enhanced constitutive expression of the 27-kDa heat shock proteins in heat-resistant variants from Chinese hamster cells.** *J.Cell Physiol* 1988, **137**:157-166.
136. van de Schootbrugge C, Schults EM, Bussink J, Span PN, Grenman R, Pruijn GJ, Kaanders JH, Boelens WC: **Effect of hypoxia on the expression of alphaB-crystallin in head and neck squamous cell carcinoma.** *BMC.Cancer* 2014, **14**:252.
137. Fu L, Liang JJ: **Detection of protein-protein interactions among lens crystallins in a mammalian two-hybrid system assay.** *J.Biol.Chem.* 2002, **277**:4255-4260.
138. Theriault JR, Lambert H, Chavez-Zobel AT, Charest G, Lavigne P, Landry J: **Essential role of the NH2-terminal WD/EPF motif in the phosphorylation-activated protective function of mammalian Hsp27.** *J.Biol.Chem.* 2004, **279**:23463-23471.
139. Lambert H, Charette SJ, Bernier AF, Guimond A, Landry J: **HSP27 multimerization mediated by phosphorylation-sensitive intermolecular interactions at the amino terminus.** *J.Biol.Chem.* 1999, **274**:9378-9385.
140. Rogalla T, Ehrnsperger M, Preville X, Kotlyarov A, Lutsch G, Ducasse C, Paul C, Wieske M, Arrigo AP, Buchner J, Gaestel M: **Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation.** *J.Biol.Chem.* 1999, **274**:18947-18956.
141. Kato K, Hasegawa K, Goto S, Inaguma Y: **Dissociation as a result of phosphorylation of an aggregated form of the small stress protein, hsp27.** *J.Biol.Chem.* 1994, **269**:11274-11278.
142. Larsen JK, Yamboliev IA, Weber LA, Gerthoffer WT: **Phosphorylation of the 27-kDa heat shock protein via p38 MAP kinase and MAPKAP kinase in smooth muscle.** *Am.J.Physiol* 1997, **273**:L930-L940.
143. Yamboliev IA, Hedges JC, Mutnick JL, Adam LP, Gerthoffer WT: **Evidence for modulation of smooth muscle force by the p38 MAP kinase/HSP27 pathway.** *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2000, **278**:H1899-H1907.

144. An H, Yu Y, Zhang M, Xu H, Qi R, Yan X, Liu S, Wang W, Guo Z, Guo J, Qin Z, Cao X: **Involvement of ERK, p38 and NF-kappaB signal transduction in regulation of TLR2, TLR4 and TLR9 gene expression induced by lipopolysaccharide in mouse dendritic cells.** *Immunology* 2002, **106**:38-45.
145. Maizels ET, Peters CA, Kline M, Cutler RE, Jr., Shanmugam M, Hunzicker-Dunn M: **Heat-shock protein-25/27 phosphorylation by the delta isoform of protein kinase C.** *Biochem.J.* 1998, **332 (Pt 3)**:703-712.
146. Kato K, Ito H, Iwamoto I, Lida K, Inaguma Y: **Protein kinase inhibitors can suppress stress-induced dissociation of Hsp27.** *Cell Stress.Chaperones.* 2001, **6**:16-20.
147. Doppler H, Storz P, Li J, Comb MJ, Toker A: **A phosphorylation state-specific antibody recognizes Hsp27, a novel substrate of protein kinase D.** *J.Biol.Chem.* 2005, **280**:15013-15019.
148. Suga H, Nakajima K, Shu E, Kanno Y, Hirade K, Ishisaki A, Matsuno H, Tanabe K, Takai S, Akamatsu S, Kato K, Oiso Y, Kozawa O: **Possible involvement of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signal pathway in vasopressin-induced HSP27 phosphorylation in aortic smooth muscle A10 cells.** *Arch.Biochem.Biophys.* 2005, **438**:137-145.
149. Rane MJ, Pan Y, Singh S, Powell DW, Wu R, Cummins T, Chen Q, McLeish KR, Klein JB: **Heat shock protein 27 controls apoptosis by regulating Akt activation.** *J.Biol.Chem.* 2003, **278**:27828-27835.
150. Gusev NB, Bogatcheva NV, Marston SB: **Structure and properties of small heat shock proteins (sHsp) and their interaction with cytoskeleton proteins.** *Biochemistry (Mosc.)* 2002, **67**:511-519.
151. Wang P, Bitar KN: **Rho A regulates sustained smooth muscle contraction through cytoskeletal reorganization of HSP27.** *Am.J.Physiol* 1998, **275**:G1454-G1462.
152. Mounier N, Arrigo AP: **Actin cytoskeleton and small heat shock proteins: how do they interact?** *Cell Stress.Chaperones.* 2002, **7**:167-176.
153. Arrigo AP: **Hsp27: novel regulator of intracellular redox state.** *IUBMB.Life* 2001, **52**:303-307.
154. Parcellier A, Schmitt E, Gurbuxani S, Seigneurin-Berny D, Pance A, Chantome A, Plenchette S, Khochbin S, Solary E, Garrido C: **HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaBalpha proteasomal degradation.** *Mol.Cell Biol.* 2003, **23**:5790-5802.
155. Garrido C, Bruey JM, Fromentin A, Hammann A, Arrigo AP, Solary E: **HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9.** *FASEB J.* 1999, **13**:2061-2070.
156. Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Diaz-Latoud C, Gurbuxani S, Arrigo AP, Kroemer G, Solary E, Garrido C: **Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c.** *Nat.Cell Biol.* 2000, **2**:645-652.
157. Samali A, Robertson JD, Peterson E, Manero F, van ZL, Paul C, Cotgreave IA, Arrigo AP, Orrenius S: **Hsp27 protects mitochondria of thermotolerant cells against apoptotic stimuli.** *Cell Stress.Chaperones.* 2001, **6**:49-58.

158. Parcellier A, Gurbuxani S, Schmitt E, Solary E, Garrido C: **Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways.** *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2003, **304**:505-512.
159. Mehlen P, Hickey E, Weber LA, Arrigo AP: **Large unphosphorylated aggregates as the active form of hsp27 which controls intracellular reactive oxygen species and glutathione levels and generates a protection against TNFalpha in NIH-3T3-ras cells.** *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1997, **241**:187-192.
160. Mehlen P, Kretz-Remy C, Preville X, Arrigo AP: **Human hsp27, Drosophila hsp27 and human alphaB-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNFalpha-induced cell death.** *EMBO J.* 1996, **15**:2695-2706.
161. Xu F, Yu H, Liu J, Cheng L: **alphaB-crystallin regulates oxidative stress-induced apoptosis in cardiac H9c2 cells via the PI3K/AKT pathway.** *Mol.Biol.Rep.* 2013, **40**:2517-2526.
162. Vander Heide RS: **Increased expression of HSP27 protects canine myocytes from simulated ischemia-reperfusion injury.** *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2002, **282**:H935-H941.
163. Martin JL, Mestril R, Hilal-Dandan R, Brunton LL, Dillmann WH: **Small heat shock proteins and protection against ischemic injury in cardiac myocytes.** *Circulation* 1997, **96**:4343-4348.
164. Jin C, Cleveland JC, Ao L, Li J, Zeng Q, Fullerton DA, Meng X: **Human myocardium releases heat shock protein 27 (HSP27) after global ischemia: the proinflammatory effect of extracellular HSP27 through toll-like receptor (TLR)-2 and TLR4.** *Mol.Med.* 2014, **20**:280-289.
165. Alegre ML, Goldstein DR, Chong AS: **Toll-like receptor signaling in transplantation.** *Curr.Opin.Organ Transplant.* 2008, **13**:358-365.
166. Frantz S, Kobzik L, Kim YD, Fukazawa R, Medzhitov R, Lee RT, Kelly RA: **Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium.** *J.Clin.Invest* 1999, **104**:271-280.
167. Vilahur G, Badimon L: **Ischemia/reperfusion activates myocardial innate immune response: the key role of the toll-like receptor.** *Front Physiol* 2014, **5**:496.
168. Takeda K, Akira S: **Toll-like receptors in innate immunity.** *Int.Immunol.* 2005, **17**:1-14.
169. Frantz S, Ertl G, Bauersachs J: **Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease.** *Nat.Clin.Pract.Cardiovasc.Med.* 2007, **4**:444-454.
170. Lin L, Knowlton AA: **Innate immunity and cardiomyocytes in ischemic heart disease.** *Life Sci.* 2014, **100**:1-8.
171. Mkaddem SB, Werts C, Goujon JM, Bens M, Pedruzzi E, Ogier-Denis E, Vandewalle A: **Heat shock protein gp96 interacts with protein phosphatase 5 and controls toll-like receptor 2 (TLR2)-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 in post-hypoxic kidney cells.** *J.Biol.Chem.* 2009, **284**:12541-12549.
172. Santos-Sierra S, Deshmukh SD, Kalnitski J, Kuenzi P, Wymann MP, Golenbock DT, Henneke P: **Mal connects TLR2 to PI3Kinase activation and phagocyte polarization.** *EMBO J.* 2009, **28**:2018-2027.

173. Ha T, Liu L, Kelley J, Kao R, Williams D, Li C: **Toll-like receptors: new players in myocardial ischemia/reperfusion injury.** *Antioxid.Redox.Signal.* 2011, **15**:1875-1893.
174. McDonald TE, Grinman MN, Carthy CM, Walley KR: **Endotoxin infusion in rats induces apoptotic and survival pathways in hearts.** *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2000, **279**:H2053-H2061.
175. Chao W: **Toll-like receptor signaling: a critical modulator of cell survival and ischemic injury in the heart.** *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2009, **296**:H1-12.
176. Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK: **Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4.** *J.Biol.Chem.* 2002, **277**:15028-15034.
177. Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, da CC, Miethke T, Kirschning CJ, Hacker H, Wagner H: **Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells.** *J.Biol.Chem.* 2001, **276**:31332-31339.
178. Gao F, Hu XY, Xie XJ, Xu QY, Wang YP, Liu XB, Xiang MX, Sun Y, Wang JA: **Heat shock protein 90 protects rat mesenchymal stem cells against hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis via the PI3K/Akt and ERK1/2 pathways.** *J.Zhejiang.Univ Sci.B* 2010, **11**:608-617.
179. Roelofs MF, Boelens WC, Joosten LA, Abdollahi-Roodsaz S, Geurts J, Wunderink LU, Schreurs BW, van den Berg WB, Radstake TR: **Identification of small heat shock protein B8 (HSP22) as a novel TLR4 ligand and potential involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.** *J.Immunol.* 2006, **176**:7021-7027.
180. Bulut Y, Faure E, Thomas L, Karahashi H, Michelsen KS, Equils O, Morrison SG, Morrison RP, Arditi M: **Chlamydial heat shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through Toll-like receptor 4 and MD2 in a MyD88-dependent pathway.** *J.Immunol.* 2002, **168**:1435-1440.
181. Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H: **Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex.** *J.Immunol.* 2000, **164**:558-561.
182. Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, Wagner H: **HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway.** *J.Biol.Chem.* 2002, **277**:15107-15112.
183. Kim SC, Stice JP, Chen L, Jung JS, Gupta S, Wang Y, Baumgarten G, Trial J, Knowlton AA: **Extracellular heat shock protein 60, cardiac myocytes, and apoptosis.** *Circ.Res.* 2009, **105**:1186-1195.
184. Vetter R, Kott M, Schulze W, Rupp H: **Influence of different culture conditions on sarcoplasmic reticular calcium transport in isolated neonatal rat cardiomyocytes.** *Mol.Cell Biochem.* 1998, **188**:177-185.
185. Thuringer D, Jego G, Wettstein G, Terrier O, Cronier L, Yousfi N, Hebrard S, Bouchot A, Hazoume A, Joly AL, Gleave M, Rosa-Calatrava M, Solary E, Garrido C: **Extracellular HSP27 mediates angiogenesis through Toll-like receptor 3.** *FASEB J.* 2013, **27**:4169-4183.

186. Old WM, Meyer-Arendt K, Aveline-Wolf L, Pierce KG, Mendoza A, Sevinsky JR, Resing KA, Ahn NG: **Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics.** *Mol.Cell Proteomics.* 2005, **4**:1487-1502.
187. Langley SR, Mayr M: **Comparative analysis of statistical methods used for detecting differential expression in label-free mass spectrometry proteomics.** *J.Proteomics.* 2015.
188. Zhang J, Lanham KA, Heideman W, Peterson RE, Li L: **Statistically enhanced spectral counting approach to TCDD cardiac toxicity in the adult zebrafish heart.** *J.Proteome.Res.* 2013, **12**:3093-3103.
189. Ebel D, Toma O, Appler S, Baumann K, Frassdorf J, Preckel B, Rosen P, Schlack W, Weber NC: **Ischemic preconditioning phosphorylates mitogen-activated kinases and heat shock protein 27 in the diabetic rat heart.** *Horm.Metab Res.* 2009, **41**:10-15.
190. Marais E, Genade S, Salie R, Huisamen B, Maritz S, Moolman JA, Lochner A: **The temporal relationship between p38 MAPK and HSP27 activation in ischaemic and pharmacological preconditioning.** *Basic Res.Cardiol.* 2005, **100**:35-47.
191. Lochner A, Marais E, Genade S, Huisamen B, du Toit EF, Moolman JA: **Protection of the ischaemic heart: investigations into the phenomenon of ischaemic preconditioning.** *Cardiovasc.J.Afr.* 2009, **20**:43-51.
192. Arrigo AP, Gibert B: **Protein interactomes of three stress inducible small heat shock proteins: HspB1, HspB5 and HspB8.** *Int.J.Hyperthermia* 2013, **29**:409-422.
193. Ghayour-Mobarhan M, Saber H, Ferns GA: **The potential role of heat shock protein 27 in cardiovascular disease.** *Clin.Chim.Acta* 2012, **413**:15-24.
194. Belzacq AS, Vieira HL, Kroemer G, Brenner C: **The adenine nucleotide translocator in apoptosis.** *Biochimie* 2002, **84**:167-176.
195. Leung AW, Varanyuwatana P, Halestrap AP: **The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition.** *J.Biol.Chem.* 2008, **283**:26312-26323.
196. Timohhina N, Guzun R, Tepp K, Monge C, Varikmaa M, Vija H, Sikk P, Kaambre T, Sackett D, Saks V: **Direct measurement of energy fluxes from mitochondria into cytoplasm in permeabilized cardiac cells in situ: some evidence for Mitochondrial Interactosome.** *J.Bioenerg.Biomembr.* 2009, **41**:259-275.
197. Saks V, Guzun R, Timohhina N, Tepp K, Varikmaa M, Monge C, Beraud N, Kaambre T, Kuznetsov A, Kadaja L, Eimre M, Seppet E: **Structure-function relationships in feedback regulation of energy fluxes in vivo in health and disease: mitochondrial interactosome.** *Biochim.Biophys.Acta* 2010, **1797**:678-697.
198. Pedersen PL: **Transport ATPases into the year 2008: a brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease.** *J.Bioenerg.Biomembr.* 2007, **39**:349-355.
199. Senyilmaz D, Teleman AA: **Chicken or the egg: Warburg effect and mitochondrial dysfunction.** *F1000Prime.Rep.* 2015, **7**:41.

200. Calmettes G, John SA, Weiss JN, Ribalet B: **Hexokinase-mitochondrial interactions regulate glucose metabolism differentially in adult and neonatal cardiac myocytes.** *J.Gen.Physiol* 2013, **142**:425-436.
201. Berg J.M., Tymoczko J.L, Stryer L.: *Biochemie 5. Auflage.* Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg; 2003.
202. Portman MA: **Adenine nucleotide translocator in heart.** *Mol.Genet.Metab* 2000, **71**:445-450.
203. Chen C, Ko Y, Delannoy M, Ludtke SJ, Chiu W, Pedersen PL: **Mitochondrial ATP synthasome: three-dimensional structure by electron microscopy of the ATP synthase in complex formation with carriers for Pi and ADP/ATP.** *J.Biol.Chem.* 2004, **279**:31761-31768.
204. Giorgio V, von SS, Antoniel M, Fabbro A, Fogolari F, Forte M, Glick GD, Petronilli V, Zoratti M, Szabo I, Lippe G, Bernardi P: **Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2013, **110**:5887-5892.
205. Bonora M, Bononi A, De ME, Giorgi C, Lebedzinska M, Marchi S, Patergnani S, Rimessi A, Suski JM, Wojtala A, Wieckowski MR, Kroemer G, Galluzzi L, Pinton P: **Role of the c subunit of the FO ATP synthase in mitochondrial permeability transition.** *Cell Cycle* 2013, **12**:674-683.
206. Li B, Chauvin C, De PD, De OF, Gharib A, Vial G, Lablanche S, Leverve X, Bernardi P, Ovize M, Fontaine E: **Inhibition of complex I regulates the mitochondrial permeability transition through a phosphate-sensitive inhibitory site masked by cyclophilin D.** *Biochim.Biophys.Acta* 2012, **1817**:1628-1634.
207. Alavian KN, Beutner G, Lazrove E, Sacchetti S, Park HA, Licznerski P, Li H, Nabili P, Hockensmith K, Graham M, Porter GA, Jr., Jonas EA: **An uncoupling channel within the c-subunit ring of the F1FO ATP synthase is the mitochondrial permeability transition pore.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2014, **111**:10580-10585.
208. Batandier C, Leverve X, Fontaine E: **Opening of the mitochondrial permeability transition pore induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex I.** *J.Biol.Chem.* 2004, **279**:17197-17204.
209. Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Hirsch T, Susin SA, Masse B, Kroemer G: **Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis.** *FEBS Lett.* 1996, **384**:53-57.
210. Kantrow SP, Piantadosi CA: **Release of cytochrome c from liver mitochondria during permeability transition.** *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1997, **232**:669-671.
211. Marchetti P, Castedo M, Susin SA, Zamzami N, Hirsch T, Macho A, Haefner A, Hirsch F, Geuskens M, Kroemer G: **Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis.** *J.Exp.Med.* 1996, **184**:1155-1160.
212. Genova ML, Baracca A, Biondi A, Casalena G, Faccioli M, Falasca AI, Formiggini G, Sgarbi G, Solaini G, Lenaz G: **Is supercomplex organization of the respiratory chain required for optimal electron transfer activity?** *Biochim.Biophys.Acta* 2008, **1777**:740-746.
213. Acin-Perez R, Fernandez-Silva P, Peleato ML, Perez-Martos A, Enriquez JA: **Respiratory active mitochondrial supercomplexes.** *Mol.Cell* 2008, **32**:529-539.

214. Andreyev AY, Bondareva TO, Dedukhova VI, Mokhova EN, Skulachev VP, Tsofina LM, Volkov NI, Vygodina TV: **The ATP/ADP-antiporter is involved in the uncoupling effect of fatty acids on mitochondria.** *Eur.J.Biochem.* 1989, **182**:585-592.
215. Ciapaite J, Bakker SJ, Diamant M, van EG, Heine RJ, Westerhoff HV, Krab K: **Metabolic control of mitochondrial properties by adenine nucleotide translocator determines palmitoyl-CoA effects. Implications for a mechanism linking obesity and type 2 diabetes.** *FEBS J.* 2006, **273**:5288-5302.
216. Roussel J, Thireau J, Brenner C, Saint N, Scheuermann V, Lacampagne A, Le Guennec JY, Fauconnier J: **Palmitoyl-carnitine increases RyR2 oxidation and sarcoplasmic reticulum Ca(2+) leak in cardiomyocytes: Role of adenine nucleotide translocase.** *Biochim.Biophys.Acta* 2015, **1852**:749-758.
217. Maldonado EN, Lemasters JJ: **ATP/ADP ratio, the missed connection between mitochondria and the Warburg effect.** *Mitochondrion.* 2014, **19 Pt A**:78-84.
218. Shrago E, Ball M, Sul HS, Baquer NZ, McLean P: **Interrelationship in the regulation of pyruvate dehydrogenase and adenine-nucleotide translocase by palmitoyl-CoA in isolated mitochondria.** *Eur.J.Biochem.* 1977, **75**:83-89.
219. Mildaziene V, Baniene R, Nauciene Z, Bakker BM, Brown GC, Westerhoff HV, Kholodenko BN: **Calcium indirectly increases the control exerted by the adenine nucleotide translocator over 2-oxoglutarate oxidation in rat heart mitochondria.** *Arch.Biochem.Biophys.* 1995, **324**:130-134.
220. Dror V, Kalynyak TB, Bychkivska Y, Frey MH, Tee M, Jeffrey KD, Nguyen V, Luciani DS, Johnson JD: **Glucose and endoplasmic reticulum calcium channels regulate HIF-1beta via presenilin in pancreatic beta-cells.** *J.Biol.Chem.* 2008, **283**:9909-9916.
221. Filippin L, Magalhaes PJ, Di BG, Colella M, Pozzan T: **Stable interactions between mitochondria and endoplasmic reticulum allow rapid accumulation of calcium in a subpopulation of mitochondria.** *J.Biol.Chem.* 2003, **278**:39224-39234.
222. Raturi A, Simmen T: **Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: the mitochondria-associated membrane (MAM).** *Biochim.Biophys.Acta* 2013, **1833**:213-224.
223. Patergnani S, Missiroli S, Marchi S, Giorgi C: **Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes Microenvironment: Targeting Autophagic and Apoptotic Pathways in Cancer Therapy.** *Front Oncol.* 2015, **5**:173.
224. Szabadkai G, Bianchi K, Varnai P, De SD, Wieckowski MR, Cavagna D, Nagy AI, Balla T, Rizzuto R: **Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca2+ channels.** *J.Cell Biol.* 2006, **175**:901-911.
225. Moreno-Sanchez R: **Contribution of the translocator of adenine nucleotides and the ATP synthase to the control of oxidative phosphorylation and arsenylation in liver mitochondria.** *J.Biol.Chem.* 1985, **260**:12554-12560.
226. Moreno-Sanchez R: **Regulation of oxidative phosphorylation in mitochondria by external free Ca2+ concentrations.** *J.Biol.Chem.* 1985, **260**:4028-4034.
227. Desouza M, Gunning PW, Stehn JR: **The actin cytoskeleton as a sensor and mediator of apoptosis.** *Bioarchitecture.* 2012, **2**:75-87.

228. Wu M, Kalyanasundaram A, Zhu J: **Structural and biomechanical basis of mitochondrial movement in eukaryotic cells.** *Int.J.Nanomedicine.* 2013, **8**:4033-4042.
229. Rehling P, Wiedemann N, Pfanner N, Truscott KN: **The mitochondrial import machinery for preproteins.** *Crit Rev.Biochem.Mol.Biol.* 2001, **36**:291-336.
230. Zerial M, McBride H: **Rab proteins as membrane organizers.** *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2001, **2**:107-117.
231. Hutagalung AH, Novick PJ: **Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology.** *Physiol Rev.* 2011, **91**:119-149.
232. De MA: **Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: a form of communication during injury, infection, and cell damage. It is never known how far a controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa.** *Cell Stress.Chaperones.* 2011, **16**:235-249.
233. Vicencio JM, Yellon DM, Sivaraman V, Das D, Boi-Doku C, Arjun S, Zheng Y, Riquelme JA, Kearney J, Sharma V, Multhoff G, Hall AR, Davidson SM: **Plasma exosomes protect the myocardium from ischemia-reperfusion injury.** *J.Am.Coll.Cardiol.* 2015, **65**:1525-1536.
234. Tanaka K: **Proteasomes: structure and biology.** *J.Biochem.* 1998, **123**:195-204.
235. Rosenquist M: **14-3-3 proteins in apoptosis.** *Braz.J.Med.Biol.Res.* 2003, **36**:403-408.
236. Quinsay MN, Lee Y, Rikka S, Sayen MR, Molkenin JD, Gottlieb RA, Gustafsson AB: **Bnip3 mediates permeabilization of mitochondria and release of cytochrome c via a novel mechanism.** *J.Mol.Cell Cardiol.* 2010, **48**:1146-1156.
237. Frezza C, Cipolat S, Martins de BO, Micaroni M, Beznoussenko GV, Rudka T, Bartoli D, Polishuck RS, Danial NN, De SB, Scorrano L: **OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion.** *Cell* 2006, **126**:177-189.
238. Cogliati S, Frezza C, Soriano ME, Varanita T, Quintana-Cabrera R, Corrado M, Cipolat S, Costa V, Casarin A, Gomes LC, Perales-Clemente E, Salviati L, Fernandez-Silva P, Enriquez JA, Scorrano L: **Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency.** *Cell* 2013, **155**:160-171.
239. Zhivotovsky B, Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G: **Adenine nucleotide translocase: a component of the phylogenetically conserved cell death machinery.** *Cell Death.Differ.* 2009, **16**:1419-1425.
240. Schmitt E, Gehrmann M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C: **Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy.** *J.Leukoc.Biol.* 2007, **81**:15-27.
241. Lavoie JN, Lambert H, Hickey E, Weber LA, Landry J: **Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27.** *Mol.Cell Biol.* 1995, **15**:505-516.
242. Kang BH, Plescia J, Dohi T, Rosa J, Doxsey SJ, Altieri DC: **Regulation of tumor cell mitochondrial homeostasis by an organelle-specific Hsp90 chaperone network.** *Cell* 2007, **131**:257-270.

243. Xiang F, Huang YS, Shi XH, Zhang Q: **Mitochondrial chaperone tumour necrosis factor receptor-associated protein 1 protects cardiomyocytes from hypoxic injury by regulating mitochondrial permeability transition pore opening.** *FEBS J.* 2010, **277**:1929-1938.
244. Li R, Li J, Sang D, Lan Q: **Phosphorylation of AKT induced by phosphorylated Hsp27 confers the apoptosis-resistance in t-AUCB-treated glioblastoma cells in vitro.** *J.Neurooncol.* 2015, **121**:83-89.
245. Li Y, Si R, Feng Y, Chen HH, Zou L, Wang E, Zhang M, Warren HS, Sosnovik DE, Chao W: **Myocardial ischemia activates an injurious innate immune signaling via cardiac heat shock protein 60 and Toll-like receptor 4.** *J.Biol.Chem.* 2011, **286**:31308-31319.
246. Gupta S, Knowlton AA: **HSP60 trafficking in adult cardiac myocytes: role of the exosomal pathway.** *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2007, **292**:H3052-H3056.
247. Hunter-Lavin C, Davies EL, Bacelar MM, Marshall MJ, Andrew SM, Williams JH: **Hsp70 release from peripheral blood mononuclear cells.** *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2004, **324**:511-517.
248. Calhoun BC, Goldenring JR: **Rab proteins in gastric parietal cells: evidence for the membrane recycling hypothesis.** *Yale J.Biol.Med.* 1996, **69**:1-8.
249. Malik ZA, Kott KS, Poe AJ, Kuo T, Chen L, Ferrara KW, Knowlton AA: **Cardiac myocyte exosomes: stability, HSP60, and proteomics.** *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2013, **304**:H954-H965.
250. Zheng J, Fang J, Yin YJ, Wang XC, Ren AJ, Bai J, Sun XJ, Yuan WJ, Lin L: **Leptin protects cardiomyocytes from serum-deprivation-induced apoptosis by increasing anti-oxidant defence.** *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* 2010, **37**:955-962.
251. Marunouchi T, Inomata S, Sanbe A, Takagi N, Tanonaka K: **Protective effect of geranylgeranylacetone via enhanced induction of HSPB1 and HSPB8 in mitochondria of the failing heart following myocardial infarction in rats.** *Eur.J.Pharmacol.* 2014, **730**:140-147.
252. Charette SJ, Landry J: **The interaction of HSP27 with Daxx identifies a potential regulatory role of HSP27 in Fas-induced apoptosis.** *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2000, **926**:126-131.
253. Salari S, Seibert T, Chen YX, Hu T, Shi C, Zhao X, Cuerrier CM, Raizman JE, O'Brien ER: **Extracellular HSP27 acts as a signaling molecule to activate NF-kappaB in macrophages.** *Cell Stress.Chaperones.* 2013, **18**:53-63.
254. De AK, Kodys KM, Yeh BS, Miller-Graziano C: **Exaggerated human monocyte IL-10 concomitant to minimal TNF-alpha induction by heat-shock protein 27 (Hsp27) suggests Hsp27 is primarily an antiinflammatory stimulus.** *J.Immunol.* 2000, **165**:3951-3958.
255. Luo X, Tao L, Lin P, Mo X, Chen H: **Extracellular heat shock protein 72 protects schwann cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis.** *J.Neurosci.Res.* 2012, **90**:1261-1269.
256. Pockley AG, Muthana M, Calderwood SK: **The dual immunoregulatory roles of stress proteins.** *Trends Biochem.Sci.* 2008, **33**:71-79.
257. Zimmermann S, Moelling K: **Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B).** *Science* 1999, **286**:1741-1744.

258. Lloyd AC: **Distinct functions for ERKs?** *J.Biol.* 2006, **5**:13.
259. Sturgill TW: **MAP kinase: it's been longer than fifteen minutes.** *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 2008, **371**:1-4.
260. Qin J, Xin H, Nickoloff BJ: **Specifically targeting ERK1 or ERK2 kills melanoma cells.** *J.Transl.Med.* 2012, **10**:15.
261. Miller-Graziano CL, De A, Laudanski K, Herrmann T, Bandyopadhyay S: **HSP27: an anti-inflammatory and immunomodulatory stress protein acting to dampen immune function.** *Novartis.Found.Symp.* 2008, **291**:196-208.
262. Krishnamurthy K, Kanagasabai R, Druhan LJ, Ilangovan G: **Heat shock protein 25-enriched plasma transfusion preconditions the heart against doxorubicin-induced dilated cardiomyopathy in mice.** *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2012, **341**:829-839.
263. Sidera K, Patsavoudi E: **Extracellular HSP90: conquering the cell surface.** *Cell Cycle* 2008, **7**:1564-1568.
264. Bakthisaran R, Tangirala R, Rao C: **Small heat shock proteins: Role in cellular functions and pathology.** *Biochim.Biophys.Acta* 2015, **1854**:291-319.
265. Kaiser F, Steptoe A, Thompson S, Henderson B: **Monocyte cytokine synthesis in response to extracellular cell stress proteins suggests these proteins exhibit network behaviour.** *Cell Stress.Chaperones.* 2014, **19**:135-144.
266. Vega VL, Rodriguez-Silva M, Frey T, Gehrman M, Diaz JC, Steinem C, Multhoff G, Arispe N, De MA: **Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages.** *J.Immunol.* 2008, **180**:4299-4307.
267. Kang SH, Kang KW, Kim KH, Kwon B, Kim SK, Lee HY, Kong SY, Lee ES, Jang SG, Yoo BC: **Upregulated HSP27 in human breast cancer cells reduces Herceptin susceptibility by increasing Her2 protein stability.** *BMC.Cancer* 2008, **8**:286.
268. Zoubeidi A, Zardan A, Beraldi E, Fazli L, Sowery R, Rennie P, Nelson C, Gleave M: **Cooperative interactions between androgen receptor (AR) and heat-shock protein 27 facilitate AR transcriptional activity.** *Cancer Res.* 2007, **67**:10455-10465.
269. Ebel D, Toma O, Appler S, Baumann K, Frassdorf J, Preckel B, Rosen P, Schlack W, Weber NC: **Ischemic preconditioning phosphorylates mitogen-activated kinases and heat shock protein 27 in the diabetic rat heart.** *Horm.Metab Res.* 2009, **41**:10-15.
270. Ran K, Zhu R, Lu XH, Zou DQ, Li H, Chang YT: **[Protective effect of heat-shock protein 27 on myocardium with isoflurane preconditioning in myocardial ischemia/reperfusion injury of myocardium in rabbit].** *Zhongguo Wei Zhong.Bing.Ji.Jiu.Yi.Xue.* 2007, **19**:683-686.
271. Arnaud C, Joyeux-Faure M, Bottari S, Godin-Ribuot D, Ribouot C: **New insight into the signalling pathways of heat stress-induced myocardial preconditioning: protein kinase Cepsilon translocation and heat shock protein 27 phosphorylation.** *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* 2004, **31**:129-133.
272. Jang JY, Jeon YK, Kim CW: **Degradation of HER2/neu by ANT2 shRNA suppresses migration and invasiveness of breast cancer cells.** *BMC.Cancer* 2010, **10**:391.

273. Pockley AG, Shepherd J, Corton JM: **Detection of heat shock protein 70 (Hsp70) and anti-Hsp70 antibodies in the serum of normal individuals.** *Immunol.Invest* 1998, **27**:367-377.
274. Hightower LE, Guidon PT, Jr.: **Selective release from cultured mammalian cells of heat-shock (stress) proteins that resemble glia-axon transfer proteins.** *J.Cell Physiol* 1989, **138**:257-266.
275. Nozaki N, Shishido T, Takeishi Y, Kubota I: **Modulation of doxorubicin-induced cardiac dysfunction in toll-like receptor-2-knockout mice.** *Circulation* 2004, **110**:2869-2874.
276. Frantz S, Kelly RA, Bourcier T: **Role of TLR-2 in the activation of nuclear factor kappaB by oxidative stress in cardiac myocytes.** *J.Biol.Chem.* 2001, **276**:5197-5203.
277. Ponce NE, Cano RC, Carrera-Silva EA, Lima AP, Gea S, Aoki MP: **Toll-like receptor-2 and interleukin-6 mediate cardiomyocyte protection from apoptosis during Trypanosoma cruzi murine infection.** *Med.Microbiol.Immunol.* 2012, **201**:145-155.
278. Brown JM, Grosso MA, Terada LS, Whitman GJ, Banerjee A, White CW, Harken AH, Repine JE: **Endotoxin pretreatment increases endogenous myocardial catalase activity and decreases ischemia-reperfusion injury of isolated rat hearts.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1989, **86**:2516-2520.
279. Chao W, Shen Y, Li L, Rosenzweig A: **Importance of FADD signaling in serum deprivation- and hypoxia-induced cardiomyocyte apoptosis.** *J.Biol.Chem.* 2002, **277**:31639-31645.
280. Meng X, Ao L, Brown JM, Meldrum DR, Sheridan BC, Cain BS, Banerjee A, Harken AH: **LPS induces late cardiac functional protection against ischemia independent of cardiac and circulating TNF-alpha.** *Am.J.Physiol* 1997, **273**:H1894-H1902.
281. Bagchi AK, Sharma A, Dhingra S, Lehenbauer Ludke AR, Al-Shudiefat AA, Singal PK: **Interleukin-10 activates Toll-like receptor 4 and requires MyD88 for cardiomyocyte survival.** *Cytokine* 2013, **61**:304-314.
282. Zhu X, Zhao H, Graveline AR, Buys ES, Schmidt U, Bloch KD, Rosenzweig A, Chao W: **MyD88 and NOS2 are essential for toll-like receptor 4-mediated survival effect in cardiomyocytes.** *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2006, **291**:H1900-H1909.
283. Oyama J, Blais C, Jr., Liu X, Pu M, Kobzik L, Kelly RA, Bourcier T: **Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice.** *Circulation* 2004, **109**:784-789.
284. Riad A, Jager S, Sobirey M, Escher F, Yaulema-Riss A, Westermann D, Karatas A, Heimesaat MM, Bereswill S, Dragun D, Pauschinger M, Schultheiss HP, Tschope C: **Toll-like receptor-4 modulates survival by induction of left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice.** *J.Immunol.* 2008, **180**:6954-6961.

9. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

9.1. Veröffentlichungen

Fernandez-Alvaro E, Kourist R, **Winter J**, Bottcher D, Liebeton K, Naumer C, Eck J, Leggewie C, Jaeger KE, Streit W, Bornscheuer UT: Enantioselective kinetic resolution of phenylalkyl carboxylic acids using metagenome-derived esterases. *Microb.Biotechnol.* 2010, 3:59-64.

Kuhl U, Ebermann L, Lassner D, Klingel K, Klumpe I, **Winter J**, Zeichhardt H, Schultheiss HP, Dörner A: Adenine nucleotide translocase 1 expression affects enterovirus infection in human and murine hearts. *Int.J.Cardiol.* 2014, 172:e449-e452.

Winter J, Klumpe I, Heger J, Rauch U, Schultheiss HP, Landmesser U, Dörner A: Adenine nucleotide translocase 1 overexpression protects cardiomyocytes against hypoxia via increased ERK1/2 and AKT activation. *Cellular Signalling* 2016, 28(1):152-159.

9.2. Kongressbeiträge

* **Winter J**, Klumpe I, Hammer E, Heger J, Schultheiss HP, Dörner A: Adenin-Nukleotid-Translokator 1 (ANT1) .Modulator der zellprotektiven Signaltransduktion unter Hypoxie. (Poster) Dreiländertreffen Herzinsuffizienz, Herz im Stress (2013).

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**, Tschöpe 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).

* Diese Publikationen enthalten Daten der vorliegenden Arbeit.

10. DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. Schultheiss für die freundliche Unterstützung und die Überlassung des Themas.

Darüber hinaus danke ich Herrn Prof. Dr. Markus Wahl aus dem Fachbereich Chemie, Biologie und Pharmazie der Freien Universität Berlin, für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Andrea Dörner für die gute Betreuung meiner Arbeit im Labor, die fortwährende Hilfsbereitschaft, das stets offene Ohr, die freundliche Zusammenarbeit, die aufbauenden Worte und den inspirierenden, fachlichen Austausch.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau Dr. Elke Hammer vom Institut für funktionelle Genomforschung der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald für die Durchführung der massenspektroskopischen Analysen.

Ich danke Frau Dr. Inga Klumpe, Herrn Dr. Alexander Jenke, Frau Dr. Alice Weithäuser, Frau Diana Bösel, Frau Sabine Knüppel und Frau Xiaomin Wang für die Unterstützung bei den Laborarbeiten, die Bereitstellung diverser Arbeitsmaterialien, das stets offene Ohr, ihre Diskussionsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken, die mich kontinuierlich unterstützt haben und immer wieder Verständnis für mich aufbrachten.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die auch in schweren Tagen die richtigen Worte fand und es immer wieder aufs neue verstand mich aufzumuntern. Danke, dass ich euch haben darf.

II. LEBENS LAUF

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

12. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

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

Berlin den 27.11.2015

.....

(Julia Winter)

13. ANHANG

Tabelle A1: Komponenten des ANT1-Core-Interaktoms. Mitochondrial lokalisierte Proteine sind grau hinterlegt.

Nummer	Proteinbezeichnung	Uniprot-Zugangsnummer	Gen-symbol	Molekular-gewicht	Lokalisation
1	<i>14-3-3 protein epsilon</i>	P62260	Ywhae	29 kDa	Zytoplasma
2	<i>14-3-3 protein eta</i>	P68511	Ywhah	28 kDa	Zytoplasma
3	<i>14-3-3 protein zeta/delta</i>	P63102	Ywhaz	28 kDa	Zytoplasma
4	<i>26S protease regulatory subunit 4</i>	P62193	Psmc1	49 kDa	Zytoplasma
5	<i>26S protease regulatory subunit 6A</i>	Q63569	Psmc3	49 kDa	Zytoplasma
6	<i>26S protease regulatory subunit 8</i>	P62198	Psmc5	46 kDa	Zytoplasma
7	<i>26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2</i>	Q4FZT9	Psmc2	100 kDa	Plasmamembran
8	<i>28S ribosomal protein S31, mitochondrial</i>	B0BN56	Mrps31	44 kDa	Mitochondrium
9	<i>2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial</i>	Q5XI78	Ogdh	116 kDa	Mitochondrium
10	<i>2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha, mitochondrial</i>	P11960	Bckdha	50 kDa	Mitochondrium
11	<i>3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2</i>	O70351	Hsd17b10	27 kDa	Mitochondrium
12	<i>3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial</i>	P13437	Acaa2	42 kDa	Mitochondrium
13	<i>40S ribosomal protein S18</i>	P62271	Rps18	18 kDa	Zytoplasma/ Ribosomen
14	<i>40S ribosomal protein S3</i>	P62909	Rps3	27 kDa	Mitochondrium/ Zytoplasma/ Ribosomen
15	<i>4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase</i>	Q9JLJ3	Aldh9a1	54 kDa	Mitochondrium/ Zytoplasma
16	<i>60S acidic ribosomal protein P0</i>	P19945	Rplp0	34 kDa	Zytoplasma/ Ribosomen
17	<i>6-phosphofruktokinase, muscle type</i>	P47858	Pfkm	86 kDa	Zytoplasma
18	<i>Ab2-417</i>	F1LMP2	Tf	107 kDa	Plasmamembran
19	<i>Acad9 protein, Acyl-CoA Dehydrogenase Family, Member 9</i>	B1WC61	Acad9	69 kDa	Mitochondrium/ Zellkern
20	<i>Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial</i>	P17764	Acat1	45 kDa	Mitochondrium
21	<i>Actin, alpha cardiac muscle 1</i>	P68035	Actc1	42 kDa	Zytoskelett
22	<i>Actin, alpha skeletal muscle</i>	P68136	Acta1	42 kDa	Zytoskelett
23	<i>Actin, cytoplasmic 1</i>	P60711	Actb	42 kDa	Zytoskelett
24	<i>Acyl-CoA thioesterase 2</i>	Q6IMX8	Acot2	50 kDa	Mitochondrium
25	<i>Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain</i>	Q5M9H2	Acadvl	71 kDa	Mitochondrium

Nummer	Proteinbezeichnung	Uniprot-Zugangsnummer	Gen-symbol	Molekular-gewicht	Lokalisation
26	<i>Adenylate kinase 3</i>	Q6P2A5	Ak3	25 kDa	Mitochondrium
27	<i>ADP/ATP translocase 1</i>	Q05962	Slc25a4	33 kDa	Mitochondrium
28	<i>ADP-ribosylation factor 4</i>	P61751	Arf4	20 kDa	Golgi Apparat
29	<i>Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial</i>	P11884	Aldh2	56 kDa	Mitochondrium
30	<i>Alpha-crystallin B chain</i>	P23928	Cryab	20 kDa	Mitochondrium/ Zytoplasma
31	<i>Aspartate aminotransferase, mitochondrial</i>	P00507	Got2	47 kDa	Mitochondrium
32	<i>Aspartyl aminopeptidase</i>	Q4V8H5	Dnpep	53 kDa	Zytoplasma
33	<i>ATP synthase subunit alpha</i>	F1LP05	Atp5a1	60 kDa	Mitochondrium
34	<i>ATP synthase subunit b, mitochondrial</i>	P19511	Atp5f1	29 kDa	Mitochondrium
35	<i>ATP synthase subunit beta, mitochondrial</i>	P10719	Atp5b	56 kDa	Mitochondrium
36	<i>ATP synthase subunit d, mitochondrial</i>	P31399	Atp5h	19 kDa	Mitochondrium
37	<i>ATP synthase subunit gamma, mitochondrial</i>	P35435	Atp5c1	30 kDa	Mitochondrium
38	<i>ATP-binding cassette sub-family B member 7, mitochondrial</i>	Q704E8	Abcb7	83 kDa	Mitochondrium
39	<i>Calsequestrin-2</i>	P51868	Casq2	48 kDa	SR
40	<i>Carnitine O-palmitoyltransferase 1, muscle isoform</i>	Q63704	Cpt1b	88 kDa	Mitochondrium
41	<i>Clathrin heavy chain 1</i>	P11442	Cltc	192 kDa	Plasmavesikel
42	<i>COP9 signalosome complex subunit 4</i>	Q68FS2	Cops4	46 kDa	Zytoplasma
43	<i>Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial</i>	P32551	Uqcrc2	48 kDa	Mitochondrium
44	<i>Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial</i>	P10888	Cox4i1	20 kDa	Mitochondrium
45	<i>Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial</i>	P11240	Cox5a	16 kDa	Mitochondrium
46	<i>Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1</i>	P38650	Dync1h1	532 kDa	Zytoplasma/ Zytoskelett
47	<i>Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial</i>	Q6P6R2	Dld	54 kDa	Mitochondrium
48	<i>Dihydropyrimidinase-related protein 2</i>	P47942	Dpysl2	62 kDa	Zytoskelett
49	<i>EH-domain containing 4</i>	Q8R3Z7	Ehd4	61 kDa	ER
50	<i>Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial</i>	P13803	Etfa	35 kDa	Mitochondrium
51	<i>Elongation factor G, mitochondrial</i>	Q07803	Gfm1	83 kDa	Mitochondrium
52	<i>Elongation factor Tu, mitochondrial</i>	P85834	Tufm	50 kDa	Mitochondrium

Nummer	Proteinbezeichnung	Uniprot-Zugangsnummer	Gen-symbol	Molekular-gewicht	Lokalisation
53	<i>Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 5 (Epsilon) (Predicted), isoform CRA_a</i>	D4AC36	Eif3f	38 kDa	Zytoplasma
54	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4A1</i>	Q6P3V8	Eif4a1	46 kDa	Zytoplasma
55	<i>Glioblastoma amplified sequence</i>	Q5RK08	Gbas	33 kDa	Mitochondrium
56	<i>Glycogen phosphorylase, brain form</i>	P53534	Pygb	96 kDa	Zytoplasma
57	<i>Glycogen phosphorylase, muscle form</i>	P09812	Pygm	97 kDa	Zytoplasma
58	<i>Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1</i>	P63245	Gnb2l1	35 kDa	Mitochondrium/ Plasmamembran/ Zytoplasma/ Zellkern/ Zytoskelett
59	<i>Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial</i>	Q5XHZ0	Trap1	80 kDa	Mitochondrium
60	<i>Heat shock protein beta-1</i>	P42930	Hspb1	23 kDa	Zytoplasma
61	<i>Heat shock protein HSP 90-beta</i>	P34058	Hsp90ab 1	83 kDa	Mitochondrium/ Zytoplasma
62	<i>Hexokinase-2</i>	P27881	Hk2	103 kDa	Mitochondrium/ Zytoplasma
63	<i>Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit beta, mitochondrial</i>	Q68FX0	ldh3B	42 kDa	Mitochondrium
64	<i>Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial</i>	P56574	ldh2	51 kDa	Mitochondrium
65	<i>Isoform 3 of Dynamin-like 120 kDa protein, mitochondrial</i>	Q2TA68	Opa1	116 kDa	Mitochondrium
66	<i>Isoform SERCA2A of Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2</i>	P11507	Atp2a2	110 kDa	ER/SR
67	<i>Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial</i>	Q5SGE0	Lrpprc	157 kDa	Mitochondrium
68	<i>L-lactate dehydrogenase A chain</i>	P04642	Ldha	36 kDa	Zytoplasma
69	<i>L-lactate dehydrogenase B chain</i>	P42123	Ldhb	37 kDa	Zytoplasma
70	<i>Lon protease homolog, mitochondrial</i>	Q924S5	Lonp1	106 kDa	Mitochondrium
71	<i>Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 1</i>	P18163	Acsl1	78 kDa	Mitochondrium/ ER
72	<i>LRRGT00050</i>	Q6TXE9	Eprs	167 kDa	Zytoplasma
73	<i>Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial</i>	Q5XIT9	Mccc2	62 kDa	Mitochondrium
74	<i>MICOS complex subunit Mic60</i>	Q3KR86	Immt	82 kDa	Mitochondrium
75	<i>Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein</i>	P97700	Slc25a11	34 kDa	Mitochondrium

Nummer	Proteinbezeichnung	Uniprot-Zugangsnummer	Gen-symbol	Molekular-gewicht	Lokalisation
76	<i>Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM44</i>	O35094	Timm44	51 kDa	Mitochondrium
77	<i>Mitochondrial import receptor subunit TOM22 homolog</i>	Q75Q41	Tomm22	15 kDa	Mitochondrium
78	<i>Monocarboxylate transporter 1</i>	P53987	Slc16a1	53 kDa	Plasmamembran
79	<i>Myosin-6</i>	P02563	Myh6	224 kDa	Zytoskelett
80	<i>Myosin-7</i>	P02564	Myh7	223 kDa	Zytoskelett
81	<i>Myosin-binding protein C, cardiac-type</i>	P56741	Mybpc3	141 kDa	Zytoskelett
82	<i>NADH dehydrogenase (Ubiquinone) Fe-S protein 3 (Predicted), isoform CRA_c</i>	D3ZG43	Ndufs3	30 kDa	Mitochondrium
83	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial</i>	Q561S0	Ndufa10	40 kDa	Mitochondrium
84	<i>NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial</i>	Q66HF1	Ndufs1	79 kDa	Mitochondrium
85	<i>Nicotinamide nucleotide transhydrogenase</i>	Q5BJZ3	Nnt	114 kDa	Mitochondrium
86	<i>Paraplegin</i>	Q7TT47	Spg7	82 kDa	Mitochondrium
87	<i>Pitrialsin metallopeptidase 1 (Predicted)</i>	D3ZUF9	Pitrm1	113 kDa	Mitochondrium
88	<i>Probable saccharopine dehydrogenase</i>	Q6AY30	Sccpdh	47 kDa	unbekannt
89	<i>Proteasome (Prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 14</i>	F1LMW6	Psm14	33 kDa	Zytoplasma
90	<i>Proteasome (Prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 3</i>	Q5U2S7	Psm3	61 kDa	Zytoplasma
91	<i>Protein Afg3l2, AFG3-Like AAA ATPase 2</i>	F1LN92	Afg3l2	89 kDa	Mitochondrium
92	<i>Protein Ldb3, LIM Domain Binding 3</i>	Q5XIG1	Ldb3	31 kDa	Zytoplasma
93	<i>Protein Npepps, Aminopeptidase Puromycin Sensitive</i>	F1M9V7	Npepps	103 kDa	extrazelluläre Matrix
94	<i>Protein Slc25a13, Solute Carrier Family 25 (Aspartate/Glutamate Carrier), Member 13</i>	F1LZW6	Slc25a13	74 kDa	Mitochondrium
95	<i>Protein Vwa8 Willebrand Factor A Domain Containing 8</i>	D3ZIN5	Vwa8	214 kDa	Mitochondrium
96	<i>Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha</i>	P26284	Pdha1	43 kDa	Mitochondrium
97	<i>Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta</i>	P49432	Pdha2	39 kDa	Mitochondrium
98	<i>Rab GDP dissociation inhibitor beta</i>	P50399	Gdi2	51 kDa	Golgi Apparat
99	<i>Ras-related protein Rab-11B</i>	O35509	Rab11b	24 kDa	Endosomen

Nummer	Proteinbezeichnung	Uniprot-Zugangsnummer	Gen-symbol	Molekular-gewicht	Lokalisation
100	<i>Ras-related protein Rab-14</i>	P61107	Rab14	24 kDa	Golgi Apparat
101	<i>Ras-related protein Rab-18</i>	Q5EB77	Rab18	23 kDa	Golgi Apparat
102	<i>Ras-related protein Rab-1A</i>	Q6NYB7	Rab1	15 kDa	Golgi Apparat
103	<i>Ras-related protein Rab-2A</i>	F1LP82	Rab2a	24 kDa	Golgi Apparat
104	<i>Ryanodine receptor 2</i>	F1LRZ1	Ryr2	563 kDa	SR
105	<i>Slc25a3 protein, inorganic phosphate carrier</i>	Q6IRH6	Slc25a3	40 kDa	Mitochondrium
106	<i>Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial</i>	Q920L2	Sdha	72 kDa	Mitochondrium
107	<i>Succinyl-CoA ligase subunit beta</i>	F1LM47	Sucla2	50 kDa	Mitochondrium/Exosomen
108	<i>T-complex protein 1 subunit alpha</i>	P28480	Tcp1	60 kDa	Zytoskelett
109	<i>T-complex protein 1 subunit gamma</i>	Q6P502	Cct3	61 kDa	Zytoplasma
110	<i>Thioesterase superfamily member 2 (Predicted)</i>	D3ZA93	Acot13	15 kDa	Mitochondrium/ Zellkern/ Exosomen
111	<i>Tissue-type transglutaminase</i>	Q9WVJ6	Tgm2	77 kDa	Mitochondrium/ Zytoplasma/ Exosomen
112	<i>Tubulin alpha-1B chain</i>	Q6P9V9	Tuba1b	50 kDa	Zytoskelett
113	<i>Tubulin beta-2C chain</i>	Q6P9T8	Tubb2c	50 kDa	Zytoskelett
114	<i>Tubulin beta-5 chain</i>	P69897	Tubb5	50 kDa	Zytoskelett
115	<i>Voltage-dependent anion-selective channel protein 2</i>	P81155	Vdac2	32 kDa	Mitochondrium

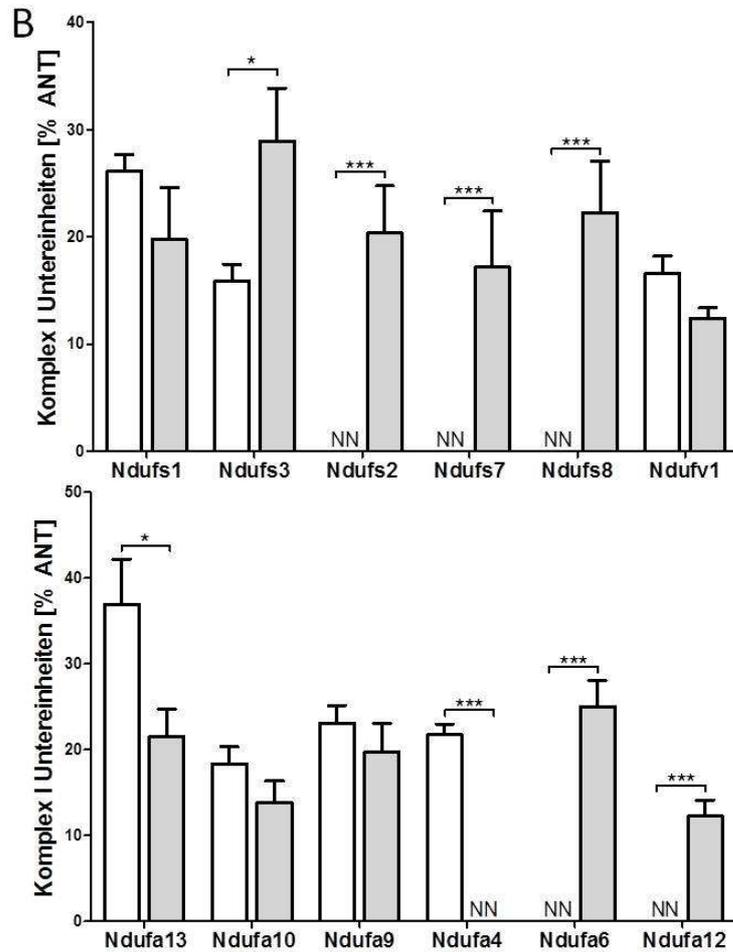
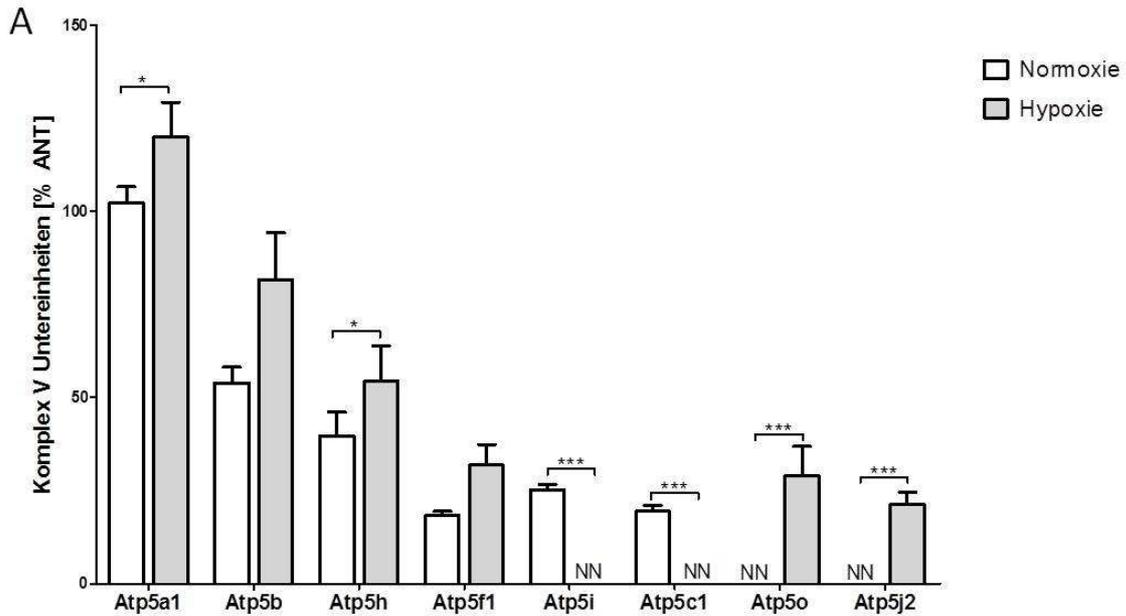


Abb. A1: Änderung der Menge der an das ANT1-Interaktom gebundenen Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe I und V. WT-NRCM wurden 24 Stunden normoxisch oder hypoxisch in Vollmedium kultiviert, anschließend Gesamtzellextrakte generiert und diese mittels IP/MS analysiert. Dargestellt ist die normalisierte Spektrenanzahl der ANT1 interagierenden Untereinheiten aus (A) Komplex V [F1/F0 ATP Synthase, ATP Synthase] und (B) Komplex I [NADH Dehydrogenase] in % der normalisierten Spektren von ANT1. Einige Komplexuntereinheiten binden sowohl unter normoxischen, als auch unter hypoxischen Bedingungen, andere lösen sich unter Hypoxie ab, wieder andere binden erst unter Hypoxie an das ANT1-Interaktom. NN= nicht nachweisbar; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 zwischen den beiden verbundenen Bedingungen; n=8-9.

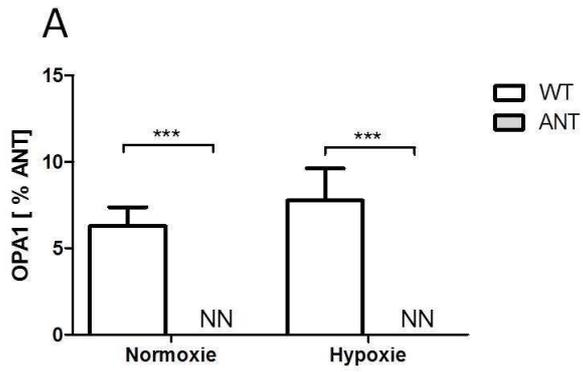


Abb. A2: Änderung der Menge des an das ANT1-Interaktom gebundenen OPA1-Proteins. WT- und ANT1tg-NRCM wurden 24 Stunden normoxisch oder hypoxisch in Vollmedium kultiviert, anschließend Gesamtzellextrakte generiert und diese mittels IP/MS analysiert. OPA1 ist bei ANT1-OE weder unter normoxischen noch unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen im ANT1-Interaktom nachweisbar. Dargestellt ist die normalisierte Spektrenanzahl von OPA1 (A) in % der normalisierten Spektren von ANT1. NN= nicht nachweisbar; *** $p < 0,001$ zwischen den beiden verbundenen Bedingungen; $n=9$.