

# **Rolle des mitochondrialen BK-Kanals für das Überleben von Kardiomyozyten bei *in vitro* Hypoxie-Reoxygenierung**

## **Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
Angelina Kniess  
aus Blaubeuren

Tübingen

2017



Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

22.01.2018

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Robert Lukowski

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Peter Ruth



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Myokardinfarkt	1
1.2 Kardialer Energiemetabolismus und physiologische Funktionen der Mitochondrien	2
1.3 Hypoxie-Reoxygenierung	4
1.3.1 Metabolische Vorgänge während Hypoxie und Reoxygenierung	4
1.3.2 Entstehung und Auswirkungen reaktiver Sauerstoffspezies	7
1.3.3 Die mitochondriale Permeabilitäts-Transitions Pore	8
1.4 Zelltodmechanismen während Hypoxie und Reoxygenierung	9
1.5 Kardioprotektion	12
1.5.1 Aktivierung intrazellulärer Signalwege	12
1.5.2 Ischämische Prä- und Postkonditionierung	15
1.6 Der NO/cGMP/cGKI-Signalweg	16
1.6.1 cGMP: Bildung und Effektoren	16
1.6.2 Inaktivierung des kardialen cGMPs durch Phosphodiesterasen	18
1.6.3 Struktur und Vorkommen der cGMP-abhängigen Proteinkinase Typ I	19
1.6.4 Zielproteine von cGMP/cGKI im kardiovaskulären System	20
1.6.5 Die Rolle des NO/cGMP/cGKI-Signalweges sowie dessen pharmakologische Modulation bei Hypoxie-Reoxygenierung	22
1.7 Der BK-Kanal	24
1.7.1 Struktur des BK-Kanals	24
1.7.2 Lokalisation und Expression im kardiovaskulären System	26
1.7.3 Physiologische Bedeutung	27
1.7.4 Die Rolle des BK-Kanals bei Hypoxie-Reoxygenierung	27
1.7.5 Pharmakologische Modulation des BK-Kanals	29
1.8 Zielsetzung	31
<b>2 Material</b>	<b>33</b>
2.1 Geräte und Software	33
2.1.1 Geräte	33
2.1.2 Software	34
2.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien	35
2.3 Substanzen, Lösungen und Puffer	36

2.3.1	Genotypisierung .....	36
2.3.2	Organentnahme und Kardiomyozytenisolation.....	37
2.3.3	Hypoxie-Reoxygenierung isolierter Kardiomyozyten .....	39
2.3.4	Bestimmung der LDH-Aktivität.....	40
2.3.5	Colorimetrische Messung der Caspase-3-Aktivität.....	41
2.3.6	Isolation von Mitochondrien .....	41
2.3.7	Respiratorische Messung isolierter Mitochondrien.....	42
2.3.8	Proteinanalytik .....	44
2.3.9	Adenovirale Transduktion adulter Kardiomyozyten.....	48
2.3.10	Anfärben von Mitochondrien mit MitoTracker® Orange CMTMRos .....	49
<b>3</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>51</b>
3.1	Methoden der Mauszucht .....	51
3.1.1	Tierhaltung .....	51
3.1.2	Verpaarung der Versuchstiere.....	51
3.2	Genotypisierung .....	53
3.2.1	DNA Isolation.....	53
3.2.2	DNA-Vervielfältigung mittels Polymerase Kettenreaktion .....	53
3.2.3	Detektion der DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese.....	55
3.3	Organentnahme und Kardiomyozytenisolation.....	56
3.3.1	Organentnahme und Bestimmung des kardialen Phänotyps .....	56
3.3.2	Isolation adulter muriner Kardiomyozyten .....	57
3.3.3	DNA-Isolation aus Kardiomyozyten und Geweben.....	58
3.4	Hypoxie-Reoxygenierung isolierter Kardiomyozyten .....	59
3.4.1	Bestimmung der LDH-Aktivität im Zellüberstand .....	61
3.4.2	Colorimetrische Messung der Caspase-3-Aktivität.....	63
3.5	Isolation von Mitochondrien .....	64
3.5.1	Isolation von Mitochondrien aus Ventrikel.....	64
3.5.2	Isolation von Mitochondrien aus Kardiomyozyten.....	64
3.5.3	Aufreinigung des Cytosols.....	65
3.6	Respiratorische Messung isolierter Mitochondrien.....	66
3.6.1	Die Clark-Sauerstoffelektrode .....	66
3.6.2	Basale Respirationsmessung .....	68
3.6.3	Auswertung und respiratorischer Kontrollindex .....	69
3.7	Proteinbiochemie.....	70
3.7.1	Proteingewinnung aus Gewebe und Zellen.....	70
3.7.2	Proteinbestimmung nach Bradford.....	71
3.7.3	Biochemische Analyse der Proteinlokalisierung in Mitochondrien.....	71
3.7.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	71
3.7.5	Western-Blot .....	72

---

3.8	Adenovirale Transduktion adulter Kardiomyozyten.....	73
3.9	Anfärben von Mitochondrien mit MitoTracker® Orange CMTMRos .....	74
3.10	Statistik .....	75
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>77</b>
4.1	Allgemeine Herzparameter der Versuchstiere und Untersuchungen zur mitochondrialen Lokalisation des BK-Kanals .....	77
4.1.1	Einfluss einer globalen BK-Deletion auf die Herzgröße und Expression des mitoBKs... ..	77
4.1.2	Einfluss der Kardiomyozyten-spezifischen BK-Deletion auf die Herzgröße und Expression des mitoBKs.....	79
4.2	Spezifität der Myh6-Cre-Rekombinase .....	81
4.3	Analyse der cGKI-Lokalisation in kardialen Mitochondrien.....	82
4.4	Einfluss des BK-Kanals auf die mitochondriale Respiration.....	84
4.4.1	Expressionsanalysen von Komplexen und Elektronencarriern der Elektronentransportkette .....	84
4.4.2	Basale Respiration von Mitochondrien aus Ventrikel .....	87
4.4.3	Basale Respiration von Mitochondrien aus Kardiomyozyten.....	88
4.5	Einfluss einer pharmakologischen Modulation des BK-Kanals auf die mitochondriale Respiration .....	91
4.5.1	Auswirkungen einer pharmakologischen Stimulation mit 8-Br-cGMP auf die mitochondriale Respiration.....	91
4.5.2	Auswirkungen einer pharmakologischen BK-Kanal-Öffnung mit NS11021 auf die mitochondriale Respiration.....	92
4.6	Zellüberleben der Kardiomyozyten bei Hypoxie-Reoxygenierung .....	95
4.6.1	Ausmaß des nekrotischen Zelltods nach Hypoxie .....	96
4.6.2	Ausmaß des nekrotischen und apoptotischen Zelltods nach Hypoxie-Reoxygenierung ..	97
4.7	Einfluss einer pharmakologischen Modulation des BK-Kanals auf das Zellüberleben von Kardiomyozyten bei <i>in vitro</i> Hypoxie-Reoxygenierung .....	99
4.7.1	Auswirkungen einer Stimulation des cGMP/cGKI-Signalweges auf den nekrotischen Zelltod bei <i>in vitro</i> Hypoxie-Reoxygenierung .....	99
4.7.2	Auswirkungen einer BK-Kanal-Öffnung mittels NS11021 auf den nekrotischen Zelltod bei <i>in vitro</i> Hypoxie-Reoxygenierung .....	101
4.8	Einfluss des kardiomyozytären BK-Kanals auf antiapoptotische Signalwege bei Hypoxie-Reoxygenierung .....	103
4.8.1	Phosphorylierungsmuster und Aktivierung von ERK1/2 und Akt als Hauptmediatoren des RISK-Signalweges.....	103
4.8.2	Phosphorylierungsmuster von GSK-3 $\beta$ als Indikator für die mPTP-Öffnungswahrscheinlichkeit .....	105
4.8.3	Phosphorylierung von PKC $\epsilon$ und Aktivierung der Effektorcaspase-3 .....	106
4.9	Adenovirale Transduktion adulter Kardiomyozyten.....	108

<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>111</b>
5.1	Kardialer Phänotyp und Expression des mitoBK-Kanals	111
5.1.1	Kardialer Phänotyp globaler und Kardiomyozyten-spezifischer BK-defizienter Mäuse	111
5.1.2	BK-Kanal Expression in kardialen Mitochondrien	112
5.2	Die cGKI ist an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert	113
5.3	Assoziation zwischen mitoBK und der Elektronentransportkette	114
5.3.1	Die basale Respiration der Mitochondrien wird durch die Deletion des BK-Kanals nicht beeinflusst	115
5.3.2	Die pharmakologische Stimulation des BK-Kanals hat keinen erheblichen Einfluss auf die mitochondriale Respiration	116
5.3.3	Paradoxe Beobachtung bei der respiratorischen Messungen von CMBK-defizienten kardiomyozytären Mitochondrien	118
5.4	Einfluss des BK-Kanals auf das Überleben isolierter Kardiomyozyten bei Hypoxie-Reoxygenierung	119
5.4.1	Der Zelltod <i>in vitro</i> wird durch nekrotische Vorgänge bestimmt	119
5.4.2	Eine pharmakologische Aktivierung des BK-Kanals bei <i>in vitro</i> Hypoxie-Reoxygenierung hat keinen Vorteil für das Überleben isolierter Kardiomyozyten	120
5.5	Limitationen der <i>in vitro</i> Untersuchungen an isolierten Mitochondrien und isolierten adulten Kardiomyozyten	122
5.6	Aktivierung wichtiger pro- <i>survival</i> Kinasen des RISK-Signalweges	124
5.7	Charakterisierung der adenoviralen Transduktion	127
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>129</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>131</b>
7.1	Phäno- und Genotypisierung der Mauslinien	131
7.2	Charakteristiken der respiratorischen Messungen	133
7.3	Hypoxie-Reoxygenierung isolierter Kardiomyozyten	138
7.4	Adenovirale Transduktion	140
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>141</b>
	<b>Publikationen und Kongressbeiträge</b>	<b>165</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>167</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>169</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Schematischer Aufbau der Mitochondrien und oxidative Phosphorylierung.....	3
Abbildung 1.2	Zelluläre Mechanismen während Hypoxie.....	5
Abbildung 1.3	Zelluläre Mechanismen zu Beginn der Reoxygenierung.....	6
Abbildung 1.4	ROS-Bildung in Kardiomyozyten .....	7
Abbildung 1.5	Extrinsischer und intrinsischer Apoptose-Signalweg.....	11
Abbildung 1.6	Aktivierung intrazellulärer kardioprotektiver Signalwege .....	15
Abbildung 1.7	Bildung und Effektoren von cGMP.....	17
Abbildung 1.8	Schematische Struktur der cGKI.....	20
Abbildung 1.9	Schematische Darstellung der $\alpha$ -Untereinheit des BK-Kanals.....	25
Abbildung 3.1	Verpaarungsschema zur Generierung der CMBK-defizienten Mäuse .....	52
Abbildung 3.2	Genotypisierung und Identifizierung der Versuchstiere.....	56
Abbildung 3.3	Langendorff-Perfusion zur Isolation von Kardiomyozyten.....	57
Abbildung 3.4	<i>In vitro</i> Normoxie- und Hypoxie-Reoxygenierung isolierter Kardiomyozyten .....	60
Abbildung 3.5	Prinzip der LDH-Aktivitätsbestimmung .....	61
Abbildung 3.6	Probennahme zur LDH-Aktivitätsmessung.....	62
Abbildung 3.7	Messaufbau der respiratorischen Messungen und Clark-Elektrodendisk.....	66
Abbildung 3.8	Reaktionen an der Clark-Elektrode .....	67
Abbildung 3.9	Auswertung der respiratorischen Messungen.....	69
Abbildung 4.1	Herz-, Größen- und Gewichtsparameter von BK-WT und BK-KO Tieren sowie ventrikuläre Expression des mitoBKs .....	78
Abbildung 4.2	Herz-, Größen- und Gewichtsparameter von CMBK-CTR und CMBK-KO Mäusen sowie Expression des mitoBKs in kardiomyozytären Mitochondrien.....	80
Abbildung 4.3	PCR-Analyse der Myh6-Cre-induzierten Deletion des BK-Kanals .....	81
Abbildung 4.4	Lokalisation der cGKI in kardialen Mitochondrien.....	83
Abbildung 4.5	Expressionslevel von Komplex I in BK-WT bzw. CMBK-CTR sowie BK- und CMBK-defizienten Tieren.....	85
Abbildung 4.6	Expressionslevel von Cytochrom-C-Oxidase und Cytochrom C .....	86
Abbildung 4.7	Einfluss des BK-Kanals auf die Respiration ventrikulärer Mitochondrien.....	88
Abbildung 4.8	Einfluss des BK-Kanals auf die Respiration von Mitochondrien aus Kardiomyozyten .....	90
Abbildung 4.9	Einfluss von 8-Br-cGMP auf die Respiration von BK-WT CMM.....	92
Abbildung 4.10	Einfluss einer BK-Kanal-Öffnung mit 300 nM NS11021 auf die Respiration von BK-WT und BK-KO CMM .....	94
Abbildung 4.11	Morphologische Veränderungen während Hypoxie.....	96
Abbildung 4.12	Einfluss des BK-Kanals auf das Überleben bei Hypoxie .....	97
Abbildung 4.13	Einfluss des BK-Kanals auf nekrotischen und apoptotischen Zelltod bei Hypoxie-Reoxygenierung.....	98

Abbildung 4.14 Einfluss von 8-Br-cGMP auf den nekrotischen Zelltod bei Hypoxie-Reoxygenierung .....	100
Abbildung 4.15 Einfluss der sGC-Aktivierung mit Cinaciguat auf den nekrotischen Zelltod bei Hypoxie-Reoxygenierung .....	101
Abbildung 4.16 Einfluss des BK-Kanalöffners NS11021 auf den nekrotischen Zelltod bei Hypoxie-Reoxygenierung .....	102
Abbildung 4.17 Phosphorylierung von ERK1/2 bei Reoxygenierung .....	104
Abbildung 4.18 Phosphorylierung von Akt bei Reoxygenierung .....	105
Abbildung 4.19 Phosphorylierung von GSK-3 $\beta$ bei Reoxygenierung .....	106
Abbildung 4.20 Aktivierung von PKC $\epsilon$ und Caspase-3 bei Reoxygenierung .....	107
Abbildung 4.21 Lokalisation des mitochondrialen cGi500-Sensors in Kardiomyozyten .....	109
Abbildung 5.1 Hypothesenmodell zum Einfluss des mitoBKs auf protektive Signalwege bei <i>in vitro</i> Hypoxie-Reoxygenierung .....	126
Abbildung 7.1 Reinheit isolierter Mitochondrien .....	131
Abbildung 7.2 Weitere Western-Blot-Analysen zur cGKI-Lokalisation in Mitochondrien .....	132
Abbildung 7.3 Einfluss einer Kardiomyozyten-spezifischen BK-Deletion auf die Respiration von CMM .....	134
Abbildung 7.4 Einfluss einer BK-Kanal-Öffnung mit 3 $\mu$ M NS11021 auf die Respiration von CMM .....	134
Abbildung 7.5 Einfluss einer BK-Kanal Öffnung mit 300 nM NS11021 auf die Respiration von CMM aus CMBK-Tieren .....	135
Abbildung 7.6 Einfluss einer BK-Kanal-Öffnung mit 150 nM NS11021 auf die Respiration von CMM aus BK-WT und BK-KO .....	136
Abbildung 7.7 Mitochondriale Respiration nach Hypoxie-Reoxygenierung .....	137
Abbildung 7.8 Zellzahl und Überleben kultivierter Kardiomyozyten .....	138
Abbildung 7.9 Repräsentative Bilder der adenoviralen Transduktion isolierter adulter Kardiomyozyten .....	140

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1 Pipettierschemata zur DNA-Amplifikation und PCR Programm .....	54
Tabelle 3.2 Pipettierschema zur PCR mit dem High Pure PCR Preparation Kit .....	59
Tabelle 7.1 Basale Herzgewichte der CMBK-CTR und CMBK-KO .....	131
Tabelle 7.2 Proteinlevel von Komplex I, COX IV und Cytochrom C .....	133
Tabelle 7.3 Werte der respiratorischen VM-Messungen.....	133
Tabelle 7.4 Werte der respiratorischen CMM-Messungen .....	133
Tabelle 7.5 Werte der respiratorischen CMM-Messungen $\pm$ NS11021 .....	136
Tabelle 7.6 LDH-Aktivitäten bei einer Stimulation mit 8-Br-cGMP.....	138
Tabelle 7.7 LDH-Aktivitäten bei einer Stimulation mit Cinaciguat .....	138
Tabelle 7.8 LDH-Aktivitäten bei einer Stimulation mit NS11021.....	139
Tabelle 7.9 Phosphorylierungsstatus wichtiger Kinasen des RISK-Signalweges .....	139

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
8-Br-cGMP	8-Bromo-zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
ADP	Adenosine-5'-diphosphate
Akt	Proteinkinase B
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ANT	Adeninnukleosid Translokase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bak	Protein der Bcl-2-Familie; <i>Bcl-2 antagonist/killer</i>
Bax	Protein der Bcl-2-Familie; <i>Bcl-2 associated protein X</i>
BAY58-2667	Cinaciguat (sGC-Aktivator)
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BK-Kanal	spannungs- und Ca <sup>2+</sup> -abhängiger Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit
bp	Basenpaare
bzw.	Beziehungsweise
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Calciumion
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cGKI	cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I
cGKII	cGMP-abhängige Proteinkinase Typ II
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
CM	Kardiomyozyt
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
CMBK-CTR	Kardiomyozyten-spezifisches BK-Kanal Kontrolltier
CMBK-KO	Kardiomyozyten-spezifisches BK-Kanal Knockouttier
CMM	Mitochondrien aus Kardiomyozyten
CNP	C-Typ natriuretisches Peptid
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CTR	Kontrolle
d.h.	das heißt
dH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ΔΨ	Membranpotential
e <sup>-</sup>	Elektronen
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK1/2	<i>p42/p44 extracellular signal regulated kinases</i>
ETC	Elektronentransportkette; Atmungskette
etc.	et cetera
F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> -ATPase	Komplex V der Atmungskette
FADH <sub>2</sub>	Flavinadenin-dinukleotid (reduzierte Form)
g	mittlere Erdbeschleunigung

Abkürzung	Erläuterung
GC	Guanylatzyklase
GDP	Guanosindiphosphat
GMP	Guanosin-5'-monophosphat
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GSK-3 $\beta$	Glykogensynthase-Kinase-3 $\beta$
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
H	Hypoxie
h	Stunde
HG	Herzgewicht
HR	Hypoxie-Reoxygenierung
IFM	interfibrilliäre Mitochondrien
IM	Intermembranraum
IMM	innere Mitochondrienmembran
iPost	ischämische Postkonditionierung
iPrä	ischämische Präkonditionierung
K <sup>+</sup>	Kaliumion
K <sub>ATP</sub> -Kanal	ATP-abhängiger Kaliumkanal
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
KO	Knockout
K <sub>v</sub> -Kanal	spannungsabhängiger Kaliumkanal
L	Liter
mA	Milliampere
mg	Milligramm
Mg <sup>2+</sup>	Magnesiumion
MI	Myokardinfarkt
min	Minute
mitoBK	mitochondrialer BK-Kanal
mitoK <sub>ATP</sub>	mitochondrialer ATP-abhängiger Kaliumkanal
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> (Multiplizität der Infektion)
mPTP	mitochondriale Permeabilitäts-Transitions Pore
n	Anzahl
N	Normoxie
Na <sup>+</sup>	Natriumion
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NCX	Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> -Austauscher
NHE	Natrium/Protonen-Austauscher; Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Austauscher
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NR	Normoxie-Reoxygenierung
NS11021	BK-Kanalöffner
NS1619	BK-Kanalöffner

Abkürzung	Erläuterung
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OMM	äußere Mitochondrienmembran
OXPHOS	oxidative Phosphorylierung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
pGC	partikuläre/membranständige Guanylatzyklase
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
Reperfusion	Wiederdurchblutung des ischämischen Areals
R <sub>H</sub>	post-hypoxische Reoxygenierung
RISK	<i>reperfusion injury salvage kinase</i>
R <sub>N</sub>	post-normoxische Reoxygenierung
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
sec	Sekunde
SEM	Standardfehler
SERCA	sarkoplasmatische und endoplasmatische Calcium-ATPase
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
SSM	subsarkolemmale Mitochondrien
TCA	Tricarbonsäurezyklus
Tg	Transgen
TIM	Translokase der inneren Mitochondrienmembran
TL	Tibiallänge
TOM	Translokase der äußeren Mitochondrienmembran
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
VM	Mitochondrien aus Ventrikel
vs.	versus
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
β <sub>1</sub> -AR	β <sub>1</sub> -Adrenozeptor

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Myokardinfarkt

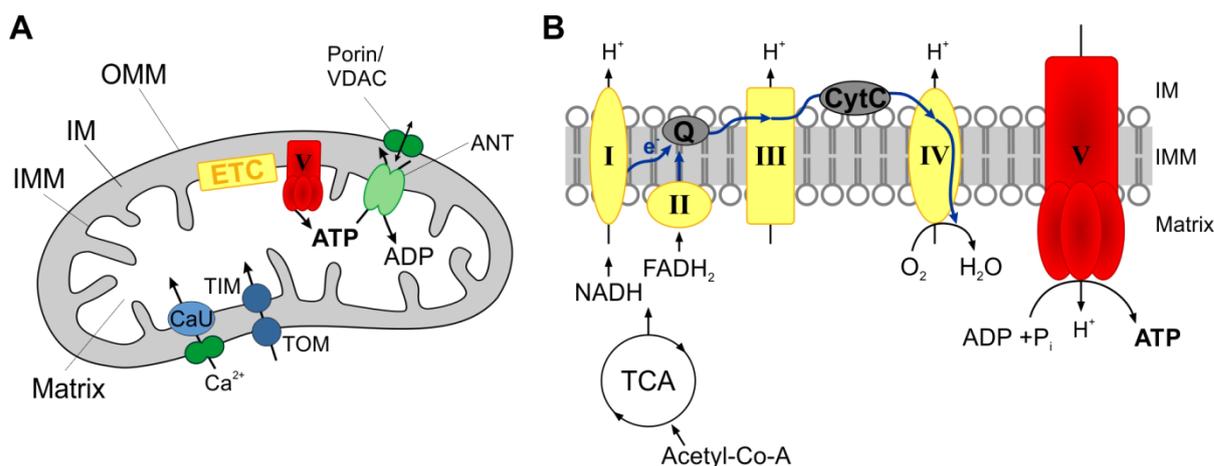
Der Myokardinfarkt (MI) ist neben weiteren Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems wie Herzinsuffizienz, Hypertonie oder Angina Pectoris, in den Industrieländern eine der häufigsten Todesursachen<sup>1</sup>. Jährlich erleiden in Deutschland etwa 300.000 Menschen einen Myokardinfarkt<sup>2,3</sup> – fast jeder zweite Betroffene verstirbt, bevor er das Krankenhaus erreicht. Ein akuter MI wird durch einen plötzlichen vollständigen Verschluss einer arteriosklerotischen Koronararterie verursacht. Dadurch wird ein Teil des Herzens nicht mehr mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt, und aus der länger anhaltenden Minderdurchblutung der Gefäße (Ischämie) resultiert letztendlich eine irreversible Schädigung des Myokards. Die Gefahr eines plötzlichen Herztodes ist bei einem akuten MI vor allem durch Herzrhythmusstörungen wie Arrhythmien besonders hoch. Die Einteilung des MI erfolgt auf Grund von Veränderungen im Elektrokardiogramm (EKG), und man kann zwischen einem alle Wandschichten (transmural) betreffenden Infarkt, bei dem es zur vollständigen Okklusion einer großen Koronararterie kommt, mit ST-Streckenhebung (STEMI) und einem nicht-transmuralem Infarkt, bei dem nur eine partielle Okklusion der Arterie vorliegt, ohne ST-Streckenhebung (NSTEMI) unterscheiden. Durch eine möglichst schnelle und vollständige Wiedereröffnung der Gefäße (Reperfusion) kann die Infarktausbreitung beendet werden. Die Reperfusion stellt letztendlich die Durchblutung des ischämischen Areals sowie die Wiederversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen sicher, wodurch das Herzgewebe vor dem Absterben geschützt wird. Interessanterweise geht die Reperfusion mit einem enormen Anstieg an Zelltod einher<sup>4</sup>. Dieses Phänomen wird als Reperfusionsschaden bezeichnet<sup>5</sup>. Die Begrenzung der Infarktgröße und des Reperfusionsschadens sollte für eine optimale Myokardinfarkttherapie möglichst gering gehalten werden. Daher besteht das primäre Behandlungsziel in der schnellstmöglichen Wiederherstellung des Blutflusses durch Öffnen des zuvor verschlossenen Gefäßes. Nach den aktuellen Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie ist die Therapie der ersten Wahl die primäre perkutane Koronarintervention (PCI), wenn die Zeit vom Auftreten der ersten Symptome bis zur Reperfusionstherapie nicht länger als 90 Minuten ist<sup>6,7</sup>. Bei der PCI wird das verschlossene Gefäß mit einem Ballonkatheter geöffnet und ein Stent (Gefäßstütze) implantiert. Als Alternative wird eine intravenöse Lysetherapie mit Fibrinolytika wie Alteplase und Tenecteplase durchgeführt, wobei der Thrombus (Blutgerinnsel), der das Gefäß verstopft, aufgelöst werden soll. Im weiteren Verlauf wird die Therapie an die individuell durchgeführte Akuttherapie sowie an die Herzfunktion und an Begleiterkrankungen des Patienten angepasst. Dabei müssen die Patienten nach einem MI lebenslang Thrombozytenaggregationshemmer wie Acetylsalicylsäure einnehmen oder alternativ bei einer Unverträglichkeit Prasugrel oder Ticagrelor. Zusätzlich werden Betablocker sowie ACE-Hemmer oder AT<sub>1</sub>-Antagonisten verordnet, vor allem dann, wenn sich nach dem MI eine Herzinsuffizienz entwickelt oder eine messbare linksventrikuläre systolische Dysfunktion vorliegt. Diese Medikamente senken das Sterblichkeitsrisiko von Infarktpatienten erheblich. Eventuell werden auch Statine, zur Senkung des Cholesterinspiegels, verordnet. Zudem sollten nach einem Herzinfarkt ein gesunder Lebensstil angestrebt werden und die Risikofaktoren, zu denen Rauchen, erhöhte Blutlipidwerte (v.a. LDL-Cholesterol), Bluthochdruck, Übergewicht, Stress, Bewegungsmangel und Diabetes Mellitus zählen, minimiert werden.

## 1.2 Kardialer Energiemetabolismus und physiologische Funktionen der Mitochondrien

Um die zelluläre Homöostase im Herzen aufrecht zu erhalten, ist die Energiegewinnung (ATP-Produktion) von wichtiger Bedeutung. Dabei sind kardiale Mitochondrien, deren Hauptaufgabe in der Produktion von Adenosintriphosphat (ATP) durch oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) besteht, unerlässlich. Die Bedeutung der Mitochondrien im Herz wird auch dadurch veranschaulicht, dass sie bis zu 40% des Volumens einer Kardiomyozyte einnehmen können<sup>8</sup>. Kardiomyozyten weisen somit eine erheblich höhere Mitochondriendichte als andere Zellen auf. Das Herz verbraucht im Vergleich zu anderen Organen damit nicht nur die meiste Energie, sondern auch den meisten Sauerstoff. Im arbeitenden Herz wird diese Energie hauptsächlich für die Kontraktion der Myofibrillen und den daran beteiligten Prozessen genutzt<sup>9</sup>. Neben der OXPHOS erfüllen die Mitochondrien weitere wichtige Aufgaben bei der Fettsäureoxidation; sie spielen eine Rolle in der Glucose-Homöostase und sie sind wichtige Komponenten apoptotischer und nekrotischer Signalwege<sup>10</sup>. Außerdem nehmen Mitochondrien Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) auf, wodurch sie an der Modulation von Calciumströmen in die Zelle beteiligt sind<sup>10</sup>. Die Calciumaufnahme wird durch ein elektrochemisches Potential angetrieben, das aus einer Kombination des mitochondrialen inneren Membranpotentials und einer niedrigen Konzentration von  $\text{Ca}^{2+}$  in der Mitochondrienmatrix erzeugt wird<sup>11,12</sup>. Mitochondrien enthalten ihre eigene mitochondriale DNA (mtDNA) und bestehen aus einer äußeren Membran (OMM), die das Organell von außen abschirmt und eine Permeabilitätsbarriere für cytosolische Moleküle darstellt, sowie einer inneren Membran (IMM), die die mitochondriale Matrix umschließt und in der die Proteinkomplexe der Elektronentransportkette (Atmungskette; ETC) lokalisiert sind. Die IMM besitzt zudem viele Einstülpungen, die sogenannten Cristae, wodurch ihre Oberfläche erheblich vergrößert wird. Zwischen den beiden Membranen befindet sich der Intermembranraum (IM), der kleinere Moleküle und Proteine wie beispielsweise Ionen oder Cytochrom C enthält. Als Transmembranproteine sind Ionenkanäle sowohl in der OMM als auch in der IMM der Mitochondrien lokalisiert. Über das in der OMM sitzende Porin VDAC (*Voltage-Dependent Anion Channel*) können kleinere Moleküle in den IM gelangen. So z.B. auch  $\text{Ca}^{2+}$ , welches anschließend über den Calcium-Uniporter (CaU) in die Matrix transportiert wird<sup>11,12</sup>. Darüber hinaus wurden verschiedene Kalium-Kanäle (z.B.  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanal,  $\text{K}_{\text{v}1.3}$ -Kanal, BK-Kanal; siehe auch Abschnitt 1.7.2) sowie Calciumkanäle und Chloridkanäle in der IMM gefunden<sup>13</sup>. Zellkern kodierte Proteine gelangen über die Translokase der mitochondrialen Innenmembran (TIM) und die Translokase der mitochondrialen Außenmembran (TOM) in die Matrix<sup>14</sup>.

Abbildung 1.1 veranschaulicht den Aufbau der Mitochondrien und gibt einen Überblick der OXPHOS. Die zur ATP-Produktion benötigte Energie wird primär (ca. 80 %) durch die Metabolisierung und  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren<sup>15,16</sup> und zu einem geringeren Teil durch Glykolyse von Glucose<sup>17</sup> gewonnen. Das durch  $\beta$ -Oxidation und Glykolyse entstandene Acetyl-Co-A wird über den Tricarbonsäurezyklus (TCA) metabolisiert, welcher die wichtigen Reduktionsäquivalente NADH (Nicotinamidadenin-dinukleotid) und  $\text{FADH}_2$  (Flavinadenin-dinukleotid) liefert. Die ETC besteht aus vier Multienzym-Komplexen und den zwei mobilen Elektronencarriern Coenzym Q, das in der IMM lokalisiert ist und Cytochrom C, das im IM lokalisiert ist. Durch Elektronentransport, katalysiert durch NADH und  $\text{FADH}_2$ , zwischen den Komplexen I und IV der ETC werden Protonen ( $\text{H}^+$ ) über die IMM in den IM

transloziert (Abbildung 1.1B). Dabei erfolgt im letzten Schritt, mit Hilfe des Komplex IV (Cytochrom-C-Oxidase), der Übertrag der Elektronen auf molekularen Sauerstoff ( $O_2$ ) und dessen Reduktion zu Wasser ( $H_2O$ ). Durch den Elektronenfluss wird, über die Komplexe I, III und IV, ein elektrochemischer Protonengradient ( $\Delta\Psi$ ) aufgebaut, wodurch im Anschluss durch Komplex V ( $F_0F_1$ -ATPase/ATP-Synthase) ATP aus Adenosindiphosphat (ADP) und organischem Phosphat ( $P_i$ ) generiert wird. Über den Antiporter-Mechanismus Adeninukleotid-Translokase (ANT) gelangt ATP im Austausch gegen ADP in den IM und anschließend über Porin (VDAC) in das Cytosol der Kardiomyozyte.



### Abbildung 1.1 Schematischer Aufbau der Mitochondrien und oxidative Phosphorylierung

(A) Die innere Mitochondrienmembran (IMM) enthält die wichtigen Protein-Komplexe der Elektronentransportkette (ETC) zur ATP-Produktion durch oxidative Phosphorylierung (OXPHOS). ATP gelangt im Austausch gegen ADP in den Intermembranraum (IM) und durch Porin/VDAC in das Cytosol. Der Calcium-Uniporter (CaU) in der IMM ist der wichtigste Kanal der Calciumhomöostase von Mitochondrien. (B) Katalysiert durch NADH und  $FADH_2$  die aus dem Tricarbonsäurezyklus (TCA) stammen, werden Elektronen ( $e^-$ ) zur Generierung eines Protonengradienten über Komplex I bis Komplex IV transportiert. Im Anschluss wird ATP aus ADP und organischem Phosphat ( $P_i$ ) durch Komplex V (ATP-Synthase) generiert. ATP: Adenosintriphosphat; ADP: Adenosindiphosphat; OMM: äußere Mitochondrienmembran; ANT: Adeninukleotid-Translokase; VDAC: *Voltage-Dependent Anion Channel*; TIM: Translokase der inneren Mitochondrienmembran; TOM: Translokase der äußeren Mitochondrienmembran; Q: Coenzym Q; CytC: Cytochrom C; I, II, III, IV: Komplexe der Elektronentransportkette;  $H^+$ : Protonen. Weitere Details im Text.

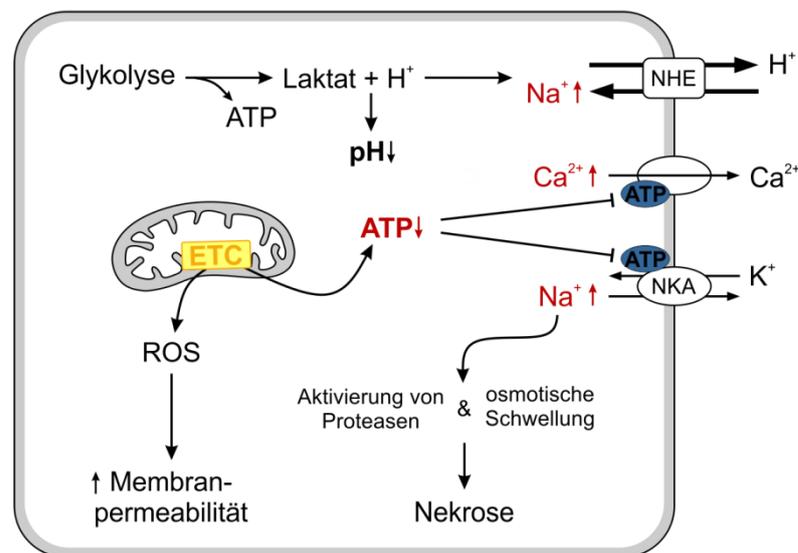
## 1.3 Hypoxie-Reoxygenierung

### 1.3.1 Metabolische Vorgänge während Hypoxie und Reoxygenierung

Infolge der verminderten Zufuhr von Sauerstoff zum arbeitenden Myokard, während der Hypoxie, kommt es zu gravierenden metabolischen Veränderungen. Diese metabolischen Vorgänge sind in Abbildung 1.2 schematisch dargestellt. Durch den Sauerstoff- und Nährstoffmangel wird die Energiegewinnung über die OXPHOS verringert, und es wird vermehrt Energie durch anaerobe Glykolyse gewonnen, die jedoch deutlich weniger ATP liefert. Durch Umstellung der Energiegewinnung kommt es zur Akkumulation der ansonsten harmlosen Nebenprodukte wie Laktat und Protonen ( $H^+$ ), was zum Sinken des intrazellulären pH-Wertes führt. Um den erniedrigten intrazellulären pH-Wert auszugleichen, wird der Natrium ( $Na^+$ )/ $H^+$ -Austauscher (NHE) aktiviert, was jedoch wiederum zu einem Anstieg der intrazellulären  $Na^+$ -Konzentration führt<sup>18,19</sup>. Außerdem trägt der fallende ATP-Spiegel durch Hemmung ATP-abhängiger Ionenkanäle, wie der  $Na^+$ /Kalium ( $K^+$ )-ATPase (NKA) oder der  $Ca^{2+}$ -ATPase zum Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ - und vor allem  $Na^+$ -Konzentration in der Zelle bei<sup>20</sup>. Zudem wird in den Mitochondrien eine eingeschränkte Aktivität von Komplex I berichtet und eine Inaktivierung des ANT durch Akkumulation von Langketten-Acetyl-Co-A in der IMM, was den ATP/ADP-Austausch verhindert<sup>21</sup>. Folglich fehlt ADP in der Matrix und der ATP-Level sinkt rapide. Zusätzlich kommt es durch die ATP-Verarmung der Zelle zu einer Hemmung der  $Ca^{2+}$ -Aufnahme ins sarkoplasmatische Retikulum (SR) über die endoplasmatische/sarkoplasmatische  $Ca^{2+}$ -ATPase (SERCA)<sup>22</sup>. Dies trägt zusätzlich zur Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration bei. Auch in den Mitochondrien ist während der Hypoxie ein Anstieg des Calciums in der Matrix zu beobachten<sup>23,24</sup>. Die  $Ca^{2+}$ -Aufnahme in die Mitochondrien erfolgt primär über den CaU, der die Energie des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi$ ) nutzt. Ausgeschleust wird das mitochondriale  $Ca^{2+}$  unter physiologischen Bedingungen über den mitochondrialen  $Na^+$ / $Ca^{2+}$ -Austauscher d.h. im Austausch gegen  $Na^+$ . Interessanterweise wurde beobachtet, dass der Anstieg der mitochondrialen  $Ca^{2+}$ -Ionen während der Ischämie durch Clonazepam (ein Inhibitor des mitochondrialen NCX) gehemmt wird<sup>23</sup>. Dies deutet auf eine Rolle des mitochondrialen NCX hin, der im umgekehrten Modus arbeitet und so letztlich zu einem Anstieg der  $Ca^{2+}$ -Konzentration in der mitochondrialen Matrix beiträgt. Viele Studien haben gezeigt, dass ein Anstieg sowohl der cytosolischen als auch der mitochondrialen  $Ca^{2+}$ -Konzentration einer myokardialen Schädigung vorausging und dass Medikamente oder pharmakologische Ansätze, die den Anstieg der cytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration verringern, den Zelltod verzögern oder sogar signifikant reduzieren<sup>25,26</sup>. Die  $Ca^{2+}$ -Konzentration spielt somit eine wichtige Rolle bei der irreversiblen Schädigung des Myokards bei Hypoxie-Reoxygenierung.

Der Großteil des durch Glykolyse erzeugten ATPs wird durch den umgekehrten Modus der mitochondrialen ATP-Synthase verbraucht, die die Energie zur Aufrechterhaltung des Membranpotentials verwendet<sup>27,28</sup>. Bei langanhaltender Hypoxie kommt es durch die ATP-Verarmung der Zelle zur Verlangsamung bzw. zum kompletten Erliegen wichtiger metabolischer Prozesse, einschließlich der ETC. Dies hat zur Folge, dass die ATP-Produktion gestoppt, der Protonenfluss unterbrochen und der Elektronentransport verhindert wird. Die Akkumulation der Elektronen ( $e^-$ ) an den Komplexen der Atmungskette führt zur Übertragung auf Sauerstoff und zur Entstehung toxisch

reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)<sup>29</sup> (siehe auch Abschnitt 1.3.2), was wiederum zu Schädigungen v.a. der Komplexe I und III der Atmungskette führt<sup>30</sup>, sowie zu erhöhter Membranpermeabilität. Der erhöhte Ionengehalt der Kardiomyozyten führt schließlich zur osmotischen Schwellung, der Zerstörung des Sarkolemm und schließlich zu Nekrose der Zelle<sup>31</sup>.

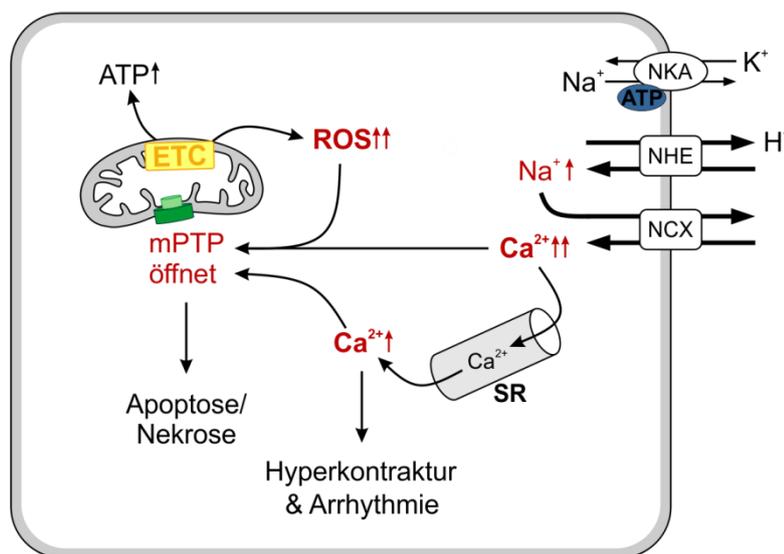


**Abbildung 1.2 Zelluläre Mechanismen während Hypoxie**

Bei Hypoxie wird durch Sauerstoffmangel vermehrt ATP durch anaerobe Glykolyse gewonnen. Dies führt zur Akkumulation von Laktat und Protonen ( $H^+$ ) was zum sinken des pH-Wertes und zu einer erhöhten intrazellulären  $Na^+$ -Konzentration führt. Durch ATP-Verarmung werden vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet. Zusätzlich werden ATP-abhängige Ionenkanäle gehemmt, was zum Anstieg der intrazellulären  $Na^+$ - und  $Ca^{2+}$ -Konzentration beiträgt und die daraus resultierende osmotische Schwellung führt zusammen mit der Aktivierung proteolytischer Proteasen zur irreversiblen Zerstörung von Zellstrukturen und zu Nekrose. ATP: Adenosintriphosphat; NHE:  $Na^+/H^+$ -Austauscher; NKA:  $Na^+/K^+$ -ATPase. Schema Modifiziert nach *Sanada, Komuro et al. 2011*<sup>32</sup>. Weitere Details im Text.

Obwohl eine anhaltende Hypoxie des Myokards sowohl eine schädliche Wirkung auf wichtige metabolische Prozesse der Zelle als auch auf die mitochondriale Funktion hat und zum Zelltod führen kann, kommt es paradoxerweise durch die Wiederversorgung der Gefäße mit Sauerstoff (Reoxygenierung bzw. Reperfusion) zu einem noch erheblicheren Schaden (Reperfusionsschaden). Bei der Reoxygenierung, dargestellt in Abbildung 1.3, wird der Blutfluss durch Öffnen der okkludierten Gefäße wieder hergestellt. Dies führt zu einer sofortigen Erhöhung der Sauerstoffversorgung, einer raschen Wiederversorgung mit Nährstoffen wie Glucose oder freien Fettsäuren, die für die Erzeugung von ATP essentiell sind und zu einer schnellen Normalisierung des extrazellulären pH-Wertes. Tatsächlich sind all diese Faktoren entscheidend für die Verhinderung eines weiteren hypoxischen bzw. ischämischen Zelluntergangs und zur Wiederherstellung der zellulären Homöostase; sie können aber auch gleichzeitig einen Reperfusionsschaden verursachen. Die schnelle Normalisierung des extrazellulären pH-Wertes bei der Reoxygenierung führt zu einem extremen  $H^+$ -Gradienten über die Kardiomyozytenmembran. Da der extrazelluläre pH-Wert schnell wieder normalisiert wurde, der intrazelluläre pH-Wert jedoch zu Beginn der Reoxygenierung noch sehr niedrig ist, führt dies zur Aktivierung des NHE<sup>33</sup>. Der NHE tauscht unter diesen Bedingungen intrazelluläres  $H^+$  gegen extrazelluläres  $Na^+$  aus um den entstandenen  $H^+$ -Gradienten abzubauen. Dies

führt jedoch zu einem Anstieg der intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration (siehe auch weiter oben im Abschnitt). Diese hohe, intrazelluläre akkumulierende  $\text{Na}^+$ -Konzentration führt zur Umkehrung („reverse mode“) des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers (NCX), der unter physiologischen Bedingungen  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Zelle schleust<sup>34,35</sup>. Dies wiederum resultiert vor allem zu Beginn der Reoxygenierung in einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung der Zelle und trägt erheblich zum nekrotischen und apoptotischen Zelltod bei<sup>25</sup>. Die erhöhte Konzentration an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sowie die Wiederaufnahme der ATP-Produktion begünstigen die Aufnahme des  $\text{Ca}^{2+}$  in das SR über SERCA. Gleichzeitig kommt es aus dem SR über den Ryanodin-Rezeptor (RyR) zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Abgabe in das Cytosol<sup>34</sup>. Dies kann Arrhythmien, eine Haupttodesursache bei Ischämie-Reperfusion sowie  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen auslösen und zu Hyperkontraktionen des Herzens führen<sup>36</sup>. Auch in den Mitochondrien wird zu Beginn der Reoxygenierung die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Matrix erhöht. Die zur ATP-Gewinnung wieder in Gang gesetzte Atmungskette sowie die Wiederherstellung des Membranpotentials und die erhöhte intrazelluläre cytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führen zu einer erhöhten Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  (über den CaU) ins Mitochondrium<sup>23</sup>. Zusätzlich entstehen zu Beginn der Reoxygenierung durch den Einstrom und das Überangebot von Sauerstoff und die Wiederaufnahme der Atmungskette vermehrt ROS<sup>37</sup>. Zusammen mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung und ATP-Verarmung der Zelle führt dies zur Schädigung wichtiger metabolischer Prozesse. Die erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der mitochondrialen Matrix triggert zusammen mit der erhöhten ROS-Bildung die Öffnung der mPTP, wodurch es letztlich zu Nekrose aber auch Apoptose der Zelle kommt<sup>38</sup>. Die Entstehung und Auswirkungen von ROS sowie die Bildung und Öffnung der mPTP bei Hypoxie und Reoxygenierung werden in den folgenden Abschnitten (1.3.2 und 1.3.3) detailliert beschrieben.

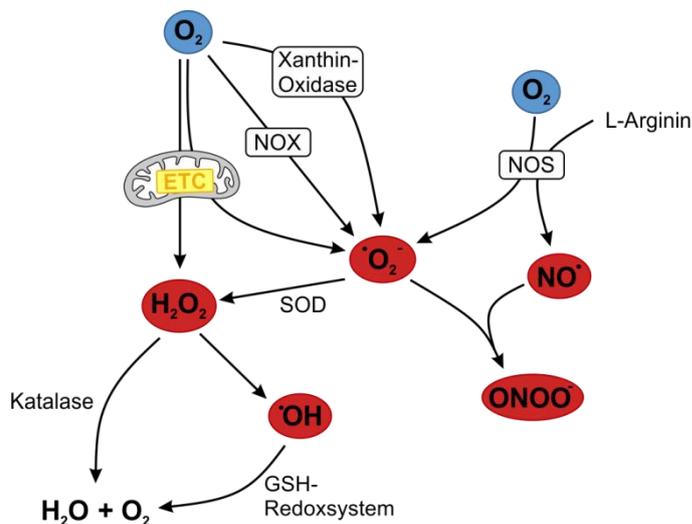


**Abbildung 1.3 Zelluläre Mechanismen zu Beginn der Reoxygenierung**

Bei der Reoxygenierung kommt es durch die schnelle extrazelluläre pH-Wert Neutralisierung zur Aktivierung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers (NHE). Dieser trägt zu einer erhöhten intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration bei, wodurch der Umkehrmodus des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers (NCX) aktiviert wird. Die hierdurch resultierende erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt zu Hyperkontraktur sowie Arrhythmie und triggert zusammen mit der erhöhten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions Pore (mPTP). Dies führt schließlich zu Apoptose und Nekrose der Zelle. ATP: Adenosintriphosphat; NKA:  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase; SR: sarkoplasmatisches Retikulum. Schema Modifiziert nach *Sanada, Komuro et al. 2011*<sup>32</sup>. Weitere Details im Text.

### 1.3.2 Entstehung und Auswirkungen reaktiver Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind eine Gruppe von radikalischen aber auch nicht-radikalischen Sauerstoffverbindungen. Superoxidradikalanionen ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) werden durch die ETC als primäre ROS erzeugt, aber auch Hydroxyl-Radikale ( $\text{OH}^{\cdot}$ ), Hydroxylanionen ( $\text{OH}^-$ ) und Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) zählen zu den ROS. Darüber hinaus werden auch Stickstoffmonoxid-Radikale ( $\text{NO}^{\cdot}$ ) in Anwesenheit von Stickstoffmonoxid (NO) gebildet, die bei Hypoxie mit den Superoxidradikalen ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) zu Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^{\cdot}$ ) reagieren und nitrosativen Stress verursachen. Quellen von ROS sind NADPH-Oxidasen, entkoppelte Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS), Xanthin-Oxidasen und vor allem Mitochondrien<sup>39</sup>. Abbildung 1.4 gibt einen Überblick über die ROS-Bildung und die antioxidativen Schutzmechanismen in Kardiomyozyten.



**Abbildung 1.4 ROS-Bildung in Kardiomyozyten**

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden primär in Mitochondrien durch die Elektronentransportkette (ETC) gebildet. Aber auch NADPH-Oxidasen (NOX), Xanthin-Oxidasen und entkoppelte Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) sind an der Bildung von ROS und reaktiven Stickstoffverbindungen beteiligt.  $\text{O}_2$ : Sauerstoff;  $\text{H}_2\text{O}_2$ : Wasserstoffperoxid;  $\text{O}_2^{\cdot-}$ : Superoxidradikalanion;  $\text{ONOO}^{\cdot}$ : Peroxynitrit;  $\text{NO}$ : Stickstoffmonoxid-Radikal; SOD: Superoxid-Dismutase; GSH: Glutathion;  $\text{H}_2\text{O}$ : Wasser. Abbildung modifiziert nach Yang, Kyle et al. 2015<sup>40</sup>. Weitere Details im Text.

Abhängig von der Konzentration und dem Bildungsort können ROS vorteilhaft oder schädlich für Zellen sein. Sie weisen eine hohe Reaktivität mit Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren auf, wodurch wichtige zelluläre Strukturen geschädigt werden können<sup>41,42</sup>. Die Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, führt zu Schädigungen der Plasmamembran und einer erhöhten Membranpermeabilität<sup>43</sup>. Durch Reaktion mit Nukleinsäuren kann es zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen kommen sowie Mutationen, welche zu Schädigungen der mitochondrialen DNA führen<sup>44</sup>. Dies kann zu fehlerhaften Expressionen der Komplexe der Atmungskette und deren Dysfunktion führen. Die Oxidation von Thiol-Gruppen in Proteinen führt zur Schädigung und zum Verlust der Aktivität wichtiger Enzyme. In ruhenden Zellen werden ROS primär als Nebenprodukte der mitochondrialen Respiration produziert, wenn Elektronen aus der ETC austreten (Elektronenleckage)<sup>45,46</sup>. Vor allem an Komplex I und Komplex III ist die Entstehung von ROS zu beobachten<sup>47,48</sup>.

Da ROS bei einer Überproduktion zu massiven Zellschädigungen führen können, verfügen die Zellen über antioxidative Schutzmechanismen. Als wichtige enzymatische Antioxidantien gelten die Superoxid-Dismutasen (SODs), die Katalase sowie das Glutathion-Redoxsystem<sup>49,50</sup> (siehe Abbildung 1.4). Die mitochondriale manganhaltige SOD (MnSOD) und die cytosolische Kupfer/Zink-Dismutase (Cu/ZnSOD) katalysieren die Disproportionierung von Superoxid-Anionen ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) zu  $\text{H}_2\text{O}_2$ , während

die Katalase  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch Abbau zu  $\text{O}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  inaktiviert. Während der Hypoxie sind die ROS-Level eher niedrig; es wurde jedoch gezeigt, dass während den ersten Minuten der Reoxygenierung die Bildung an ROS enorm zunimmt<sup>51</sup>. Der genaue Mechanismus der ROS-Bildung während der Reoxygenierung ist noch nicht geklärt; eine Dysfunktion der Atmungskette und somit ein ineffizienter oder umgekehrter Transport der Elektronen könnte zu vermehrter ROS-Bildung hauptsächlich in den Mitochondrien führen. Kürzlich wurde gezeigt, dass eine Hemmung des Elektronentransports (insbesondere eine Komplex I-Hemmung) während der Ischämie den Reperfusionsschaden verringert, und es wird vermutet, dass dies mit einer reduzierten ROS-Bildung zusammenhängt<sup>52</sup>. Darüber hinaus haben in jüngster Zeit die Arbeitsgruppen um Tomas Krieg und Michael Murphy Mechanismen, die zu einer massiven ROS-Produktion bei Ischämie-Reperfusion führen entschlüsselt. Sie konnten zeigen, dass es während der Ischämie zu einer selektiven Akkumulation von Succinat durch Umkehrung des von der Succinat-Dehydrogenase (Komplex II) katalysierten Vorgangs kommt<sup>53</sup>. Durch diesen Mechanismus kann der Protonentransport durch Komplex I aufrecht erhalten werden<sup>54</sup>. Zu Beginn der Reperfusion kommt es durch die Oxidation des akkumulierten Succinats und den enormen pH-Wert Unterschied zu einem umgekehrten Elektronentransport an Komplex I, was zur Generierung enormer ROS Mengen führt<sup>55</sup>. Die erhöhte Bildung von ROS zusammen mit der erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration gilt als Haupttrigger der mPTP-Öffnung, was schließlich zum Zelltod führt (siehe auch Abschnitt 1.3.3).

### 1.3.3 Die mitochondriale Permeabilitäts-Transitions Pore

Die mitochondriale Permeabilitäts-Transitions Pore (mPTP) wurde erstmals von *Haworth und Hunter* beschrieben<sup>56</sup>. Sie ist eine unspezifische großlumige Pore, die sich zwischen der inneren und äußeren Membran der Mitochondrien bildet und Moleküle bis zu 1,5 kDa passieren lässt. Durch die Öffnung der mPTP können vor allem Wasser und gelöste Substanzen die Membran passieren, was zu einer massiven Schwellung des Mitochondriums und einem Zusammenbruch der OXPHOS führt. Dies resultiert wiederum in einer ATP-Abnahme und einer Freisetzung proapoptotischer Faktoren. Die Freisetzung dieser proapoptotischen Proteine, wie beispielsweise Cytochrom C, aus dem IM der Mitochondrien in das Cytosol führt zu einem irreversiblen Verlust des Membranpotentials und zu nekrotischem und apoptotischem Zelltod<sup>57-59</sup> (siehe auch Abschnitt 1.4). Die endgültige Struktur der Pore ist nicht geklärt. Der ANT gilt jedoch gesichert als zentraler Bestandteil der Pore, der mit Cyclophilin-D (CyP-D) und dem Porin VDAC interagiert<sup>60,61</sup>. VDAC ist in der OMM lokalisiert, während ANT in der IMM lokalisiert ist und mit CyP-D in der Matrix interagiert (siehe Abbildung 1.5). Durch Bindung von CyP-D an ANT kommt es calciumabhängig zur Konformationsänderung von ANT, wodurch der spezifische Transporter in eine unspezifische Pore umgewandelt wird<sup>60</sup>. CyP-D gilt durch Experimente mit Cyclosporin A (CsA), einem selektiven CyP-D Inhibitor, als gesicherter Interaktionspartner von ANT. Es konnte gezeigt werden, dass CsA in der Matrix der Mitochondrien an CyP-D bindet und das Öffnen der mPTP inhibiert<sup>62</sup>. Nach der primären Porenbildung in der IMM erfordert der Proteinkomplex auch eine Permeabilisierung der OMM. Hierfür ist vermutlich VDAC oder ein anderes Porin verantwortlich, da diese eine Translokation von niedermolekularen gelösten Stoffen über die OMM ermöglichen. Zudem haben Versuche, bei denen VDAC gehemmt wurde gezeigt, dass die Aktivierung der mPTP und der Verlust des Membranpotentials gehemmt wird und

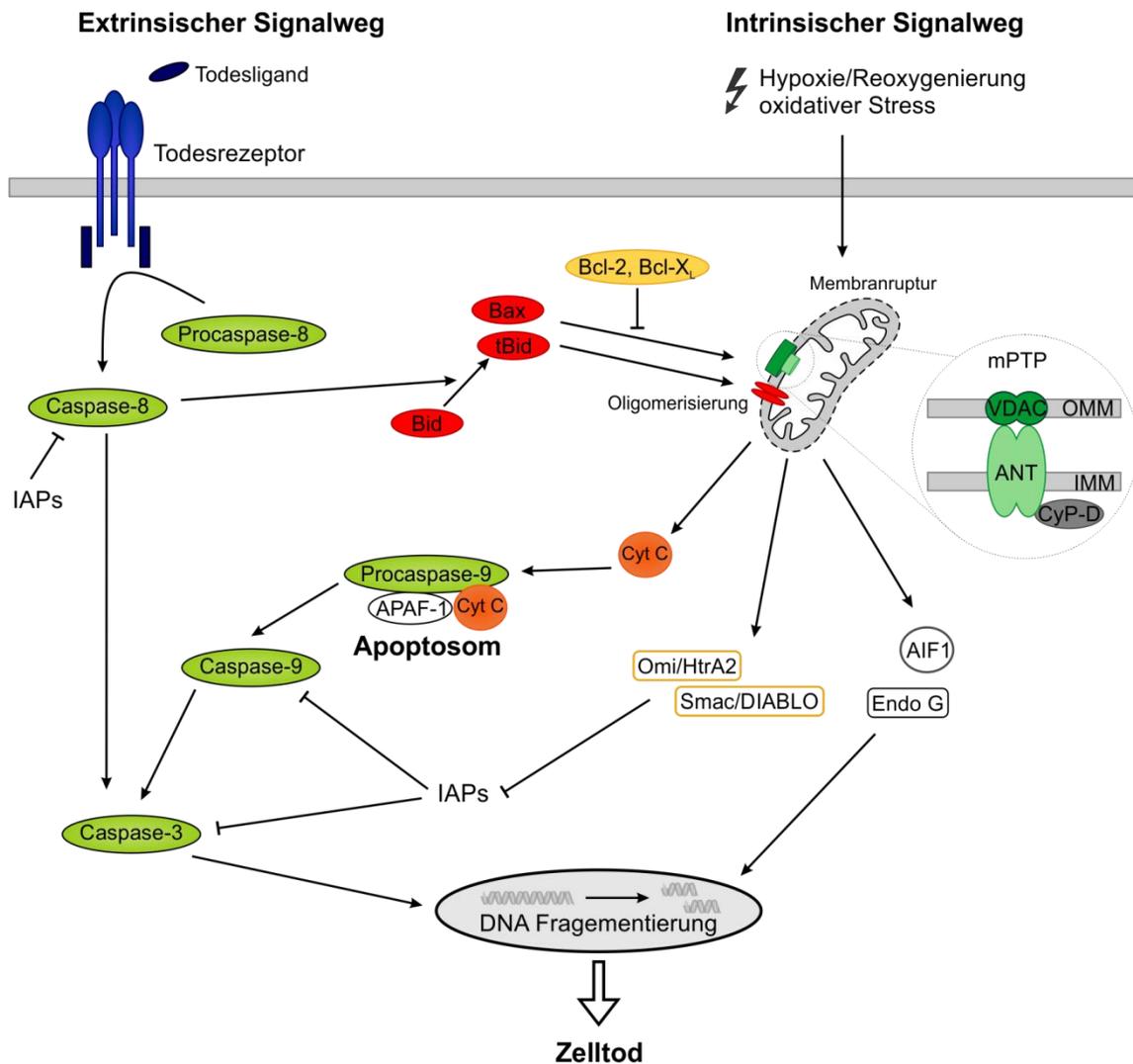
dass der Integritätsverlust der OMM nicht nur durch eine mechanische Belastung, d.h. durch die Schwellung der Mitochondrien, zustande kommt<sup>63</sup>. Daher liegt VDAC als Interaktionspartner von ANT in der OMM nahe. Die Öffnung der Pore wird hauptsächlich getriggert durch eine erhöhte mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, erhöhtem ROS sowie der ATP-Verarmung der Zelle<sup>38</sup>. Hingegen verhindern ein niedriger pH-Wert das Öffnen der Pore<sup>59</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass die mPTP während der Hypoxie geschlossen bleibt und sich erst in der frühen Phase der Reperfusion öffnet<sup>64</sup>. Durch den niedrigen pH-Wert während der Hypoxie bleibt die mPTP, trotz einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung der Zelle, geschlossen. Dies liegt am Protonenwettbewerb für die Bindungsstelle von Calcium am CyP-D-ANT-Komplex, wodurch  $\text{Ca}^{2+}$  bei einem niedrigen pH-Wert nicht zur Aktivierung der Pore beitragen kann. Wenn in den ersten Minuten der Reperfusion der pH-Wert schnell wieder neutralisiert wird, die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration jedoch noch sehr hoch ist, öffnet dies die mPTP.

Proteine der Bcl-2 Familie gelten als Modulatoren der ANT und somit der mPTP-Öffnung<sup>65</sup>. Die proapoptotischen Proteine Bax, Bad und Bid translozieren ins Mitochondrium und induzieren die Öffnung der mPTP während antiapoptotisches Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub> hemmend auf die Öffnung der mPTP wirken<sup>66</sup>. Bcl-2 hemmt VDAC durch dessen Modifikation daran, eine permeable Pore zu bilden und verhindert dadurch die Freisetzung von weiteren proapoptotischen Proteinen<sup>67</sup>. Auch NO gilt als Hemmer der mPTP-Öffnung durch Modifikation von freien Thiol-Gruppen (S-Nitrosylierung)<sup>68</sup>.

## 1.4 Zelltodmechanismen während Hypoxie und Reoxygenierung

Zellschädigungen durch Hypoxie enden zum größten Teil in unspezifischer Nekrose, aber auch die Apoptose ist am Zelltod durch Hypoxie beteiligt und trägt erheblich zum Ischämie-Reperfusionsschaden bei<sup>69,70</sup>. In welchem Ausmaß es zu Nekrose und Apoptose kommt, hängt stark von der Dauer der Hypoxie ab. Die Nekrose ist ein passiver Prozess und durch deutliche morphologische Veränderungen gekennzeichnet, einschließlich Kollaps der zellulären Homöostase, einhergehend mit ATP-Verlust, Integritätsverlust der Plasmamembran, Organellen- und Zellschwellung<sup>71</sup>. Die Zerstörung der Zellintegrität und die Freisetzung von Zellinhalten führen zu einer sekundären Entzündungsreaktion mit potenziellen pathologischen Konsequenzen. Durch Hypoxie und die Umstellung auf anaerobe Glykolyse zur Gewinnung von ATP kommt es, wie in Abschnitt 1.3 bereits beschrieben, durch die Akkumulation von Laktat und Protonen zur Azidose, zu einer erhöhten  $\text{Na}^{+}$ -Konzentration und schließlich zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung der Zelle. Dies führt zur verstärkten Aktivität von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Endonukleasen, der Phospholipase A<sub>2</sub> sowie Phospholipase C, was zu erhöhtem Lipidabbau und DNA-Fragmentierung führt<sup>72,73</sup>. Des Weiteren kommt es durch die erhöhte Produktion von ROS, sowohl bei der Hypoxie als auch in der frühen Phase der Reoxygenierung zur Permeabilisierung der Zellmembran, was zum Anschwellen der Zelle und Freisetzung von Substanzen aus dem Cytosol führt. Auch die Öffnung der mPTP trägt durch die Freisetzung von proapoptotischen Proteinen aus der Matrix und dem IM zu nekrotischem Zelltod bei. Die Öffnung der mPTP führt zum einen zur Entkopplung der Atmungskette und zum anderen zur Entkopplung der ATPase, die unter diesen Bedingungen zum Erhalt des Membranpotentials Protonen aus der Matrix pumpt und ATP hydrolysiert<sup>74-76</sup>. Da die Apoptose ein ATP-abhängiger Prozess ist, führt eine zunehmende Energiedepletion der Zelle vor allem zu nekrotischem Zelltod.

Die Apoptose ist ein hoch regulierter, aktiver, Energie-abhängiger Prozess. Kennzeichen der Apoptose sind Schrumpfen der Zelle sowie Bildung von Apoptosekörpern, Blasenbildung der Zellemembran („*blebbing*“) und der Fragmentierung von Chromatin im Zellkern. Dabei kommt es, im Vergleich zur Nekrose, sehr spät zum Verlust der Membranpermeabilität. Die Apoptose gliedert sich in zwei Signalwege, den extrinsischen (Todesrezeptor Weg) und den intrinsischen Signalweg (mitochondrialer Weg), dargestellt in Abbildung 1.5. Das Ziel beider Signalwege besteht in der Aktivierung von Caspasen, welche die zentralen Komponenten der Apoptose darstellen<sup>77</sup>. Caspasen sind eine Untergruppe von Cystein-Proteasen, die Substrate nach einem Asparginsäure-Rest spalten. Sie liegen im Cytosol als inaktive Vorstufen (Procaspasen) vor und werden in Initiator- (Caspase-2, -8 und -9) und Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7) unterteilt. Initiatorcaspasen werden durch Dimerisierung aktiviert, welche wiederum Effektorcaspasen durch proteolytische Spaltung aktivieren. Es findet somit eine Caspase-Kaskade statt. Durch Aktivierung von Caspasen werden nachfolgende strukturelle Proteine wie Aktin (Teil des Cytoskeletts) und Laminin (in der Zellkernmembran) gespalten, sowie Caspase-aktivierte DNAsen (CADs) aktiviert, was zur DNA-Fragmentierung und zum Zelltod führt<sup>78</sup>. Der intrinsische Signalweg wird durch Apoptosestimuli wie Hypoxie, Reoxygenierung oder oxidativen Stress ausgelöst. Es kommt dadurch zur Ruptur der OMM oder Öffnung der mPTP, was zur Freisetzung von proapoptotischen Faktoren, einschließlich Cytochrom C (CytC), Apoptose-induzierendem Faktor (AIF), Endonuklease G (EndoG), direktes Apoptose-Inhibierendes Protein (IAP), Smac/DIABLO, der Serin-Protease Omi/HtrA2 und Procaspasen (2, 3, 8 und 9) aus dem Intermembranraum führt. CytC bindet an das cytosolische Protein APAF-1 (Apoptose-auslösender Faktor-1) und bildet zusammen mit Procaspase-9 den sogenannten Apoptosom Komplex, welcher die aktive Caspase-9 bildet<sup>79</sup>. Aktive Caspase-9 ihrerseits aktiviert die Caspase-3, -6 und -7<sup>80</sup>. Die Freisetzung von AIF und Endo G aus den Mitochondrien führt zu deren Translokation in den Zellkern und dort zur indirekten oder direkten DNA-Fragmentierung<sup>81,82</sup>. Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 aktivieren indirekt Caspasen durch die Inaktivierung von Caspase hemmenden Proteinen (IAPs)<sup>83</sup>. Der extrinsische Signalweg wird durch Todesliganden, wie z.B. Zytokine, TNF- $\alpha$  oder FAS, welche an spezielle korrespondierende Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche binden, induziert<sup>84,85</sup>. Durch Trimerisierung des Todesrezeptors wird das Signal an intrazelluläre Adapterproteine weitergeleitet, was in der Dimerisierung und Aktivierung von Procaspase-8 zu Caspase-8 resultiert<sup>86</sup>. Dies setzt ebenfalls eine Caspase-Kaskade in Gang, die zur Aktivierung der Effektorcaspase-3 (6 und 7) sowie Bid führt. Bid ist ein proapoptotisches Bcl-2 Protein, welches den extrinsischen und intrinsischen Signalweg verbindet.



**Abbildung 1.5 Extrinsischer und intrinsischer Apoptose-Signalweg**

Beide Signalwege der Apoptose führen zur Aktivierung von Caspasen. Dabei wird der extrinsische Signalweg durch Bindung von Todesliganden an Todesrezeptoren initiiert, während der intrinsische Signalweg bspw. durch Hypoxie, Reoxygenierung und oxidativen Stress ausgelöst wird und primär zur Ruptur der OMM führt. Der Kollaps der mitochondrialen Integrität resultiert in der Freisetzung proapoptotischer Faktoren aus dem IM sowie eine Aktivierung der Caspase-Kaskade und führt schließlich zur DNA-Fragmentierung und zum Zelltod. Reguliert wird die Apoptose hauptsächlich durch Proteine der Bcl-2 Familie. Bax und tBid führen zum einen zur mPTP-Öffnung und können zum anderen durch Oligomerisierung Poren bilden. Dies wird durch die antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub> gehemmt. IAP: Apoptose-Inhibierendes Protein; CytC: Cytochrom C; AIF: Apoptose-induzierender Faktor; EndoG: Endonuklease G; APAF-1: Apoptoseprotease-aktivierender Faktor; tBid: geschnittenes, aktiviertes Bid; ANT: Adeninukleotid-Translokase; VDAC: *Voltage-Dependent Anion Channel*; Cyp-D: Cyclophilin-D; mPTP: mitochondriale Permeabilitäts-Transitions Pore. Abbildung Modifiziert nach *Baines and Molkentin 2005*<sup>87</sup>. Weitere Details im Text.

Reguliert wird die Apoptose hauptsächlich durch Proteine der Bcl-2-Familie, welche in zwei Gruppen unterteilt werden können. Zum einen gibt es antiapoptotische Bcl-Proteine, zu denen Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub> gehören, sowie proapoptotische Bcl-Proteine wie Bid, Bax und Bak<sup>88,89</sup>. Die proapoptotischen Bcl-Proteine liegen als inaktive Stufen im Cytosol vor. Durch Spaltung und Aktivierung von Bid, durch Caspase-3, entsteht aktiviertes Bid („truncated“ Bid/tBid), das nachfolgend in die OMM transloziert und die Translokation von Bax nach dessen Modifikation in die OMM induzieren kann. Durch

Konformationsänderungen der OMM können sie oligomere Strukturen und dadurch Poren formen, was zur Freisetzung proapoptotischer Faktoren, v.a. Cytochrom C, aus dem Intermembranraum in das Cytosol führt<sup>90,91</sup>. Außerdem kann durch Bax und Bid die mPTP (wie bereits in Abschnitt 1.3.3 beschrieben) moduliert und dessen Bildung bzw. Offenwahrscheinlichkeit erhöht werden. Antagonisiert werden die proapoptotischen Proteine durch die antiapoptotischen Bcl-Proteine. Diese Proteine sind in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert und inhibieren die mPTP direkt durch Interaktion mit VDAC oder indirekt durch Verhinderung der Interaktion zwischen Bak bzw. Bax und VDAC oder ANT<sup>92</sup>. Dass die Proteine der Bcl-2 Familie wichtige Regulatoren der Apoptose bei Hypoxie-Reoxygenierung sind ist bekannt. Dabei wirkte eine Überexpression von Bcl-2 kardioprotektiv und schützte das Myokard bei Ischämie-Reperfusion vor Apoptose<sup>93,94</sup>.

## 1.5 Kardioprotektion

### 1.5.1 Aktivierung intrazellulärer Signalwege

Um das Überleben von Kardiomyozyten während Hypoxie und vor allem zu Beginn der Reoxygenierung zu sichern, werden intrazelluläre Signalwege aktiviert. Hierbei spielen die sogenannten pro-*survival*-Kinasen, die Apoptose verhindern und das Zellüberleben fördern, eine große Rolle. Diese kardioprotektiven Wirkungen werden dabei insbesondere über die extrazellulär signalregulierten Kinasen 1 und 2 (ERK1/2)<sup>95,96</sup> und die Proteinkinase B (PKB/Akt)<sup>97,98</sup> vermittelt. Auf Grund der effizienten und hohen Kardioprotektion durch diese Faktoren, die sich vor allem zu Beginn der Reperfusion sowie bei ischämischer oder pharmakologischer Postkonditionierung gezeigt hat, wird der Signalweg auch als RISK (*reperfusion injury salvage kinase*)-Signalweg bezeichnet. Der genaue Mechanismus durch den die Rekrutierung dieser pro-*survival*-Kinasen den zellulären Schutz vermitteln, ist noch nicht ganz geklärt, aber das zelluläre Überleben wird auf die Phosphorylierung und Inaktivierung einer Vielzahl von proapoptotischen Proteinen zurückgeführt, was letztendlich zur Hemmung der mPTP-Öffnung führt (siehe Abbildung 1.6).

Die ERK1/2-Signalkaskade ist ein zentraler Weg zur Übertragung extrazellulärer Signale ins Zellinnere und Regulation von zellulären Prozessen wie Proliferation, Differenzierung und Zelltod. Die Signalisierung über die ERK1/2-Kaskade wird durch sequenzielle Phosphorylierung und Aktivierung von Proteinkinasen, in verschiedenen Ebenen der Kaskade, vermittelt. Die Aktivierung der Kaskade wird durch kleine GTP-bindende Proteine wie beispielsweise Ras oder Adapterproteine initiiert, die das Signal an nachfolgende Proteinkinasen (z.B. Raf) übertragen. Diese Proteinkinasen werden gemeinhin als MAPK-Kinase-Kinasen (MAPKKK) bezeichnet<sup>99</sup>. Ausgelöst wird die Aktivierung der Kinase-Kaskade durch extrazelluläre Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Hypoxie, Reoxygenierung, ROS oder Zytokine, die Rezeptortyrosinkinasen (RTK) oder G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) in der Zellmembran stimulieren. Akt gehört zu den Serin-Threonin-Kinasen, die als kritischer Regulator des Zellüberlebens und der Proliferation fungiert. Drei Isoformen der Akt (Akt1/PKB $\alpha$ , Akt2/PKB $\beta$ , Akt3/PKB $\gamma$ ) wurden im Myokardium identifiziert<sup>100,101</sup>. Aktiviert wird Akt über die PI3K-Signalkaskade als Reaktion auf die Aktivierung eines breiten Spektrums von Rezeptoren, einschließlich derjenigen für Wachstumsfaktoren (EGFR) und GPCR. Durch

extrazelluläre Stimuli kommt es in der Zelle zur Aktivierung der PI3-Kinase, welche die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-diphosphat (PIP<sub>2</sub>) in Phosphatidylinositol-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>) katalysiert. PIP<sub>3</sub> führt schließlich zur Aktivierung der Akt durch die Phosphoinosid-abhängige Kinase-I (PKKI)<sup>102</sup>. Ähnlich wie bei vielen anderen Proteinkinasen enthält Akt eine Amino-terminale Domänenstruktur mit einer spezifischen PH-Domäne, eine zentrale Kinase-Domäne und eine Carboxyl-terminalen regulatorischen Domäne, die die Wechselwirkungen zwischen Signalmolekülen vermittelt. Akt enthält zwei regulatorische Phosphorylierungsstellen: eine in der katalytischen Kinase-Domäne (Thr308) und eine in der C-Terminalen regulatorischen Domäne (Ser473). Die PH-Domäne interagiert mit Membranlipiden wie z.B. PIP<sub>3</sub><sup>103</sup>. Durch Phosphorylierung an Thr308 kann die Kinase teilweise aktiviert werden, während für eine vollständige Aktivität eine Phosphorylierung an beiden zuvor erwähnten Phosphorylierungsstellen notwendig ist.

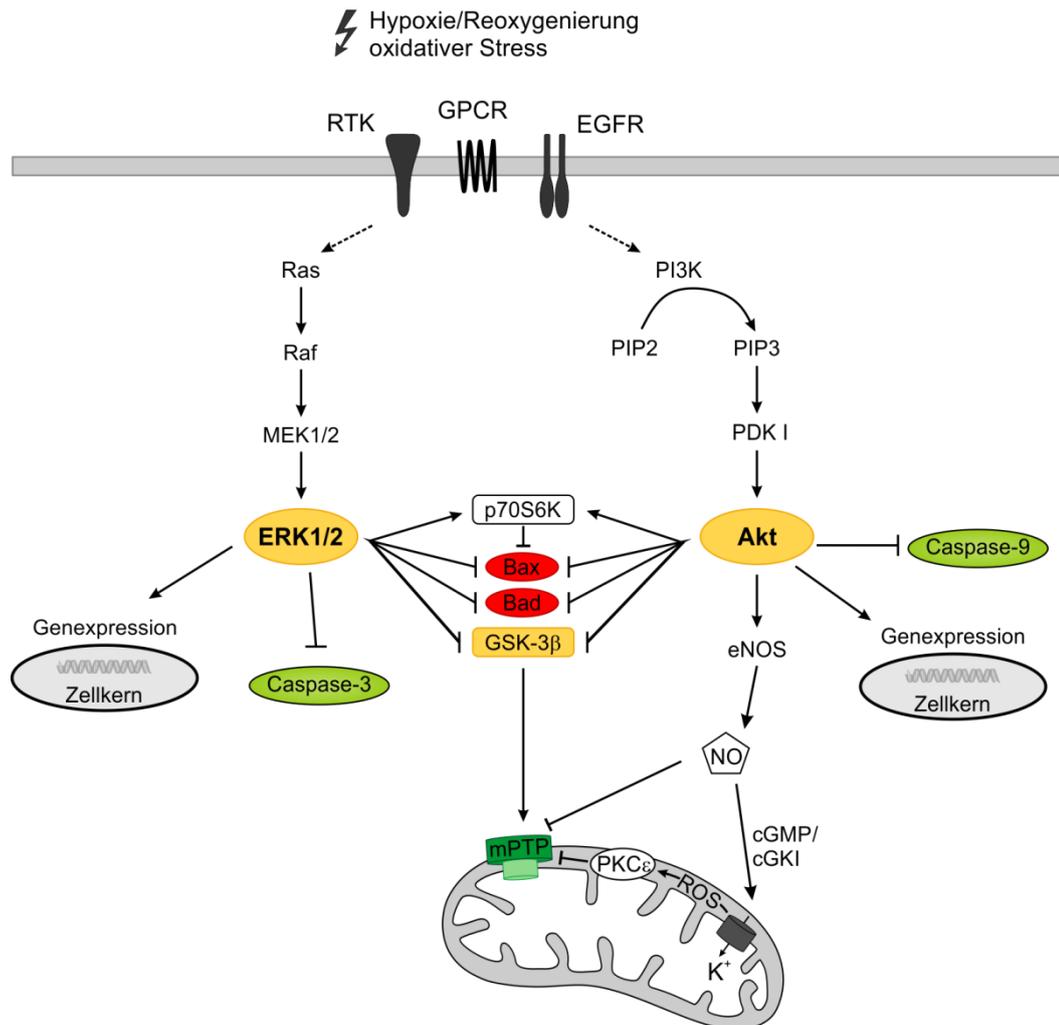
Akt und ERK1/2 haben zum einen direkte aber auch indirekte Effekte auf den Apoptosesignalweg, dargestellt in Abbildung 1.6. Sie phosphorylieren zahlreiche Faktoren, einschließlich proapoptische Proteine (Bad, Bax, BIM, p53 und Caspasen), Transkriptionsfaktoren (z.B. NF- $\kappa$ B), endotheliale NO-Synthase, Proteinkinase C (PKC) und Glykogensynthase-Kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ )<sup>104</sup>.

Bad gilt als direktes Target sowohl der Akt als auch von ERK1/2, das durch Phosphorylierung seine proapoptische Wirkung verliert<sup>105,106</sup>. Die Phosphorylierung von Bad bewirkt eine Dissoziation von Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub> und es wird daraufhin im Cytosol von 14-3-3 Proteinen komplexiert. Dadurch verliert Bad seine proapoptische Funktion. Bax, ein weiteres proapoptisches Protein aus der Bcl-2 Familie, wird ebenfalls von Akt und ERK1/2 gehemmt<sup>107,108</sup>. Eine Konformationsänderung von Bax führt zur Translokation in die OMM. Durch direkte Porenbildung von Bax in der OMM kommt es zur Freisetzung von CytC und mPTP-Öffnung. Durch die Akt- und ERK1/2-abhängige Phosphorylierung wird die Konformationsänderung von Bax gehemmt und somit Bax-induzierte Apoptose signalwege. Akt und ERK1/2 wirken darüber hinaus hemmend auf die Caspase-Kaskade<sup>109,110</sup>. Die Procaspase-9, als Initiator der Apoptose, wird durch Phosphorylierung von Akt an Ser196 inaktiviert. Dies führt zur Hemmung der weiteren Caspase-Kaskade Aktivierung und der Apoptose-Induktion. ERK1/2 steht hingegen im Verdacht die Aktivierung der Caspase-3 zu hemmen. Es wurde gezeigt, dass Akt die endotheliale NO-Synthase (eNOS) phosphoryliert, wodurch vermehrt Stickstoffmonoxid (NO) gebildet wird, das mit für den Zellschutz verantwortlich ist<sup>111,112</sup>. Über NO kommt es zu einer über den sekundären Botenstoff zyklisches Guanosin-3'-5'-monophosphat (cGMP) und Aktivierung der cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I (cGKI) -vermittelten Hemmung der mPTP-Öffnung<sup>113</sup> (siehe auch Abschnitt 1.6.5). NO kann auch cGMP-unabhängig freie Thiol-Gruppen nitrosylieren, was ein Schutzmechanismus vor ROS darstellt, andererseits auch eine Modulation von Ca<sup>2+</sup>- und spannungsabhängigen K<sup>+</sup>-Kanälen bewirkt<sup>68</sup>. Beispielsweise kann NO L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanäle S-nitrosylieren, wodurch deren Aktivität gehemmt wird und weniger Ca<sup>2+</sup> in die Zelle gelangt. Auch Komplex I in den Mitochondrien kann während der Hypoxie/Reoxygenierung spezifisch von NO nitrosyliert werden, was die ROS-Bildung und mPTP-Öffnung verzögert und somit kardioprotektiv wirkt. Neueste Studien zeigen, dass PKC zum Zellschutz beiträgt, der mit dem Phänomen der ischämischen Präkonditionierung (siehe Abschnitt 1.5.2) assoziiert ist<sup>114</sup>. NO führt durch Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (sGC) zur Erhöhung des cGMP-Spiegels. cGMP wiederum aktiviert die cGKI, was bei Ischämie-Reperfusion zur Öffnung mitochondrialer Kaliumkanäle führt (siehe auch Abschnitt 1.6.3). In der Literatur finden sich vor allem Hinweise auf kardioprotektive Eigenschaften

der ATP-abhängigen Kaliumkanäle ( $K_{ATP}$ )<sup>115,116</sup>, aber auch der mitochondriale BK-Kanal rückt in diesem Zusammenhang immer mehr in den Fokus (siehe Abschnitt 1.7.4). Durch  $K^+$ -Einstrom über den mitochondrialen ATP-abhängigen Kaliumkanal ( $mitoK_{ATP}$ ) kommt es zu einer leichten Erhöhung der ROS-Bildung, was zur Aktivierung der PKC $\epsilon$  führt und die mPTP-Öffnung verhindert<sup>117</sup>. Es wurde in der Literatur bereits beschrieben, dass die PKC direkt durch ROS aktiviert werden kann<sup>118</sup>. Der primäre PKC-vermittelte kardioprotektive Mechanismus verläuft jedoch über eine  $K^+$ -Kanal- und ROS-unabhängige Aktivierung der PKC, dessen Signalweg noch nicht vollständig entschlüsselt ist<sup>119,120</sup>. Beispielsweise führt Akt auch direkt zur Aktivierung der PKC<sup>121</sup>. Auf die Rolle des NO/cGMP/cGKI-Signalweges bei Hypoxie-Reoxygenierung wird in Abschnitt 1.6.5 detailliert eingegangen.

Die GSK-3 $\beta$  befindet sich überwiegend im Cytosol, kann aber auch in Mitochondrien und im Zellkern<sup>122</sup> lokalisiert sein. Sie ist eine Serin-Threonin-Kinase und reguliert eine Vielzahl von zellulären Prozessen wie beispielsweise Apoptose, Wachstum und Metabolismus<sup>123</sup>. Außerdem wurde die Aktivität der GSK-3 $\beta$  mit vielen Zellprozessen, einschließlich der Regulierung mehrerer Transkriptionsfaktoren, wie NF- $\kappa$ B, Apoptose und Zellüberleben assoziiert. Die GSK-3 $\beta$ -Aktivität wird durch Phosphorylierung eines N-terminalen Serins (Ser9) signifikant reduziert. Diese inhibitorischen Phosphorylierungen von GSK-3 $\beta$  werden durch mehrere Kinasen vermittelt, darunter Akt sowie ERK1/2 und die p70S6-Kinase<sup>124,125</sup>. Durch Phosphorylierung von GSK-3 $\beta$  werden die Signaltransduktionswege, die normalerweise durch die GSK-3 $\beta$  geblockt sind, aktiviert. Als hauptkardioprotektive Wirkung der GSK-3 $\beta$ -Inaktivierung gilt die Hemmung der mPTP-Öffnung. Dies konnte in Versuchen mit isolierten Kardiomyozyten, welche oxidativem Stress ausgesetzt wurden, gezeigt werden<sup>126</sup>.

Indirekte Effekte von Akt und ERK1/2 werden hauptsächlich durch die Phosphorylierung der p70S6 (70-kDa ribosomale S6)-Kinase vermittelt<sup>106</sup>. Diese führt einerseits indirekt zur Hemmung von Bad und Bax sowie zur Phosphorylierung und Inaktivierung von GSK-3 $\beta$  aber auch zur Proteintranslation, was zum Zellüberleben beiträgt. Aktuelle Studien zeigen, dass Akt und ERK1/2 das Zellüberleben auch über Transkriptionsfaktoren, die sowohl für pro- als auch für antiapoptotische Gene verantwortlich sind, beeinflussen. Viele der bisher identifizierten Substrate, die durch Akt beeinflusst werden, sind in der transkriptionalen Regulation von Zellüberleben beteiligt. Dazu gehört der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (*nuclear factor- $\kappa$ B*), der von wichtiger Bedeutung für die Regulation der Immunantwort, der Zellproliferation und des Zelltodes ist. Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B ist abhängig von der Phosphorylierung des I $\kappa$ B-Kinase (IKK)-Komplexes und der Degradierung des inhibitorischen  $\kappa$ B-Proteins (I $\kappa$ B). Es wurde gezeigt, dass Akt IKK phosphoryliert, was zur Aktivierung und Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern und zur Transkription von NF- $\kappa$ B-abhängigen Genen führt<sup>127</sup>. Hierzu zählen unter anderem Bcl-X<sub>L</sub> und Caspase-Inhibitoren, welche das Zellüberleben fördern<sup>128</sup>.



**Abbildung 1.6 Aktivierung intrazellulärer kardioprotektiver Signalwege**

Durch Hypoxie, Reoxygenierung und oxidativen Stress kommt es Rezeptor-vermittelt zur Phosphorylierung und Aktivierung von ERK1/2 und Akt, die wichtige antiapoptotische Faktoren aktivieren bzw. proapoptotische Faktoren inaktivieren. Dies führt letztendlich zur Hemmung der mPTP-Öffnung sowie Transkription wichtiger pro-*survival*-Kinasen und damit zur Kardioprotektion. RTK: Rezeptortyrosinkinasen; GPCR: G-Protein gekoppelte Rezeptoren; EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor; ERK1/2: extrazellulär signalregulierten Kinasen; Akt: Proteinkinase B; PI3K: PI3-Kinase; PIP3: Phosphatidylinositol-trisphosphat; PIP2: Phosphatidylinositol-diphosphat; PDKI: Phosphoinosid-abhängige Kinase-I; Ras, Raf, MEK1/2: MAP-Kinasen; GSK-3 $\beta$ : Glykogensynthase-Kinase-3 $\beta$ ; p70S6K: 70-kDa ribosomale S6-Kinase; eNOS: endotheliale NO-Synthase; NO: Stickstoffmonoxid; PKC: Proteinkinase C; mPTP: mitochondriale Permeabilitäts-Transitions Pore; Bax, Bcl-2: antiapoptotische Bcl-2 Proteine. Schema Modifiziert nach Hausenloy und Yellon 2004<sup>129</sup>. Weitere Details im Text.

### 1.5.2 Ischämische Prä- und Postkonditionierung

Kardioprotektion kann auch durch Konditionierung erreicht werden. Dabei unterscheidet man die ischämische Präkonditionierung (iPrä) und die ischämische Postkonditionierung (iPost). Murrey und seine Mitarbeiter beschrieben das Prinzip der iPrä an isolierten Hundeherzen zum ersten Mal<sup>130</sup>. Dabei wurden vor der kardialen Ischämie kurze Episoden von Ischämie/Reperfusion wiederholt; d.h. dem vollständigen Koronarverschluss gingen vier kurze Zyklen mit jeweils 5 minütiger Ischämie und 5

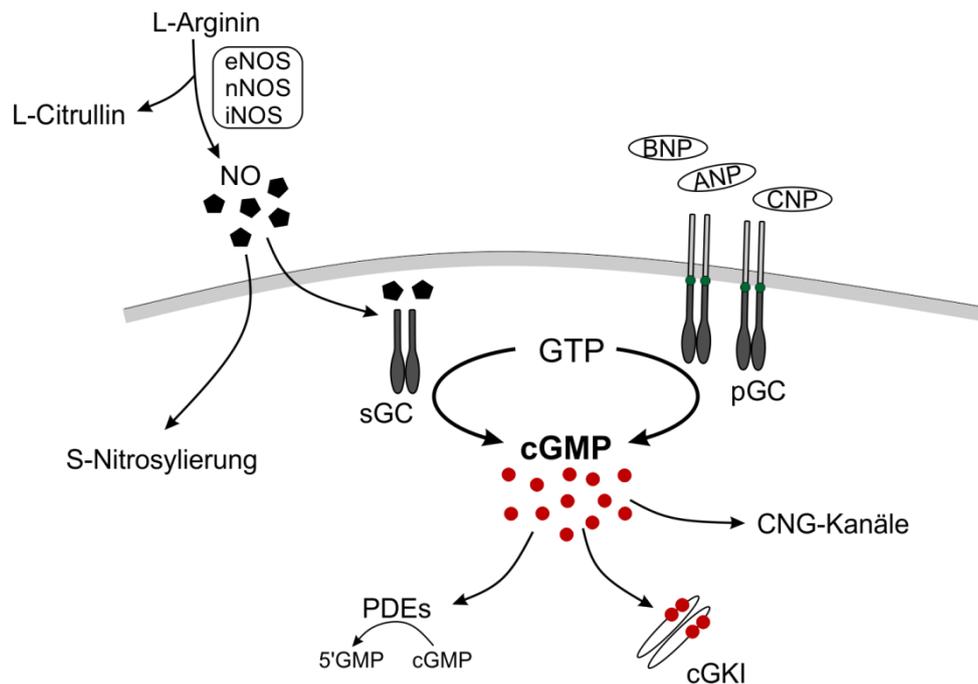
minütiger Reperfusion voraus. Die Infarktgröße reduzierte sich hierbei signifikant. Dieses Konzept der Konditionierung ist jedoch zur Behandlung des akuten MI nicht geeignet. Daher wurde es auf das klinisch relevantere Modell der iPost übertragen. Hierbei werden der Blutfluss und die Wiederversorgung der Zellen mit Sauerstoff nach der Ischämie hinausgezögert. Die kurzen Episoden der Ischämie/Reperfusion werden zum Zeitpunkt des Reperfusionbeginns angewendet. Der Mechanismus der iPrä scheint weitgehend geklärt. Nach aktuellem Stand wird die Signaltransduktion in auslösende Trigger, Mediatoren und End-Effektoren unterteilt. Dabei werden Adenosin<sup>131</sup>, Opioide<sup>132</sup>, Bradykinin<sup>133</sup> und Prostaglandine während der kurzen Ischämie/Reperusionsphasen vermehrt freigesetzt und vermitteln über verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) die iPrä. Aber auch Acetylcholin oder Angiotensin II wurden als Trigger der iPrä identifiziert<sup>119,134,135</sup>. Diese Substanzen aktivieren den RISK-Signalweg (siehe Abschnitt 1.5.1) wodurch die kardioprotektive Wirkung zustande kommt. Die Signaltransduktion der iPost ist im Detail noch unklar, es werden aber Ähnlichkeiten zur Signaltransduktion der iPrä angenommen. Auch hier scheint die Aktivierung des RISK-Signalweges eine bedeutende Rolle zu spielen<sup>136</sup>. Der kritische Faktor, der die Schwelle für die Auslösung des iPost-Schutzes bestimmt, ist die intrazelluläre pH-Wert Normalisierung zu Beginn der Reperfusion zu verzögern<sup>137,138</sup>. Die kardioprotektive Wirkung durch Verlängerung der intrazellulären Azidose während der ersten Minuten der Reperfusion wurde in verschiedenen Modellen gezeigt<sup>139-141</sup>. Die reduzierte Laktatauswaschung durch intermittierende Wiederherstellung des Koronarflusses ist sicherlich eine wichtige Komponente durch den die iPost ihre kardioprotektive Wirkung vermittelt, jedoch gibt es auch gute Hinweise darauf, dass die Aktivierung des cGMP/cGKI-Signalweges für die schützenden Wirkungen der iPost wesentlich ist<sup>142,143</sup>.

## 1.6 Der NO/cGMP/cGKI-Signalweg

Die gefäßerweiternde Wirkung des Stickstoffmonoxids (NO) wurde schon vor vielen Jahren entdeckt. Ende der 1970er Jahre wurde die physiologische Wirkung von NO erstmals durch Ferid Murad bekannt<sup>144</sup>. Bei Untersuchungen mit Nitraten entdeckte er, dass NO freigesetzt wird, was eine Erweiterung der Blutgefäße bewirkte und den sekundären Botenstoff cGMP erhöhte. Zu diesem Zeitpunkt war endogenes NO in biologischen Systemen unbekannt. Für die Entdeckung von NO als Signalmolekül und somit der Hauptkomponenten des NO/cGMP-Signalweges, wurde 1998 an Robert Furchgott, Ferid Murad und Louis J. Ignarro der Nobelpreis für Physiologie und Medizin verliehen. Den Forschern gelang es erstmals, die große Bedeutung von NO für die Blutversorgung von Organen und dessen Rolle als Botenstoff im Organismus nachzuweisen<sup>145-147</sup>.

### 1.6.1 cGMP: Bildung und Effektoren

Die enzymatische Bildung von cGMP erfolgt mit Hilfe von Guanylatzyklasen aus Guanosin-5'-triphosphat (GTP) unter Abspaltung von Pyrophosphat<sup>148</sup>. Dabei stehen zwei Guanylatzyklasen zur Verfügung: die cytosolische lösliche Guanylatzyklase (sGC), sowie die membranständigen partikulären Guanylatzyklasen (pGC). Die Bildung von NO sowie die Bildung und Effektoren von cGMP sind in Abbildung 1.7 schematisch dargestellt.



**Abbildung 1.7 Bildung und Effektoren von cGMP**

cGMP wird durch lösliche (sGC) oder membranständige (pGC) Guanylatzyklasen gebildet. Stickstoffmonoxid (NO), welches durch die Umwandlung von L-Arginin zu L-Citrullin entsteht, aktiviert die sGC, während pGCs durch natriuretische Peptide (ANP, BNP, CNP) aktiviert werden. cGMP aktiviert seine Effektoren; insbesondere die cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I (cGKI), den primären cGMP Rezeptor im kardiovaskulären System. Degradiert wird cGMP durch Phosphodiesterasen (PDEs). eNOS/nNOS/iNOS: endotheliale/neuronale/induzierbare NO-Synthase; GTP: Guanosin-5'-triphosphat; cGMP: zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat; 5'GMP: Guanosin-5'-monophosphat; ANP: Atriales natriuretisches Peptid; BNP: B-Typ/*brain* natriuretisches Peptid; CNP: C-Typ natriuretisches Peptid; CNG-Kanal: durch zyklische Nucleotide gesteuerter Ionenkanal. Das Schema wurde modifiziert nach *Hofmann et al. 2000*<sup>149</sup>. Weitere Details im Text.

Die NO-abhängige cGMP-Generierung wird von der sGC vermittelt. Die Bildung des Radikals NO wird dabei zuerst aus L-Arginin durch NO-Synthasen (NOS) gebildet, von denen drei Isoformen bekannt sind: die konstitutiv exprimierte endotheliale NO-Synthase (eNOS) und neuronale NO-Synthase (nNOS), welche in vielen Geweben exprimiert werden und  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin (CaM)-abhängig aktiviert bzw. kontrolliert werden sowie die induzierbare NO-Synthase (iNOS). Die iNOS wird besonders nach Aktivierung durch Transkriptionsfaktoren verstärkt exprimiert und  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-unabhängig durch Endotoxine und Cytokine aktiviert sowie von Makrophagen und anderen Zelltypen als Reaktion auf (pro)entzündliche Mediatoren exprimiert<sup>150</sup>. Die NO-Synthasen katalysieren in Gegenwart von Sauerstoff und NADH den Abbau von L-Arginin zu L-Citrullin und NO<sup>151</sup>. Das entstandene NO ist sehr kurzlebig und diffundiert daher direkt durch Zellmembranen benachbarter Zellen. Lösliche GCs sind heterodimere Proteine aus einer  $\alpha_1$ - bzw.  $\alpha_2$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit<sup>152</sup>. Außerdem enthalten sie eine Häm-Gruppe mit einem Protoporphyrin IX-Ring, welcher den NO-Häm-Komplex ausbildet und zur Aktivierung der Guanylyl-Cyclase Domäne des Enzyms notwendig ist<sup>153</sup>. Nach Aktivierung durch NO erfolgt die Umsetzung von GTP zu cGMP<sup>154</sup>. Mit NO-GC1 ( $\alpha_1\beta_1$ ) und NO-GC2 ( $\alpha_2\beta_1$ ) lassen sich zwei katalytisch aktive Heterodimere des NO sGC-Rezeptors unterscheiden<sup>155</sup>. Die NO-GC2 wird hauptsächlich im Gehirn und der Lunge exprimiert, während die NO-GC1 in nahezu allen Geweben exprimiert wird<sup>155,156</sup>. Neben den sGCs kann die intrazelluläre

cGMP-Konzentration auch NO-unabhängig erhöht werden. Dies wird über membranständige pGCs vermittelt. Es wurden bisher sieben Isoformen der pGC identifiziert. Alle Isoformen (GC-A bis GC-G) haben eine extrazelluläre Liganden-Bindedomäne, eine kurze transmembrane Region und eine intrazelluläre Domäne, welche die katalytische (GC) Region enthält. Partikuläre GCs fungieren als Rezeptor, jedoch wurde bisher nur für vier der Guanylatzyklasen (GC-A bis GC-D) spezifische Liganden identifiziert, weshalb die Isoformen GC-E bis GC-G als *orphan receptors* bezeichnet werden<sup>157,158</sup>. Bekannte Liganden der pGCs sind die natriuretischen Peptide ANP (atriales natriuretisches Peptid), BNP (B-Typ/*brain* natriuretisches Peptid) und CNP (C-Typ natriuretisches Peptid)<sup>159</sup>. Dabei binden ANP und BNP, welche hauptsächlich im Atrium und Ventrikel exprimiert werden<sup>160</sup> mit hoher Affinität an GC-A, während CNP bevorzugt GC-B aktiviert. Die GC-C wird durch Guanylin und Uroguanylin aktiviert.

Inzwischen ist klar, dass die GCs unterschiedliche cGMP-Pools generieren. Somit ergibt sich ein lokales, unmittelbar an der Plasmamembran verfügbares cGMP, wenn es durch die pGC gebildet worden ist, wohingegen durch sGC gebildetes, global verfügbares cGMP entsteht<sup>161</sup>. Zudem können diese intrazellulären cGMP-Pools durch Phosphodiesterasen (PDEs) gesteuert werden, da sie letztendlich die zellulären und funktionellen Reaktionen im Myokard, durch die Hydrolyse sowohl von cGMP als auch von zyklischem Adenosin-3'-5'-monophosphat (cAMP), beeinflussen<sup>162</sup> (siehe Abschnitt 1.6.2). Dabei sind die Funktionen von cGMP im kardiovaskulären System zahlreich (siehe Abschnitt 1.6.3). Die wichtigsten Effektoren im kardiovaskulären System sind dabei die cGKI sowie cGMP-regulierte Phosphodiesterasen (PDE) (siehe Abschnitt 1.6.4 und 1.6.2). Darüber hinaus werden durch zyklische Nukleotide gesteuerte Ionenkanäle (CNG-Kanäle) von cGMP aktiviert. CNG-Kanäle werden hauptsächlich in der Retina und in olfaktorischen Epithelzellen exprimiert, und sie spielen daher eine wichtige Rolle für die Vermittlung der Signaltransduktion in Photorezeptoren und Riechsinneszellen<sup>163</sup>.

### 1.6.2 Inaktivierung des kardialen cGMPs durch Phosphodiesterasen

Abhängig vom Zelltyp und der Funktion ändert sich die cGMP-Konzentration in sehr kurzer Zeit, oder sie kann für Stunden sehr hoch sein. Die Amplitude, Dauer sowie Ausbreitung eines cGMP Signals wird dabei von cGMP-abhängigen Phosphodiesterasen (PDEs) reguliert. PDEs sind Enzyme, die sich in fast allen Zellen nachweisen lassen und dienen zur Hydrolyse der sekundären Botenstoffe cGMP und cAMP. cGMP wird dabei zu Guanosin-5'-monophosphat (GMP) abgebaut, während cAMP zu Adenosin-5'-monophosphat (AMP) abgebaut wird<sup>164</sup>. PDEs unterscheiden sich in ihrer Affinität und Spezifität für cAMP und cGMP, in ihrer Gewebedistribution sowie in ihrer subzellulären Lokalisation in Kardiomyozyten und anderen Zellen. Die unterschiedliche subzelluläre Verteilung und Aktivität der PDEs führt zu variablen cGMP- und cAMP-Konzentrationen in den verschiedenen intrazellulären Kompartimenten nach pGC- und sGC-Stimulation<sup>165</sup>. Die Aktivität der PDEs wird durch verschiedene biochemische Mechanismen, einschließlich Phosphorylierungen/Dephosphorylierungen, allosterische Bindung von cGMP oder cAMP, Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM und verschiedenen Protein-Protein-Interaktionen reguliert<sup>166</sup>. Diese Faktoren sind wichtige Komponenten zur Feinregulierung lokaler cGMP-Konzentrationen. Es wurden bisher 11 verschiedenen PDE-Genfamilien identifiziert, von denen PDE5, 6 und 9 spezifisch für cGMP und PDE4, 7 und 8 selektiv für cAMP sind. Die PDE1, 2, 3, 10

und 11 hydrolysieren hingegen beide sekundäre Botenstoffe<sup>167</sup>. Zudem werden innerhalb der PDE-Gruppen weitere Subfamilien und Spleißvarianten (bezeichnet mit Großbuchstaben, z.B.: PDE2A) unterschieden<sup>168</sup>. Alle PDEs haben eine C-terminale Region, in der sich die katalytische Domäne befindet. Die N-terminale Domäne der PDEs 2, 5, 6, 10 und 11 enthält eine regulatorische Domäne, die sogenannte GAF-Bindungsdomäne, die die allosterische Bindung von cGMP, die Dimerisation und die Modulation der katalytischen Aktivität ermöglicht.

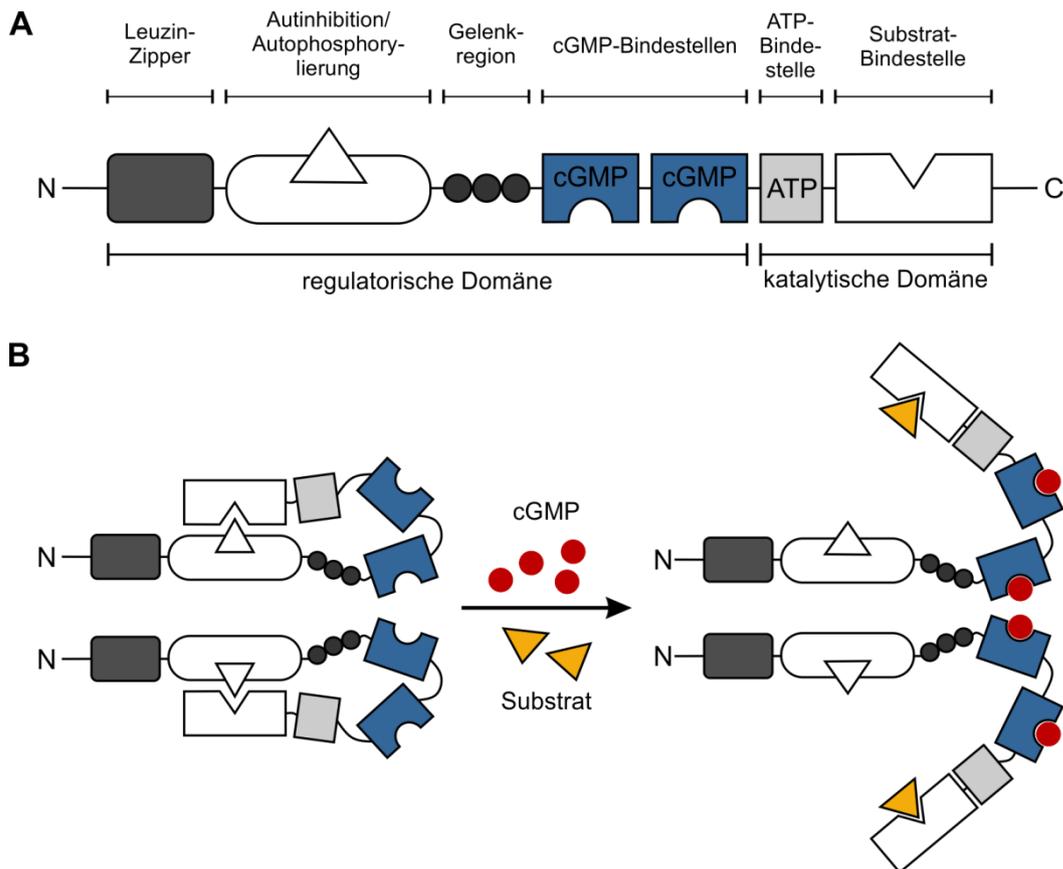
Im Herzen gibt es verschiedene Subfamilien von PDEs mit unterschiedlicher Substratspezifität, die ein *Crosstalk* zwischen den PDEs impliziert und somit eine Feinregulation der cGMP-Konzentration im Herzen gewährleisten<sup>169,170</sup>. PDE2, PDE3 und PDE5 sind an der negativen Rückkopplung von cGMP und cAMP beteiligt. Die PDE2 hydrolysiert cAMP und cGMP in gleichem Maße und kann die zyklischen Nukleotide am allosterischen Zentrum binden. Die Bindung von cGMP in der GAF B-Domäne der PDE2 verbessert dessen katalytische Aktivität, was zur erhöhten Hydrolyse von cAMP führt<sup>171</sup>. Durch diese duale Substratspezifität ist ein negativer *Crosstalk* zwischen dem cGMP- und cAMP-Signalweg möglich, da cGMP in der Lage ist das cAMP-Signal zu reduzieren. Die PDE3 kann ebenfalls sowohl cGMP, als auch cAMP hydrolysieren, hat aber eine höhere, jedoch sehr niedrige Hydrolysegeschwindigkeit für cAMP, sodass vor allem kleinste Mengen cGMP zu einer kompetitiven Hemmung des PDE3-vermittelten cAMP-Abbaus führen<sup>172</sup>. Letztlich kommt es durch diese negative Rückkopplung zur Akkumulation von cAMP. Die cAMP-Konzentration wird somit durch cGMP über PDE2 und PDE3 beeinflusst. Obwohl die Expression von PDE5 in Kardiomyozyten sehr niedrig ist<sup>173,174</sup>, bekommt sie immer mehr Bedeutung und spielt offensichtlich zusammen mit der PDE1 und PDE2 eine wichtige Rolle in der Regulation von cGMP in den Kardiomyozyten<sup>175</sup>. Die PDE5 ist spezifisch für cGMP und zumindest im Herzen scheint sie insbesondere die NO-sGC generierten cGMP-Pools zu regulieren<sup>161,176</sup>. *In vivo* wurde gezeigt, dass Sildenafil (ein PDE5 Inhibitor) die Post-Ischämische Dysfunktion des Herzens reduziert<sup>177</sup> und auch *in vitro* sowohl Apoptose als auch Nekrose in isolierten Kardiomyozyten reduziert<sup>178</sup>. Durch die allosterische Bindung von cGMP an die GAF A-Domäne der PDE5 kommt es durch beschleunigte cGMP-Hydrolyse am katalytischen Zentrum zu einem negativen Rückkopplungsmechanismus<sup>179</sup>.

### 1.6.3 Struktur und Vorkommen der cGMP-abhängigen Proteinkinase Typ I

cGMP-abhängige Proteinkinasen (cGK) gehören zu den Serin/Threonin Kinasen. Die cGK-Isoformen werden dabei von zwei Genen (*prkg 1* und *prkg 2*) kodiert. cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$  sind Spleißvarianten des *prkg 1* Gens und cGKII wird von *prkg 2* kodiert<sup>180,181</sup>. Die cGKI wird hauptsächlich im glatten Muskelgewebe, in der Lunge, in Plättchen und im Gehirn exprimiert<sup>182,183</sup>. Dabei ist die cGKI $\alpha$  vor allem im Herzen präsent<sup>184,185</sup>. Abbildung 1.8 zeigt die schematische Struktur der cGKI.

Beide cGKI Isoformen sind lösliche Enzyme. Nach Bindung von cGMP phosphorylieren cGKs eine Vielzahl von Proteinen an Serin/Threonin-Resten. Die cGKs bestehen aus drei funktionalen Domänen. Sie enthalten eine N-terminale Domäne, eine regulatorische Domäne sowie eine katalytische Domäne. Sie liegen stets als Homodimere vor, welche über ein Leucizipper-Motiv in der N-terminalen Region miteinander interagieren<sup>186</sup>. Die regulatorische Domäne enthält zwei cGMP Bindestellen mit unterschiedlicher Affinität für cGMP, die katalytische Domäne eine Bindestelle für Mg<sup>2+</sup>-ATP und

eine Bindestelle für Peptide<sup>181,187</sup>. Die N-terminale Region reguliert die Affinität der cGMP-Bindestellen über einen allosterischen Mechanismus, vermittelt nach Aktivierung eine Dimerisation des Enzyms mit Hilfe des Leucinzipper-Motivs und interagiert mit den Zielproteinen. Die Bindung von cGMP an beide Seiten der regulatorischen Domäne resultiert in einer Autophosphorylierung des Amino-Terminus und einer Konformationsänderung des Enzyms. Hierbei wird das Zentrum der katalytischen Domäne von der Autoinhibition durch die Pseudosubstratbindestelle frei, was den Transfer eines Phosphatrestes von ATP auf ein Serin oder Threonin und dadurch die Phosphorylierung des Zielproteins erlaubt<sup>188</sup>.



**Abbildung 1.8 Schematische Struktur der cGKI**

(A) Schematische Darstellung eines cGKI-Monomers mit einer regulatorischen und katalytischen Domäne. (B) Die Bindung von 4 cGMP Molekülen führt zur Dimerisierung und Aktivierung der cGKI, was die Interaktion mit Substraten und deren Phosphorylierung ermöglicht. Das Schema wurde modifiziert nach *Vallur, Kalbacher et al. 2014*<sup>189</sup>. Weitere Details im Text.

#### 1.6.4 Zielproteine von cGMP/cGKI im kardiovaskulären System

Es wurden zahlreiche Zielproteine identifiziert, die von der cGKI phosphoryliert werden<sup>190</sup>. Die cGKI kann modulierend in den Energiehaushalt der Zellen und in verschiedene Signalkaskaden, die Proliferation und Differenzierung von Glattmuskelzellen und Kardiomyozyten regulieren, eingreifen. Aktiviert wird die cGKI schon durch submikromolare Konzentrationen an cGMP. Dabei wird die Substratspezifität der cGKI-Isoformen über die N-terminale Region bestimmt.

Die cGKI wirkt modulierend auf vaskuläre Glattmuskelzellen (VSMC). Diese regulieren den Gefäßtonus und spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Arteriosklerose und anderen vaskulären Erkrankungen. Im Allgemeinen wird die SMC-Kontraktion durch Rezeptor-vermittelte Generierung des sekundären Botenstoffes Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $IP_3$ ) ausgelöst.  $IP_3$  induziert die  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern, gefolgt von einem extrazellulären  $Ca^{2+}$ -Einstrom über spannungsabhängig und -unabhängig gesteuerte  $Ca^{2+}$ -Kanäle. Eine erhöhte  $[Ca^{2+}]_i$  führt letztlich zur Aktivierung der Myosin-ATPase und Kontraktion der SMCs<sup>191</sup>. Dabei kann die cGKI sowohl die  $[Ca^{2+}]_i$  durch Hemmung der  $IP_3$ -vermittelten  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern reduzieren als auch die  $Ca^{2+}$ -Sensitivität beeinflussen.

Darüber hinaus kann die cGKI den calciumaktivierten Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit (BK-Kanal) direkt oder indirekt durch Regulation von Phosphatasen phosphorylieren und dadurch dessen Öffnungswahrscheinlichkeit erhöhen<sup>192-194</sup>. Die Öffnung des BK-Kanals resultiert in einer Membranhypervolarisation und einer Reduktion des Calciumeinstroms durch Schließen von spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanälen einschließlich des L-Typ-Calciumkanals. Das Öffnen des BK-Kanals ist maßgeblich an der Regulation des Blutdrucks beteiligt, was in Wildtyp und cGKI-defizienten Mäusen gezeigt wurde<sup>195,196</sup>. Die in den Kardiomyozyten lokalisierte cGKI greift in die myozytäre Erregungsleitung und Kontraktibilität durch Regulation der intrazellulären Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) ein und ist außerdem wichtig zur Vasorelaxation und Kontrolle des Gefäßtonus<sup>197</sup>. Dabei wirkt cGMP/cGKI durch Regulierung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration negativ inotrop, unabhängig von muskarinergen parasymphatischen Signalwegen<sup>198</sup>. Die cGMP-Modulation der Kontraktibilität kann entweder durch Stickstoffmonoxid oder natriuretische Peptide initiiert werden<sup>199,200</sup>. NO hat dabei eine zweiseitige Wirkung auf die myokardiale Kontraktion: Niedrige Konzentrationen von NO erhöhen die myokardiale Kontraktibilität, während hohe Konzentrationen einen negativen inotropen Effekt ausüben. Bei niedrigen NO-Konzentrationen und somit einer niedrigen cGMP-Konzentration hemmt cGMP die Aktivität der PDE3, was die Hydrolyse von cAMP verhindert<sup>199,201</sup>. Außerdem können niedrige Konzentrationen von NO die Adenylatzyklase aktivieren, wodurch die Produktion von cAMP induziert wird<sup>202</sup>. Die Akkumulation von cAMP aktiviert die Proteinkinase A (PKA), was zur Öffnung von sarkolemmlen spannungsgesteuerten und sarkoplasmatischen Ryanodin-Rezeptoren führt und letztlich die Myozytenkontraktibilität durch erhöhte  $[Ca^{2+}]_i$  verbessert<sup>203</sup>. Es wurde zudem gezeigt, dass die cGKI direkt Troponin I phosphorylieren kann, was eine verringerte Reaktionsfähigkeit der Myofilamente gegenüber  $Ca^{2+}$  zur Folge hat und die negative Inotropie und positive Lusitropie der cGKI erklärt<sup>204,205</sup>. Während des Aktionspotentials sind hauptsächlich L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle in den T-Tubuli für den intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Einstrom in die Kardiomyozyten verantwortlich. Auch diese L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle können direkt durch die cGKI phosphoryliert werden<sup>206</sup>. Durch die cGKI-vermittelte Phosphorylierung der  $\alpha 1c$ - und  $\beta 2a$ -Untereinheiten des L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanals wird dieser in seiner Aktivität gehemmt. Folglich wird auch die  $Ca^{2+}$ -induzierte  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum vermindert. Des Weiteren hat der NO/cGMP/cGKI-Signalweg anti-hypertrophe Wirkungen. Die kardiale hypertrophe Reaktion beinhaltet komplexe Signaltransduktionswege. Vor allem eine erhöhte intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration führt zur Expression eines hypertrophen Genprogrammes, in das der NO/cGMP/cGKI-Signalweg modulierend eingreifen kann<sup>207,208</sup>.

In der Apoptose und der Vermittlung antiapoptotischer Signale während Hypoxie-Reoxygenierung spielt der kardialen NO/cGMP/cGKI-Signalweg ebenfalls eine wichtige Rolle. Er trägt somit zu einem bedeutenden Teil zur Kardioprotektion bei. Dies wird im folgenden Abschnitt ausführlich dargelegt.

### 1.6.5 Die Rolle des NO/cGMP/cGKI-Signalweges sowie dessen pharmakologische Modulation bei Hypoxie-Reoxygenierung

Hypoxie/Reoxygenierung hat dramatische Auswirkungen auf die basalen cGMP-Levels im Myokard und die Fähigkeit von Kardiomyozyten, auf Stimulatoren der cGMP-Synthese zu reagieren. Im isolierten Langendorff Herzmodell wurde gezeigt, dass die myokardialen cGMP-Spiegel während den ersten 10 – 25 min der Ischämie ansteigen und danach wieder akut abnehmen<sup>209-211</sup>. Auch *in situ* wurden reduzierte myokardiale cGMP-Levels im Rattenherz beschrieben, die einer transienten Ischämie unterworfen wurden<sup>212</sup>. Mehrere Faktoren können die cGMP-Synthese bei Hypoxie/Reoxygenierung verändern. Es wurde gezeigt, dass die Acidose für die cGMP-Synthese entscheidend ist. *In vitro* in kultivierten Kardiomyozyten wurde gezeigt, dass ein niedriger intrazellulärer pH-Wert die Aktivität der pGC reduziert<sup>213</sup>. Dies deutet darauf hin, dass die cGMP-Synthese während der Hypoxie weitgehend abhängig von der NO-Stimulation der sGC ist. Der oxidative Stress kann wiederum die sGC-Aktivität durch direkte Oxidation seiner Häm-Gruppe verringern<sup>214,215</sup>. Darüber hinaus ist eine reduzierte NO-Bioverfügbarkeit während der Reoxygenierung zu beobachten, eine Folge der eNOS-Entkopplung durch Oxidation seines Cofaktors<sup>216,217</sup>. Viele derzeitige Erkenntnisse über den NO/cGMP/cGKI-Signalweg sprechen für seine wichtige Rolle in der Kardioprotektion. In den vergangenen Jahren hat die cGMP/cGKI-Signalisierung vor allem in Mitochondrien zunehmend Aufmerksamkeit erlangt. Mehrere Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass NO über sGC/cGMP/cGKI die mPTP-Öffnung inhibiert<sup>115,218,219</sup>. Dieser Weg scheint durch die Translokation von cGKI zur OMM vermittelt zu werden. Es wird angenommen, dass cGMP/cGKI die Epsilon-Isoform der Proteinkinase C (PKC $\epsilon$ ) in der IMM phosphoryliert und über den in der IMM sitzenden ATP-sensitiven K<sup>+</sup> (mitoK<sub>ATP</sub>)-Kanal zu einer Hemmung der mPTP-Öffnung führt. Diese *ex vivo* Befunde deuten darauf hin, dass cGMP eine vorgeschaltete Komponente der Kardioprotektion darstellt und Kaliumkanäle in der IMM involviert. Der genaue Mechanismus der Öffnung des mitoK<sub>ATP</sub> durch cGKI $\alpha$  ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird postuliert, dass cGMP/cGKI ein bislang noch nicht näher identifiziertes Protein in der OMM phosphoryliert, und so das kardioprotektive Signal vom Cytosol an den mitoK<sub>ATP</sub> in der IMM über PKC $\epsilon$  übertragen wird<sup>218</sup>. Die Interaktion von PKC $\epsilon$  mit dem mitoK<sub>ATP</sub> erhöht dessen Offenwahrscheinlichkeit, wodurch die mitochondriale Calciumüberladung der Matrix verhindert und die Kardioprotektion vermittelt wird<sup>115,218</sup>. Zudem führt die Öffnung des mitoK<sub>ATP</sub> zu einer Mitochondrienschwellung und mitochondrialen ROS-Produktion. Die hierdurch limitierten ROS Mengen führen über eine Aktivierung der PKC $\epsilon$  zur Hemmung der mPTP-Öffnung<sup>220</sup>.

Es gibt zahlreiche Studien die zeigen, dass pharmakologische Interventionen, die auf einer Erhöhung der cGMP-Synthese oder Hemmung des cGMP-Abbaus während der Reperfusion beruhen, den Zelltod verringern. In einem isolierten Rattenherzen Model wurde gezeigt, dass niedrige Konzentrationen des zellpermeablen cGMP-Analogons 8-Br-cGMP kurz vor der Ischämie bis zur

frühen Reperfusion verabreicht, die Infarktgröße reduziert<sup>221</sup>. Zu Beginn der Reperfusion gegeben, reduziert 8-Br-cGMP ebenfalls die Infarktgröße um bis zu 40% im Vergleich zu Kontrollherzen<sup>222</sup>. Diese Befunde zeigen, dass die Zugabe exogener Substanzen/Analoga die mutmaßlich über die cGKI wirken die Infarktgröße beeinflussen. Alternativ wurde auch das kardioprotektive Potential von Arzneistoffen, die die sGC modulieren *in vivo* und *ex vivo* im Tiermodell untersucht. Hierzu gehören beispielsweise Riociguat (BAY63-2521), als erster Vertreter dieser Wirkstoffklasse und das inzwischen bekannteste Cinaciguat (BAY58-2667)<sup>223</sup>. Während Riociguat die sGC NO-unabhängig jedoch Häm-abhängig aktiviert, stimuliert Cinaciguat sowohl unabhängig von NO als auch der Hämgruppe die sGC zur cGMP-Produktion. Riociguat wurde bereits intensiv untersucht. Es konnte für Riociguat im *in situ* Infarktmodell eine signifikante Reduktion der Infarktgröße sowie eine verbesserte Langzeitprognose der Herzfunktion 28 Tage nach erzeugtem MI gezeigt werden<sup>224</sup>. Riociguat ist zudem zur Therapie der chronisch-thromboembolischen pulmonalen Hypertonie (CTEPH) und der pulmonalen-arteriellen Hypertonie (PAH) zugelassen<sup>225,226</sup>. Cinaciguat wird inzwischen bevorzugt im Tiermodell eingesetzt, da es die oxidierte (pathologische) Form der sGC aktiviert<sup>227</sup>. Mit Cinaciguat wurde ebenfalls in einem *in situ* Infarktmodell eine signifikante Infarktreduktion in Rattenherzen<sup>228</sup> beobachtet, was in Maus<sup>229</sup>- und in Kaninchenherzen<sup>228,230</sup> bestätigt werden konnte. Dabei wurde der sGC-Aktivator zu Beginn der Reperfusion nach einer 30-minütigen globalen Ischämie verabreicht. Die cGMP-Spiegel waren in den stimulierten Herzen 40-mal größer als in den perfundierten Kontrollherzen. Die Schutzwirkung war jedoch in Kardiomyozyten-spezifischen cGKI-KO-Mäusen aufgehoben<sup>231</sup>. Diese Befunde implizieren, dass cGMP/cGKI wichtige Signalkomponenten des über sGC stimulierten kardioprotektiven Signalweges sind. Auch mit Ataciguat, einem weiteren NO und Häm-unabhängigen sGC-Stimulator, der während der Reperfusion verabreicht wurde, konnte sowohl *ex vivo* als auch *in vivo* ein infarktreduzierender Effekt beobachtet werden<sup>232</sup>. Durch die Verwendung natriuretischer Peptide konnte ebenfalls bei ischämischen Herzen eine Reduktion der Infarktgröße beobachtet werden. Die Stimulation der pGCs in der Reperusionsphase durch ANP oder BNP hat gezeigt, dass sie sowohl in isolierten Kardiomyozyten als auch in *ex vivo* und *in vivo* Herzen konzentrationsabhängig den Infarkt reduzieren<sup>233-235</sup>. Klinische Untersuchungen haben gezeigt, dass eine ANP Infusion, verabreicht zu Beginn der Reperfusion, die Infarktgröße reduzieren und das Auftreten von Herztod bei Patienten mit akutem MI verringern kann<sup>236</sup>. Ein alternativer Ansatz zur Stimulierung des NO/sGC-Weges, der NOS unabhängig ist, kann durch Verwendung von Nitraten (Nitroglycerin, Isosorbidmononitrat) und Nitriten (Natriumnitrit, Amylnitrit), die in aufeinanderfolgenden Schritten durch enzymatische und nicht-enzymatische Mechanismen NO erzeugen, stimuliert werden sowie durch synthetische NO-Donors, die spontan NO freisetzen<sup>237</sup>. Die kardioprotektiven Wirkungen dieser Verbindungen wurden durch zahlreiche Studien untersucht und es gibt einige Hinweise darauf, dass ihre Verabreichung vor der Ischämie die Infarktgröße durch NO-abhängige NOS-unabhängige Mechanismen vermindert<sup>238-240</sup>. Des Weiteren wurden verschiedene PDE-Inhibitoren auf ihre protektiven Eigenschaften bei Ischämie/Reperfusion untersucht. Sildenafil stellt hierbei den wohl bekanntesten Wirkstoff aus der Klasse der PDE5-Inhibitoren dar. Eine Hemmung der PDE5 mit Sildenafil, verabreicht vor der globalen Ischämie im *ex vivo* Langendorffmodell, hatte einen positiven Effekt auf die Infarktgröße<sup>241</sup>. Dieser Schutz ließ sich jedoch aufheben, wenn gleichzeitig der cGKI-Blocker KT5823 verabreicht wurde. Es wird daher vermutet, dass Sildenafil seine Schutzeffekte über eine cGKI-abhängige Phosphorylierung von ERK1/2, GSK-3 $\beta$  und einer erhöhten Expression von Bcl-2 sowie einer erhöhten NO-Produktion

durch Aktivierung von eNOS/iNOS, Aktivierung von PKC und Öffnung von mitoK<sub>ATP</sub>-Kanälen vermittelt<sup>241-243</sup>. In einer Reihe von Studien konnte auch für die potenteren PDE5-Hemmer Tadalafil und Vardenafil eine kardioprotektive Wirkung im Tiermodell gezeigt werden<sup>244,245</sup>.

Zusammengenommen konnten vor allem für die sGC-Modulatoren und die Inhibitoren der PDE5 bisher vielversprechende Therapieansätze zur Reduktion der Infarktgröße bei Ischämie/Reperfusion im Tiermodell beobachtet werden.

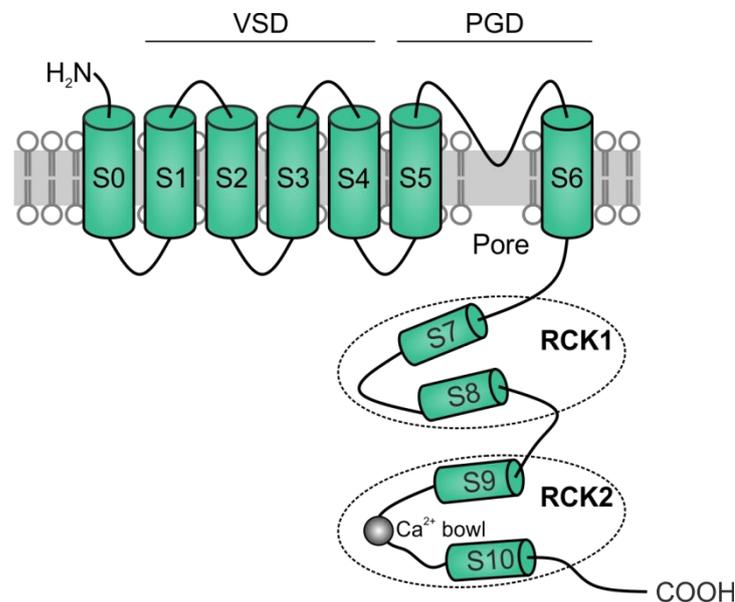
### 1.7 Der BK-Kanal

Der BK-Kanal ist ein Ca<sup>2+</sup>- und spannungsaktivierter Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit. Dabei steht die Abkürzung BK für die hohe Leitfähigkeit (*big conductance*) des Kanals. In der Literatur finden sich neben der Bezeichnung BK-Kanal zahlreiche weitere Namen wie MaxiK, K<sub>Ca</sub>1.1, KCNMA1 und Slo1. Slo1 leitet sich dabei von der Bezeichnung des *Slowpoke* Gens ab, welches für den BK-Kanal codiert und in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* zuerst identifiziert wurde. Diese Fruchtfliegen zeigten auf Grund eines fehlenden Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Kaliumstroms einen lethargischen Phänotyp, einhergehend mit auffällig verlangsamten und gestörten Bewegungsabläufen durch eine Störung der Signalwege in Neuronen und muskulären Geweben<sup>246,247</sup>. Bald daraufhin wurde das homologe Gen von Mensch und Maus kloniert und intensiv untersucht<sup>248,249</sup>. Die Besonderheit des BK-Kanals liegt in seiner hohen Einzelkanal-Leitfähigkeit von 100 – 300pS und seiner sowohl durch Liganden als auch durch Spannung gesteuerten Aktivierung, d.h. er kann sowohl durch eine erhöhte [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> als auch durch Membrandepolarisation (Spannungsänderungen) aktiviert werden. Neben Spannungsänderungen und Ca<sup>2+</sup> aktiviert auch intrazelluläres Mg<sup>2+</sup> BK-Kanäle<sup>250,251</sup>. Die Aktivierung von BK-Kanälen und der daraus resultierende K<sup>+</sup>-Ausstrom führt zur Repolarisation der Membran und zum Schließen von spannungsabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Kanälen, was den Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in die Zelle reduziert. Der BK-Kanal gilt daher als ein zentraler Regler der Membranerregbarkeit und der Ca<sup>2+</sup>-Homöostase.

#### 1.7.1 Struktur des BK-Kanals

Der BK-Kanal wird vom Slo1 Gen kodiert, wobei KCNMA1 der Gencode für die humane  $\alpha$ -Untereinheit des BK-Kanals ist. BK-Kanäle bestehen aus mehreren Untereinheiten einschließlich  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten. Dabei bilden die  $\alpha$ -Untereinheiten die porenbildende Untereinheit und ein funktionaler Kanal besteht aus einem Tetramer aus vier  $\alpha$ -Untereinheiten, die mit einer variablen Anzahl an  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten assoziiert sein können<sup>252,253</sup>. Durch alternatives Spleißen sowie transkriptionale Regulation und Modulation durch zusätzliche, verschiedene  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten, entsteht die funktionale Vielfalt und die zellspezifische, subzelluläre Verteilung des Kanals. Insbesondere die akzessorischen  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten sind meist gewebespezifisch exprimiert und können funktionelle und pharmakologische Eigenschaften wie Kanalkinetik, Calcium- oder Spannungsempfindlichkeiten stark verändern<sup>254,255</sup>. Posttranslationale Modifikationen wie Lipidierungen und Phosphorylierungen sind weitere Komponenten zur Regulation der BK-Kanal Funktion. Ein funktionaler BK-Kanal kann in drei Hauptstrukturdomänen unterteilt werden (siehe

Abbildung 1.9): eine VSD-Sensorspannungs-Domäne, eine C-terminale cytoplasmatische Domäne, die durch verschiedene intrazelluläre Liganden gesteuert wird und eine Poren Region (PGD), die die Ionenpermeation als Reaktion auf verschiedene Reize steuert.



**Abbildung 1.9 Schematische Darstellung der  $\alpha$ -Untereinheit des BK-Kanals**

Die  $\alpha$ -Untereinheit besteht aus sieben transmembranären Domänen (S0 – S6), die den Spannungssensor (S4) und die Kanalpore zwischen S5 und S6 beinhaltet, sowie einen extrazellulären N-Terminus und einen langen intrazellulären C-Terminus mit vier weiteren hydrophoben Segmenten (S7 – S10) und zwei RCK Domänen. Die RCK Domänen besitzen je eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestelle, die die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität und darüber die Aktivität des Kanals stark beeinflussen. VSD: *voltage sensing domain*; PGD: *pore-gate domain*; RCK1, RCK2: *regulator of conductance for  $\text{K}^+$* . Weitere Details im Text.

Die  $\alpha$ -Untereinheit besteht dabei aus sieben transmembranären Domänen (S0 – S6), wobei die Domänen S1 – S4 den spannungssensitiven Abschnitt (VSD, *voltage sensing domain*) darstellen und die Domänen S5 – S6 die Pore des Kanals (PGD, *pore-gate domain*) bilden. Zudem enthält die  $\alpha$ -Untereinheit einen extrazellulär lokalisierten N-Terminus und einen langen C-Terminus. Einzigartig beim BK-Kanal ist das zusätzliche S0-Transmembransegment, das direkt mit der Spannungsdomäne des Kanals interagiert und somit die Konformation sowohl des offenen als auch des geschlossenen Kanals moduliert. Zusätzlich interagiert das S0-Transmembransegment der  $\alpha$ -Untereinheit über den N-Terminus mit angrenzenden  $\beta$ -Untereinheiten. Im VSD Abschnitt befinden sich die Spannungssensoren im S2, S3 und S4-Segment, wobei das S4-Segment eine Reihe an positiv geladenen Arginin-Resten enthält und daher als primärer Spannungssensor gilt<sup>256</sup>. Als Reaktion auf die Depolarisation bewegt sich der Spannungssensor in BK-Kanälen von einem Ruhezustand in einen aktiven Zustand<sup>247,248</sup>. Bei einer niedrigen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  verhält sich der BK-Kanal dabei wie ein spannungsabhängiger  $\text{K}^+$ -Kanal<sup>257</sup>. Neben der spannungsabhängigen Regulierung des Kanals, kann dieser auch direkt durch die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration reguliert werden. In der cytoplasmatischen Region befindet sich der große C-Terminus mit den vier hydrophoben Segmenten S7 – S10. Die Sequenz beinhaltet zwei regulatorische Domänen für die  $\text{K}^+$ -Leitfähigkeit (RCK1 und RCK2, *regulator of conductance for  $\text{K}^+$* ), die eine große Homologie zu den RCK Domänen anderer

K<sup>+</sup>-Kanäle und Transportern aufweisen<sup>258</sup>. Jede  $\alpha$ -Untereinheit enthält darüber hinaus zwei hochaffine Ca<sup>2+</sup>-Bindungsstellen. Dabei befindet sich eine Ca<sup>2+</sup>-Bindungsstelle in der RCK2-Domäne, die eine Reihe von Aspartat (Asp)-Resten zwischen den Domänen S9 und S10 enthält und die andere in der RCK1-Domäne<sup>259</sup>. Die Ca<sup>2+</sup>-Bindungsstelle in der RCK2 wird als „Ca<sup>2+</sup>-Bowl“ bezeichnet<sup>260</sup>. Mutationen der Asp-Reste in der Ca<sup>2+</sup>-Bowl reduzieren die Ca<sup>2+</sup>-Empfindlichkeit, wodurch die Öffnungswahrscheinlichkeit des BK-Kanals entscheidend beeinflusst werden kann<sup>260</sup>. Neben der Aktivierung durch Ca<sup>2+</sup> kann der Kanal auch durch Mg<sup>2+</sup> aktiviert werden, wobei man von zwei unterschiedlichen Aktivierungswegen ausgeht. 2001 haben zwei unabhängige Studien des geklonten BK-Kanals gezeigt, dass millimolare Konzentration an Mg<sup>2+</sup> den BK-Kanal über eine niederaffine Metallbindungsstelle aktivieren, die unabhängig von der Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Aktivierung ist<sup>250</sup>. Die Mg<sup>2+</sup>-Bindungsstelle befindet sich in der RCK1 zwischen der Schnittstelle von VSD und der cytosolischen Domäne<sup>261</sup>. Hinzu kommen Sequenzbereiche, die Effekte durch pH-Änderungen, Hämgruppen, Kohlenstoffmonoxid sowie Phosphorylierungen durch Kinasen vermitteln.

Funktionelle Eigenschaften des BK-Kanals wie Spannungsabhängigkeit aber auch Modulation der Kanaldichte an der Plasmamembran, können wie bereits erwähnt signifikant durch  $\beta$ -Untereinheiten verändert werden<sup>262</sup>. Dabei sind vier unterschiedliche  $\beta$ -Untereinheiten ( $\beta_1 - \beta_4$ ), codiert von vier verschiedenen Genen (KCNMB1 – 4), bekannt. Die unterschiedlichen Isoformen werden gewebespezifisch exprimiert, wobei die  $\beta_1$ -Untereinheit v.a. in der glatten Muskulatur (in VSMCs), die  $\beta_2$ - und  $\beta_4$ -Untereinheit v.a. im Gehirn und die  $\beta_3$ -Untereinheit in Pankreas und Hoden exprimiert sind<sup>263,264</sup>. Die  $\beta$ -Untereinheiten bestehen aus zwei transmembranären Domänen, wobei sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus intrazellulär lokalisiert sind. Die modulierende Funktion kommt dabei über die extrazelluläre Schleife mit dem S0-Segment und dem extrazellulären N-Terminus der  $\alpha$ -Untereinheit zustande. In jüngerer Zeit wurden zusätzliche Proteinpартner des Kanals identifiziert und als  $\gamma$ -Untereinheiten bezeichnet. Diese Proteine gehören zu den LRRC (*leucine-rich repeat containing protein*)-Proteinen und umfassen bislang 4 Mitglieder (LRRC 26, 38, 52 und 55)<sup>265</sup>. Sie werden gewebespezifisch exprimiert und könnten die Funktionalität sowie spannungsabhängige Aktivierung des Kanals deutlich beeinflussen. Darüber hinaus können BK-Kanäle durch posttranslationale Modifikationen einschließlich Phosphorylierungen, Glykosylierungen und oxidative Modifikationen reguliert werden (NO, Wasserstoffperoxid usw.).

### 1.7.2 Lokalisation und Expression im kardiovaskulären System

BK-Kanäle sind ubiquitär in einer Vielzahl verschiedener Zellen exprimiert. Sie finden sich in Neuronen<sup>266</sup>, inneren Haarzellen von Cochlea<sup>267</sup> sowie Skelett<sup>268</sup>- und Glattmuskelzellen<sup>269</sup> und humanen Fibroblasten<sup>270</sup> wieder und sind meist in der Plasmamembran lokalisiert. In Kardiomyozyten zeigen mehrere Befunde, dass BK-Kanäle in der IMM (mitoBK) exprimiert werden<sup>271-273</sup>. Diese mitochondriale Lokalisation des BK-Kanals wurde neben Kardiomyozyten auch in Gliomazellen und Astrozyten beobachtet<sup>274</sup>. Auch im Nukleus, ER und Golgi-Apparat konnten in jüngster Zeit intrazelluläre BK-Kanäle identifiziert werden, deren Funktionen jedoch weitgehend unklar sind<sup>273</sup>. Die kardiale mitoBK-Kanal-Expression ist jedoch auf Grund des sehr geringen Expressionsniveaus umstritten. Xu beschrieb als erster BK-ähnliche Ströme in Mitochondrien aus Meerschweinchenherzen

von  $\sim 300\text{pS}$ <sup>275</sup>. Vor kurzem wurde in Mitoplasten aus murinen Kardiomyozyten in einer unabhängigen Studie ebenfalls BK-ähnliche Ströme gemessen<sup>271</sup>. Mittels Patch-clamp Analyse wurden unterschiedliche Amplituden der Einzelkanal-Leitfähigkeit klassifiziert. Dabei fehlte der für den BK-Kanal typische Strom von 190pS in Mitoplasten von BK-Knockout (BK-KO) Mäusen im Vergleich zu BK-Wildtyp (BK-WT) Mitoplasten<sup>271</sup>, die vier Leitfähigkeiten mit unterschiedlichen Frequenzen aufwiesen. Nur die 190pS Einzelkanal-Leitfähigkeit der BK-WT Mitoplasten war sensitiv für pharmakologische BK-Kanalblocker und -öffner. Darüber hinaus zeigten Singh und seine Mitarbeiter vor kurzem, dass kardiomyozytäre BK-Kanäle eine neuartige C-terminale Spleißvariante (DEC) enthalten, die wenn sie exprimiert wird, exklusiv in der IMM der Kardiomyozyten lokalisiert wird<sup>272</sup>. Neben weiteren Untersuchungen zur Co-Lokalisation des Kanals mit mitochondrialen Markerproteinen konnten die Autoren in derselben Arbeit erstmals den Nachweis erbringen, dass die porenbildende  $\alpha$ -Untereinheit des mitoBKs und des plasmamembranären BK-Kanals vom selben Gen (KCNMA1) codiert werden. Dies erklärt die gemeinsamen grundlegenden biophysikalischen Eigenschaften des Kanals, einschließlich der großen Leitfähigkeit, sowie die Spannungs- und  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität. Um ihre Funktion in Mitochondrien auszuüben, muss der mitoBK zuerst ins Mitochondrium transportiert werden und assoziiert dort wahrscheinlich mit Partnerproteinen wie es in anderen Zellen der Fall ist<sup>276</sup>. Neueste Ergebnisse zeigen Wechselwirkung des mitoBKs mit TOM22, einem Bestandteil des TOM-Komplexes und des ANT<sup>277</sup>. Dies führte zu der Vermutung, dass der mitoBK über den TOM-Komplex die OMM passieren kann und somit in den IM der Mitochondrien gelangt. Dabei wurde in Mitochondrien aus kardialen ventrikulären Myozyten neben der  $\alpha$ -Untereinheit die  $\beta_1$ -Untereinheit identifiziert<sup>278</sup>. Interessanterweise findet zwischen der  $\beta_1$ -Untereinheit des mitoBKs und der Cytochrom-C-Oxidase Untereinheit I, einer Komponente der ETC, eine direkte Interaktion statt<sup>278</sup>. Ob auch  $\gamma$ -Untereinheiten exprimiert werden, ist bisher noch unklar.

### 1.7.3 Physiologische Bedeutung

BK-Kanäle sind, wie bereits erwähnt, ubiquitär in zahlreichen Geweben exprimiert, wodurch sie an einer Reihe wichtiger physiologischer Prozesse beteiligt sind. Sie sind beispielsweise für die Erregbarkeit der Neuronen und die Ausschüttung von Neurotransmittern in synaptischen Endigungen wichtig<sup>279</sup>. Sie modulieren die endokrine Sekretion von Hormonen<sup>280</sup> und regulieren den vaskulären Tonus<sup>257</sup> sowie den der Harnblase<sup>281</sup> und des Atmungsorgans<sup>282</sup>. In Übereinstimmung mit ihrer physiologischen Bedeutung kann eine Fehlfunktion des BK-Kanals daher zu Epilepsie<sup>283</sup>, motorischer Beeinträchtigung<sup>279</sup>, geräuschinduziertem Hörverlust<sup>284</sup>, Hypertonie<sup>285</sup>, Harninkontinenz<sup>286</sup>, überaktiver Harnblase<sup>287</sup> und Asthma<sup>288</sup> führen. Die Rolle des BK-Kanals bei Hypoxie-Reoxygenierung wird im folgenden Abschnitt genauer betrachtet.

### 1.7.4 Die Rolle des BK-Kanals bei Hypoxie-Reoxygenierung

Der mitoBK erlangt immer mehr Aufmerksamkeit und seine Aktivierung wurde wiederholt mit Kardioprotektion nach Ischämie-Reperfusion bzw. Hypoxie-Reoxygenierung assoziiert. Neben dem mitoBK wurden weitere Kaliumkanäle in Mitochondrien identifiziert. Dazu gehören IK-Kanäle, SK-Kanäle, TASK-3 sowie spannungsabhängige ( $\text{K}_v$ ) und ATP-abhängige  $\text{K}^+$ -Kanäle (mito $\text{K}_{\text{ATP}}$ ). Der

$K_{ATP}$ -Kanal wurde neben seiner mitochondrialen Lokalisation auch im Sarkolemm der Kardiomyozyte exprimiert und eine Reihe von Studien postulieren für den mito $K_{ATP}$  einen protektiven Einfluss bei Ischämie und Reperfusion<sup>115,116</sup>. Der genaue Mechanismus der mitoBK-vermittelten ischämischen Kardioprotektion ist noch unbekannt, jedoch postulieren aktuelle Studien mögliche Mechanismen. So wird eine BK-abhängige Reduktion der mitochondrialen Calciumüberladung, eine Reduktion der ROS-Produktion, die Modulation des mitochondrialen Matrixvolumens und eine vorteilhafte Modulation der mitochondrialen Atmungskette angenommen<sup>271,272,275</sup>. Die Aktivierung des mitoBK- und mito $K_{ATP}$ -Kanals führt zu einem  $K^+$ -Einstrom aus dem Cytosol bzw. dem IM in die Mitochondriummatrix, was zu einer partiellen Depolarisation des inneren Membranpotentials führt<sup>289</sup>. Dadurch wird die elektrochemische Triebkraft für den  $Ca^{2+}$ -Einstrom bei Ischämie und insbesondere bei der Reperfusion reduziert und somit die  $Ca^{2+}$ -Überladung gehemmt<sup>290,291</sup>. Es wurde bereits gezeigt, dass der BK-Kanal Öffner NS1619, verabreicht vor Ischämie in isolierten perfundierten Meerschweinchenherzen, die mitochondriale Calciumüberladung nach Ischämie reduziert<sup>292</sup>. Darüber hinaus wird eine mitoBK-vermittelte Reduktion von ROS diskutiert. ROS wird, wie bereits in Abschnitt 1.3.2 geschildert, vermehrt während der Hypoxie und während der frühen Reperfusion erzeugt, was zu einer oxidations-abhängigen Beschädigung verschiedener Proteine, einer ineffizienten ATP-Produktion und zu einer erhöhten mPTP-Öffnung führt. Mehrere Studien haben gezeigt, dass die pharmakologische Modulation und Aktivierung mitochondrialer  $K^+$ -Kanäle zu einer signifikanten Reduktion der ROS-Bildung führen kann (siehe auch Abschnitt 1.3.2). In isolierten Kardiomyozyten von globalen BK-KO Tieren konnten erhöhte ROS-Spiegel nach Anoxie-Reoxygenierung nachgewiesen werden<sup>271</sup>. Eine Aktivierung des mitoBKs könnte die ROS-Bildung nach Ischämie/Reperfusion somit begrenzen. Es wird angenommen, dass die hohe  $K^+$ -Konzentration sowie die Depolarisation der Mitochondrien dem Protonenstrom entgegenwirken und es somit zu einer leichten Entkopplung der ETC kommt, was zur ROS-Produktion führt<sup>292,293</sup>. Dieses limitiert ansteigende ROS scheint die PKC $\epsilon$ -Aktivierung zu begünstigen und somit die mPTP-Öffnung zu verhindern<sup>116</sup>. Jüngste Studien zeigen, dass mitoBK die mitochondriale Energieproduktion verbessert, wahrscheinlich durch Schwellung der mitochondrialen Matrix<sup>294</sup>. Eine globale BK-Deletion führte außerdem in ventrikulären Muskelfasern zur Beeinträchtigung im Energiestoffwechsel durch eine reduzierte Kapazität der OXPHOS<sup>271</sup>. Darüber hinaus haben mehrere Gruppen eine erhöhte Atmung nach Aktivierung des mitoBK-Kanals durch die BK-Kanalöffner NS1619 und NS11021 beobachtet<sup>294,295</sup>.

Neueste Studien deuten darauf hin, dass die durch cGMP-Erhöhung induzierte Kardioprotektion bei Ischämie/Reperfusion bzw. Hypoxie/Reoxygenierung zu den vorgeschalteten Signalelementen des mitoBKs gehören könnte. In anderen Zelltypen konnte bereits eine direkte Stimulation der plasmamembranständigen BK-Kanäle über den NO/cGMP/cGKI-Signalweg bestätigt werden<sup>196,296</sup>. Bisher wurden drei Serinreste am C-Terminus der  $\alpha$ -Untereinheit identifiziert, die von der cGKI direkt phosphoryliert werden<sup>297</sup>. Jedoch ist noch unklar, wie und ob die Kardioprotektion durch die cytosolische cGKI über die OMM zum mitoBK in der IMM vermittelt wird.

### 1.7.5 Pharmakologische Modulation des BK-Kanals

Es wurden inzwischen viele verschiedene chemische Strukturen gefunden, um die Aktivität von BK-Kanälen zu erhöhen. Sie weisen z.B. Unterschiede in der Calciumabhängigkeit und der Bindestellen am Kanal auf. Basierend auf ihrem Ursprung und ihrer Struktur können die Modulatoren des BK-Kanals eingestuft werden in endogene BK-Kanalmodulatoren, natürlich vorkommende BK-Kanalöffner sowie synthetische BK-Kanalöffner und dessen strukturelle Analoga.

Endogene Chemikalien wie Arachidonsäure und die Metabolite von Cytochrom P450, Epoxygenase und Lipxygenase haben gezeigt, dass sie die BK-Kanalaktivität erhöhen und wichtige Regulatoren des vaskulären Tons sind. Ebenso wurde festgestellt, dass auch andere ungesättigte freie Fettsäuren wie die Omega-3-Docosahexaensäure die BK-Kanalaktivität in einer  $\beta$ -Untereinheit-abhängigen Weise erhöhen<sup>298,299</sup>. Eine direkte Aktivierung von BK-Kanälen durch das Sexualhormon  $17\beta$ -Estradiol wurde ebenfalls berichtet, wobei seine Wirkung von der Gegenwart der  $\beta_1$ -Untereinheit abhängt<sup>300</sup>. Es wurde unter anderem gezeigt, dass  $17\beta$ -Estradiol isolierte Kardiomyozyten vor einem Hypoxie-induzierten Reperfusionsschaden über einen möglichen mitoBK-Effekt schützen, was die Autoren dazu veranlasste über einen möglichen Beitrag zur erhöhten Inzidenz eines postmenopausalen Herzinfarkts zu spekulieren<sup>278</sup>. Eine Fülle von synthetischen BK-Kanal-Aktivatoren, die in der Lage sind die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals zu erhöhen, wurden von einer Reihe von Unternehmen synthetisiert. NS004 von der Firma NeuroSearch gehörte dabei zu einem der ersten BK-Kanalaktivatoren<sup>301</sup>. Später wurde ein weiteres Benzimidazol – NS1619 und ein Biaryl-thioharnstoff – NS11021<sup>302</sup> eingeführt, die beide große Bekanntheit erlangt haben und für zahlreiche Untersuchungen eingesetzt werden. NS1619 wurde der am meist verwendete BK-Kanalaktivator, um die funktionelle Wirkung von BK-Kanälen zu untersuchen. Sein therapeutisches Potential wurde unter anderem genutzt, um die Beteiligung bei glatten Muskelstörungen wie pulmonaler Hypertonie<sup>303</sup>, erektile Dysfunktion<sup>304</sup>, entzündliche Schmerzen<sup>305</sup> und Zytoprotektion<sup>275,306</sup> zu untersuchen. Auch die kardioprotektive Wirkung des BK-Kanals wurde in früheren Studien sowohl mit NS1619 als auch mit NS11021 bereits untersucht. Für beide Substanzen wurden mitoBK-aktivierende Eigenschaften dokumentiert. Es wird postuliert, dass NS1619 seinen Effekt an einer Linkerregion zwischen dem S6-Segment und der RCK übermittelt<sup>307</sup>, wodurch die Konformationsänderungen im RCK durch die Bindung von Calcium zum Öffnen des Kanals übertragen wird<sup>308</sup>. Es wurde gezeigt, dass NS1619, wenn es vor der Hypoxie verabreicht wurde, isolierte perfundierte Kaninchenherzen vor Hypoxie-Reperfusionsschaden schützt und dass dieser Effekt durch gleichzeitige BK-Kanalblockade mit Paxillin aufgehoben wurde<sup>275</sup>. Nachfolgende Studien haben bestätigt, dass die Verabreichung von NS1619 das Herz vor Ischämie-Reperfusionsschaden sowohl bei Mäusen<sup>309</sup>, Ratten<sup>310,311</sup> und Kaninchen<sup>312</sup> schützt. Die Verwendung von NS1619 wird jedoch durch ein relativ schlechtes therapeutisches Potential eingeschränkt, da NS1619 bei höheren Konzentrationen direkt L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in ventrikulären Myozyten aus Ratten<sup>313</sup>,  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Chloridströme<sup>314</sup> und spannungsaktivierte  $\text{Ca}^{2+}$ -,  $\text{K}^+$ - und  $\text{Na}^+$ -Kanäle<sup>302,315</sup> inhibiert. Darüber hinaus haben Cancherini und seine Mitarbeiter postuliert, dass NS1619 auch nicht-BK-Kanal abhängige kardioprotektive Effekte vermittelt<sup>316</sup>. NS11021 wirkt selektiver und potenter als NS1619 und wirkt durch Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierungskurve des Kanals hin zu einem negativeren Potential, was in einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit resultiert<sup>317</sup>. Auch für NS11021 wurden kardioprotektive Wirkungen gefunden. Es wurde gezeigt, dass es *ex vivo* Infarktgrößen reduziert und die Herzleistung

nach Ischämie erhöht, die mitochondriale Atmung wurde verbessert und auch isolierte Kardiomyozyten wurden vor einem Reperfusionsschaden geschützt<sup>289,318,319</sup>. Eine Studie, die den kardioprotektiven Aktivator NS11021 verwendete, stellte fest, dass dieser in einer nanomolaren Konzentration positive Effekte auf Mitochondrien zeigte, wohingegen bei der Erhöhung der Konzentration unspezifische Effekte, die nicht mit mitochondrialen BK-Kanälen zusammenhängen, beobachtet wurden<sup>294</sup>. Ein weiterer potenter BK-Aktivator ist das Polyphenol Rottlerin (auch bekannt als Mallotoxin), welches erst kürzlich entdeckt worden ist. Rottlerin kann die spannungsabhängige Aktivierung des Kanals (um ~70 mV) verschieben und ist in submikromolaren Konzentrationen wirksam<sup>320</sup>. Dabei ist es jedoch unwirksam, wenn die  $\gamma$ -Untereinheit LRRC 26 mit dem Kanal assoziiert ist<sup>321</sup>. Der am häufigsten verwendete Inhibitor ist Paxillin. Es wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass Paxillin die kardioprotektive Wirkung sowohl von NS1619<sup>275</sup> als auch von NS11021<sup>317</sup> antagonisiert. Jedoch wurde auch gezeigt, dass Paxillin in höheren Konzentrationen die SERCA hemmt<sup>322-324</sup>.

Zusammenfassend lässt sich der mitoBK-Kanal durch verschiedene pharmakologische Öffner und Blocker modulieren. Die jüngsten Erkenntnisse mit gentechnisch veränderten Modellen implizieren, dass der mitoBK-Kanal für die Kardioprotektion bei Ischämie/Reperfusion bzw. Hypoxie/Reoxygenierung und die mitochondriale Bioenergetik wichtig ist.

## 1.8 Zielsetzung

Eine kontinuierliche Kontraktilität der Kardiomyozyten ist essentiell um die kardiale Funktion aufrecht zu erhalten. Die dafür benötigte Energie in Form von ATP wird in Mitochondrien mit Hilfe der Elektronentransportkette (ETC) produziert. Bei einem akuten Myokardinfarkt kommt es zu gravierenden zellulären Veränderungen und zum Erliegen wichtiger metabolischer Prozesse, einschließlich der mitochondrialen ATP-Produktion. Die Therapieoptionen des akuten Myokardinfarkts sind begrenzt. Bisher gelten die schnellstmögliche Wiedereröffnung des verschlossenen Koronargefäßes (Reperfusion) und die gleichzeitige antithrombotische Therapie als einzige Möglichkeit, das Herz vor dem sich ausbreitenden Ischämieschaden zu schützen. Die mit der Wiedereröffnung der zuvor verschlossenen Gefäße einhergehende Reperfusion führt jedoch ihrerseits zu weiterem Untergang von funktionalem Myokard (Reperfusionsschaden). Dieser Reperfusionsschaden beruht primär auf einer enormen ROS-Bildung und Calciumüberladung der Mitochondrien, was letztlich zu apoptotischem und nekrotischem Zelltod führt<sup>325</sup>. Der NO/cGMP/cGKI-Signalweg scheint bei der Reduktion des Ischämie- und Reperfusionsschadens eine bedeutende Rolle zu spielen<sup>115,218,219</sup>. Aktuelle *in vitro* und neueste *in vivo* Untersuchungen postulieren mitochondriale K<sup>+</sup>-Kanäle in der inneren Mitochondrienmembran als mögliche Endeffektoren der cGMP-vermittelten Kardioprotektion in Kardiomyozyten<sup>116,271,275,290</sup>. Eine Öffnung des mitoK<sub>ATP</sub>-Kanals und/oder des mitoBK-Kanals, könnte sich möglicherweise über eine Entkopplung der ETC limitierend auf die Ca<sup>2+</sup>-Überladung und ROS-Bildung der Mitochondrien und somit limitierend auf den Zelltod der Kardiomyozyten auswirken<sup>218</sup>. Da bisherige Studien primär auf der pharmakologischen Modulation des mitoK<sub>ATP</sub> und mitoBK basieren sind die beteiligten Zelltypen, die genaue Signalübertragung sowie die Rolle der endogenen K<sup>+</sup>-Kanäle für die mitochondriale Bioenergetik sowie das zelluläre Überleben bei Hypoxie und Reoxygenierung weitgehend unklar und von großem Interesse. Daher war ein zentrales Ziel der vorliegenden Arbeit zunächst die immer noch umstrittene mitochondriale Lokalisation des mitochondrialen BK-Kanals zu bestätigen und ausgehend von diesen Untersuchungen die zytoprotektiven Eigenschaften des mitoBKs in Kardiomyozyten *in vitro* zu analysieren. Darüber hinaus sollten im Rahmen dieser Arbeit mögliche Interaktionen des mitoBKs mit dem cGMP/cGKI-Signalweg in Kardiomyozyten und der ETC charakterisiert werden. Letztlich sollte überprüft werden inwiefern eine Deletion des BK-Kanals Einfluss auf die ETC, das Überleben von isolierten Kardiomyozyten sowie die Expression und/oder Funktion wichtiger pro-*survival* Kinasen bei *in vitro* Hypoxie-Reoxygenierung hat. Hierfür wurden erstmals Kardiomyozyten und Mitochondrien aus globalen und Kardiomyozyten-spezifischen BK-Kanal defizienten Mäusen und deren Wurfgeschwisterkontrollen untersucht. Um die entsprechenden Zusammenhänge und Signalwege zu erfassen wurden cGMP-erhöhende Substanzen und direkte BK-Kanalmodulatoren eingesetzt.

Ein weiterer Fokus dieser Arbeit lag in der Etablierung und Charakterisierung der adenoviralen Transduktion von adulten Kardiomyozyten. Da die Änderungen der cGMP-Konzentration sowohl *in vitro* als auch *in vivo* von großem Interesse sind, wurde eine Methode zur adenoviralen Transduktion entwickelt, um letztlich cGMP in lebenden Kardiomyozyten bzw. Mitochondrien zu visualisieren. Hierfür wurde ein genetisch codierter Biosensor für cGMP verwendet, der die Fluoreszenz-Resonanz-Energieübertragung (FRET) nutzt. Der sogenannte cGi500-Sensor erlaubt mit Hilfe von FRET in lebenden Zellen eine Echtzeitmessung und kinetisch detaillierte Analyse der

kompartimentierten Signalübertragung von cGMP<sup>326,327</sup>. Die adenovirale Transduktion stellt hierbei eine effiziente und stabile Genübertragung auf isolierte adulte Kardiomyozyten dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde im Unterschied zu bereits publizierten Sensoren erstmals ein cGi500-Sensor welcher an die Cytochrom-C-Oxidase getagged ist, verwendet. Durch diesen Protein-Tagg sollte sich der adenovirale exprimierte Sensor in den Mitochondrien anreichern.

## 2 Material

### 2.1 Geräte und Software

#### 2.1.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung, Hersteller
Absauganlage (Zellkultur)	Membran-Vakuumpumpe, Laboport
Amersham Imager 600	65930332, GE Healthcare
Analysenwaagen	GR-202, A&D Instruments
	VWR-124, Sartorius
	VWR-124, Sartorius
Autoklaven	VX-55, Systec
	VX-120, Systec
	CB 053, Binder
CO <sub>2</sub> -Inkubator mit O <sub>2</sub> Regelung	CB 150, Binder
CO <sub>2</sub> -Inkubator	EttanDige Imager, GE Healthcare
Detektionssystem (Western Blot)	KF 35, Wessamat
Eismaschine	30034507, Scie-Plas
Elektrodenplatten (Western Blot)	Sub-cell, BioRad
Elektrophoresekammer (Genotypisierung)	Mini Protean <sup>®</sup> Tetra System, BioRad
Elektrophoresekammer (Western Blot)	Axiomager Z1, Zeiss
Fluoreszenzmikroskop	BioDoc Analyze, Biometra
Geldokumentationsgerät	Polytron PT 1200E, Kinematic
Gewebehomogenisator	TT57.1, Roth
Glas/Teflon Potter-Elvehjem (2cm <sup>3</sup> )	705N, Hamilton
Hamilton Spritze SYR 50µl	Thermomixer Compact, Eppendorf
Heizblock	Amersham pharmacia biotech
Inkubator	micro 200R, Hettich
Kühlzentrifuge	HSE-Harvard apparatus, Sachs Electronics
Langendorff-Perfusionsanlage	50383, Heidolph
Magnetische Heizplatte	Digitaler Schieblehre, Mitutoyo
Messschieber (Tibiavermessung)	Axiovert 200, Zeiss
Mikroskop (Histologie)	DMi1 LED, Leica Microsystems
Mikroskop (Zellkultur)	Infinite F200 PRO, Tecan
Mikrotiterplatten-Photometer (ELISA-Reader)	MWG 800 FiF
Mikrowelle	Luftstromschränke Uniprotect, Bioscape
Mobile Tierhaltungssysteme	Handy StepS, Brand
Multipipette	Mastercycler, Eppendorf
PCR Maschinen	MastercyclerGradient, Eppendorf
	PH-Meter 761 Calimatic, Knick
pH-Meter	Nanophotometer, Implen
Photometer (Bradford)	FST
Pinzetten, Präparierschere	Pipetman, Gilson
Pipetten (10, 20, 200, 1000µl)	

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung, Hersteller</b>
Pipettierhilfe	Accu-jet pro, Brand
Pumpenschläuche	Ismatec
Reagenzglasrotator	3025, GFL
Reinstwasseraufbereitungsanlagen	Milli-Q Biocell, Millipore Purelab flex, Elga
Rotor Kühlzentrifugen	1195-A, Hettich 1016, Hettich
Schlauchpumpe (Kardiomyozytenisolation)	REGLO digital, Ismatec
Schüttler	Unimax 1010, Heidolph
Stereolupe (Organentnahme und -präparation)	EZ5, Leica
Sterilwerkbank	Safe 2020, Thermo Scientific
Strom/Spannungsquellen	EV 231, Consort Standard Power Pack P25, Biometra
Taschenwaage	LS2000H, G&G
Ultrazentrifuge	SS34 RCSC plus, Sorvall
Vortexer	Vortex Genie 2, Bender & Hobein AG
Wasserbad mit Thermostat (Atmungsmessung)	A10/SC100, Thermo Haake
Wasserbad mit Thermostat (Organentnahme)	K10/C10, Thermo Haake
Wasserbad (Zellkultur)	TW 20, Julabo
Zentrifugen	Micro 220, Hettich Micro 220R, Hettich

### 2.1.2 Software

<b>Software</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Hersteller</b>
Axio Vision Rel 4.8	Histologie	Zeiss
Amerham Imager 600	Scan Software Western-Blot	GE-Healthcare
CorelDRAW X8	Grafik Programm für Abbildungen	Corel Coperation
EttanDige Imager 1.0	Scan Software Western-Blot	GE-Healthcare
ImageQuant TL 7.0	Quantifizierung Western-Blot	GE-Healthcare
Magellan 7	Messung und Auswertung Enzym-Assays	Tecan
Microsoft Office	Routine-Arbeiten	Microsoft
O2view	Aufnahme und Auswertung mitochondrialer respiratorischer Messungen	Hansatech Instruments

## 2.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Bestellnummer	Hersteller
Deckgläser (Ø 12 mm)	613-1577	VWR
24-Well-Mikrotiterplatten	3524	Corning
96-Well-Mikrotiterplatten	3599	Corning
Einmalspritze Injekt, 2ml	2057895	B.Braun
Einmalspritze, 1ml	7250415	BD Plastipak
Einmal-Untersuchungs- und Schutzhandschuhe	6104114	Abena
Eppendorf-Reaktionsgefäß (1,5 ml)	0030 12.0.086	Eppendorf
Eppendorf-Reaktionsgefäß (2 ml)	72.695.500	Sarstedt
Kanülen (25G; 0,5 x 16 mm)	4658302	B. Braun
Küvetten	10001387	Sarstedt
Magnetstäbchen (15-50 mm)	C267.1	Carl Roth
Objektträger SuperFrost (76 x 26 mm)	1879.1	Carl Roth
Parafilm M	PM-9969	Carl Roth
PCR Tubes (500 µl)	30.124.537	Eppendorf
Petrischalen (8 cm <sup>2</sup> )	430165	Corning
Petrischalen (unsteril)	821.473.001	Sarstedt
Pipettenspitzen (10 µl)	701.116	Sarstedt
Pipettenspitzen (1000 µl)	70.762.010	Sarstedt
Pipettenspitzen (20 - 200 µl)	70.760.012	Sarstedt
Präzisionswischtücher	AA64.1	Kimberly-Clark
Rotilabo-Blottingpapiere, Dicke 0,35 mm	CL67.1	Carl Roth
Rotilabo-Spritzenfilter PVDF	P666.1	Carl Roth
Sterilfilter Nalgene 0,2 µM (150 ml)	150-0020	Thermo Scientific
Sterilfilter Nalgene 0,2 µM (500 ml)	151-4020	Thermo Scientific
Stripetten (2 ml)	4486	Corning
Stripetten (5 ml)	4487	Corning
Stripetten (10 ml)	4488	Corning
Stripetten (25 ml)	4489	Corning
Stripetten (50 ml)	4490	Corning
Vakuumfiltrationseinheit (Filtropur BT25, 250 ml)	831822	Sarstedt
Wägeschalen (41x41x8 mm)	1878.2	Carl Roth
Wägeschalen (89x89x25 mm)	1884.1	Carl Roth
Zellkulturflasche (25 cm <sup>2</sup> )	436039	Corning
Zellkulturschalen	430167	Corning
Zentrifugenröhrchen (15 ml)	430766	Corning
Zentrifugenröhrchen (50 ml, freistehend)	430897	Corning

## 2.3 Substanzen, Lösungen und Puffer

Sofern nicht anders angegeben, wurde zur Herstellung von Lösungen und Puffern autoklaviertes, demineralisiertes Milli-Q Wasser (dH<sub>2</sub>O) verwendet. Alle gängigen Standardchemikalien wurden, sofern nicht anders gekennzeichnet von Carl Roth oder Sigma-Aldrich bezogen und entsprachen dem höchsten Reinheitsgrad für molekularbiologische Analysen.

### 2.3.1 Genotypisierung

#### Kit zur DNA-Isolation und PCR

##### **KAPA Mouse Genotyping Kit (HotStart)**

KK7352, peqlab  
 KAPA Express Extract Enzyme (1 U/μL)  
 KAPA Express Extract Buffer (10X)  
 KAPA2G Fast HotStart Genotyping Mix with dye (10X)

#### Primer

Mauslinie		Primersequenz (5' → 3')
BK	F1	TGGTCTTCTTCATCCTCGGG
	F2	AAGGGCCATTTTGAAGACGTC
	R	CCAGCAACAGTGTTTGTGG
Myh6-Cre <sup>Tg/+</sup>	F <sub>Tg</sub>	ATGACAGACAGATCCCTCCTATCTCC
	R <sub>Tg</sub>	CTCATCATCCGTTGCATCATCGAC
	F <sub>Ctrl</sub>	CAAATGTTGCTTGTCTGGTG
	R <sub>Ctrl</sub>	GTCAGTCGAGTGCACAGTTT

→ Die Oligonukleotid-Lyophilisate wurden in deionisiertem, autoklaviertem Wasser gelöst und auf eine Zielkonzentration von 20 μM eingestellt

#### Agarose-Gelelektrophorese

##### **0,5 M EDTA pH 8,0**

EDTA 186,1 g  
 dH<sub>2</sub>O ad 1000 ml

→ pH-Wert mit NaOH auf 8,0 einstellen

##### **Bromphenolblau-Lösung**

Bromphenolblau 110 mg  
 dH<sub>2</sub>O 2 ml

##### **10x TBE-Puffer**

Tris 108 g  
 Borsäure 55 g  
 EDTA (0,5 M; pH 8,0) 40 ml  
 dH<sub>2</sub>O ad 1000 ml

**1x TBE-Puffer:** 1:10 Verdünnung des 10x TBE-Puffers

##### **6x Ladepuffer**

Ficoll<sup>®</sup> 400 9 g  
 EDTA (0,5 M; pH 8,0) 12 ml  
 10x TBE Puffer 30 ml  
 Xylencyanol-Lösung 1,5 ml  
 Bromphenolblau-Lösung 1,5 ml  
 dH<sub>2</sub>O ad 50 ml

<b>DNA-Längenstandard</b>	
2-Log DNA Ladder	10 µl
6x Ladepuffer	20 µl
dH <sub>2</sub> O	90 µl

<b>Agarosegel (2%)</b>	
Agarose	2 g
1 x TBE-Puffer	100 ml
Ethidiumbromid	10 µl

### 2.3.2 Organentnahme und Kardiomyozytenisolation

#### Präparierbesteck zur Organentnahme

<b>Material/Substanz/Lösung</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Federschere	15012-12	FST
Pinzette, fein, 45° Abgewinkelt	11253-25	FST
Pinzette, fein, gerade	11253-20	FST
Pinzette, gezahnt, gebogen	11151-10	FST
Schere	14058-11	FST

#### Material und Ausgangssubstanzen zur Kardiomyozytenisolation und Kultivierung

<b>Material/Substanz/Lösung</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Bezugsquelle</b>
2,3-Butandion-Monoxim (BDM)	B0753	Sigma-Aldrich
8-Br-cGMP	B 004-50E	BioLog
Ampuwa <sup>®</sup>	PZN 7610894	Fresenius Kabi
Becherglas (5 ml)	-	SIMAX
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	S5886	Sigma-Aldrich
Cinaciguat (BAY58-2667)	HY14181	MedChem Express
CM-Fetales Kälberserum (FCS)	10099141	Life Technologies
D-(+)-Glucose	G7528	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	D 8418	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O)	30412	Sigma-Aldrich
Einmalspritze, 1ml	7250415	BD Plastipak
Heparin	PZN 3170642	Ratiopharm
HEPES	H3375	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid (KCl)	P5405	Sigma-Aldrich
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO <sub>3</sub> )	60339	Sigma-Aldrich
Kaliumphosphat, monobasisch (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	5655	Sigma-Aldrich
Kanülen (25G; 0,5 x16 mm)	4658302	B.Braun
Collagenase Typ II (337 U/ml)	4176	Cell Systems
Laminin	354232	BD Bioscience
L-Glutamin 200 mM (10x)	25030-024	Life Technologies
Liberase DH Research Grade	05401089001	Roche
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O)	63138	Sigma-Aldrich
Minimal Essential Medium (MEM)	21575-022	Life Technologies
Natriumchlorid (NaCl)	S5886	Sigma-Aldrich

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Bezugsquelle
Natriumchlorid-Lösung (steril 0,9%)	PZN 2159621	Fresenius Kabi
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> ) NS11021	S5761 SML0322	Sigma-Aldrich
PBS-Lösung	14190094	Life Technologies
Penicillin G	3032-1MU	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	15140122	Life Technologies
Perma-Hand Seide (5/0)	K880H	Ethicon
Phenolrot	P5530	Sigma-Aldrich
Rinderserumalbumin (BSA)	A8806	Sigma-Aldrich
Sterilfilter (Nalgene 0,2 µm, 150 ml)	10762732	Thermo Scientific
Sterilfilter (Nalgene 0,2 µm, 500 ml)	10578471	Thermo Scientific
Taurin	T0625	Sigma-Aldrich
Trypsin 2,5% (10x)	15090046	Life Technologies
Zellsieb (100 µm Maschenweite)	352360	BD Bioscience

### Pufferlösungen zur Kardiomyozytenisolation

Perfusionspuffer (Stammlösung)	
NaCl	13,2 g
KCl	700 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	164 mg
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	214 mg
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	600 mg
Phenolrot	24 mg
NaHCO <sub>3</sub>	2,02 g
KHCO <sub>3</sub>	2,02 g
HEPES	4,77 g
Taurin	7,5 g
dH <sub>2</sub> O	ad 2000 ml
→ steril filtrieren	

Stopp-Puffer I	
Perfusionspuffer pH 7,46	2,25 ml
CaCl <sub>2</sub> (100 mM)	1,25 µl
FCS	250 µl

Liberase DH-Lösung	
Liberase DH	50 mg
Ampuwa <sup>®</sup>	12 ml
→ 400 µl Aliquots bei -20°C lagern	

Perfusionspuffer pH 7,46	
Perfusionspuffer (Stammlösung)	1960 ml
BDM (500 mM)	40 ml
Glucose	2 g
→ pH-Wert auf 7,46 einstellen und steril filtrieren	

Verdaupuffer	
Perfusionspuffer pH 7,46	22,5 ml
CaCl <sub>2</sub> (100 mM)	2,8 µl
Trypsin 2,5 % (10x)	150 µl

Stopp-Puffer II	
Perfusionspuffer pH 7,46	9,5 ml
CaCl <sub>2</sub> (100 mM)	3,75 µl
FCS	500 µl

Laminin-Lösung (10 µg/ml)	
Laminin (2 mg/ml)	50 µl
PBS (steril)	9,95 µl
→ immer frisch herzustellen	

<b>BDM (500 mM)</b>	
BDM	2,52 g
dH <sub>2</sub> O	ad 50 ml

<b>BSA (100 mg/ml)</b>	
BSA	5 g
dH <sub>2</sub> O	ad 50 ml

<b>Penicillin (10000 U/ml)</b>	
Penicillin G	1 MU
PBS	100 ml

<b>CaCl<sub>2</sub>-Lösung (100 mM)</b>	
CaCl <sub>2</sub>	147 mg
dH <sub>2</sub> O	ad 10 ml

**10 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung:** 1:10 Verdünnung der 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung

### DNA-Isolation aus Kardiomyozyten und Geweben

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Bezugsquelle
10x Taq-Puffer	11435094001	Roche
dNTPs (Nukleotide)	K039.1	Carl Roth
Ethanol (100%)	32205	Sigma-Aldrich
High Pure PCR Preparation Kit	11796828001	Roche
Isopropanol	6752.3	Carl Roth
Taq DNA-Polymerase	11435094001	Roche

### 2.3.3 Hypoxie-Reoxygenierung isolierter Kardiomyozyten

#### Versuchsspezifische Zellkulturmedien

<b>Aussaatmedium NH</b>	
Zellkulturmedium N pH 7,5	10 ml
BDM (500 mM)	200 µl
Penicillin (10000 U/ml)	100 µl
→ über Nacht im Brutschrank inkubieren	

<b>Zellkulturmedium N</b>	
NaCl	198 mg
KCl	10,51 mg
HEPES	71,5 mg
Taurine	113 mg
CaCl <sub>2</sub> anhydrous	33,3 mg
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	8,87 mg
FCS	1,5 ml
D-Glucose	29,7 mg
Pen/Strep	300 µl
dH <sub>2</sub> O	ad 30 ml
→ pH-Wert auf 7,4 einstellen	
→ über Nacht im Brutschrank inkubieren	

<b>Zellkulturmedium H</b>	
NaCl	198 mg
KCl	10,51 mg
HEPES	71,5 mg
Taurine	113 mg
CaCl <sub>2</sub> anhydrous	33,3 mg
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	8,87 mg
Pen/Strep	1,5 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 30 ml
→ pH-Wert auf 7,4 einstellen	
→ über Nacht im Brutschrank inkubieren	

**Stammlösungen der pharmakologischen Substanzen**

<b>NS11021 (30 mM)</b>	
NS-11021	5 mg
DMSO	326 µl
→ 10 µl Aliquots bei -20°C lagern	

<b>NS11021 (300 µM)</b>	
NS-11021 (30 mM)	100 µl
DMSO	ad 10 ml
→ 10 µl Aliquots bei -20°C lagern	

**NS-11021 (30µM):** 1:10 Verdünnung der 300µM NS-11021

<b>Cinaciguat (1 mg/ml)</b>	
Cinaciguat	0,5 mg
DMSO	500 µl
→ Bei -20°C lagern	

<b>Cinaciguat (50 µM)</b>	
Cinaciguat (1 mg/ml)	56,6 µl
DMSO	ad 2 ml
→ Bei -20°C lagern	

**Zellkulturmedien für Stimulationsexperimente**

<b>8-Br-cGMP (100 µM)</b>	
8-Br-cGMP (100 mM)	10 µl
Zellkulturmedium N/H	10 ml

<b>Cinaciguat (25 nM)</b>	
Cinaciguat (50 µM)	5 µl
Zellkulturmedium N/H	10 ml

<b>NS11021 (30 nM)</b>	
NS11021 (30 µM)	10 µl
Zellkulturmedium N/H	10 ml

<b>DMSO 0,1%</b>	
DMSO	10 µl
Zellkulturmedium N/H	10 ml

<b>NS11021 (300 nM)</b>	
NS11021 (300 µM)	10 µl
Zellkulturmedium N/H	10 ml

<b>DMSO 0,01%</b>	
DMSO (0,1%)	100 µl
Zellkulturmedium N/H	ad 100 µl

**2.3.4 Bestimmung der LDH-Aktivität****Verwendetes Kit**

<b>CytoTox 96<sup>®</sup> Non-Radioactive Cytotoxicity Assay</b>	
G1780, Promega	
<i>Bestandteile des Kits:</i>	<i>Beschreibung:</i>
Probenpuffer	
Substratmix	In 12 ml Probenpuffer lösen
LDH-Positiv Kontrolle	Verdünnungsreihe: 1600 U/ml - 25 U/ml
Lyse Lösung (10x)	9% (v/v) Triton <sup>®</sup> X-100
Stopp Lösung	1 M Essigsäure

### 2.3.5 Colorimetrische Messung der Caspase-3-Aktivität

#### Verwendetes Kit

<b>Caspase-3 Colorimetric Assay Kit</b>	
BF3100, R&D Systems	
<i>Bestandteile des Kits:</i>	<i>Beschreibung:</i>
DEVD-pNA Substrat (4 mM)	DEVD Substrat konjugiert an p-Nitroanilin
DTT	Dithiothreitol (1 M)
Lyse Puffer	Zur Lyse der Proben
Reaktionspuffer 3	Zugabe von 10 µl DTT pro 1 ml Reaktionspuffer 3 kurz vor Zugabe
Verdünnungspuffer	Zur Verdünnung der Proben

### 2.3.6 Isolation von Mitochondrien

#### Versuchsspezifische Materialien und Lösungen

<b>Material/Substanz/Lösung</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Aceton	9372.4	Carl Roth
Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA)	E3889	Sigma-Aldrich
Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (EDTA)	ED2SS	Sigma-Aldrich
Glas/Teflon Potter-Elvehjem (2cm <sup>3</sup> )	TT57.1	Carl Roth
Kaliumchlorid (KCl)	P5405	Sigma-Aldrich
Nanophotometer	P330	Implen
Proteaseinhibitor (cOmplete Mini, EDTA-frei)	11836170001	Roche
Rinderserumalbumin (BSA)	A8806	Sigma-Aldrich
Saccharose	4621.2	Carl Roth
Trichloressigsäure	8789.2	Carl Roth
Tris	5429.3	Carl Roth
Trypsin 0,5% (10x)	15400054	Life Technologies

#### Lösungen und Puffer zur Isolation von Mitochondrien

<b>1 M Saccharose</b>	
Saccharose	17,12 g
dH <sub>2</sub> O	ad 50 ml
→ steril filtrieren	

<b>0,1 M EGTA</b>	
EGTA	1,91 g
dH <sub>2</sub> O	ad 50 ml
→ pH-Wert mit Tris auf 7,4 einstellen	

<b>1 M Tris-HCl</b>	
Tris	6,06 g
dH <sub>2</sub> O	ad 50 ml
→ pH-Wert mit HCl auf 7,4 einstellen	

<b>1 M KCl</b>	
KCl	3,73 g
dH <sub>2</sub> O	ad 50 ml

<b>10 mM EDTA in PBS</b>	
EDTA (0,5 M)	2 ml
PBS	ad 100 ml

<b>Isolationspuffer 1 (IPm 1)</b>	
Saccharose (1 M)	670 µl
Tris-HCl (1 M)	500 µl
KCl (1 M)	500 µl
EDTA (0,5 M)	200 µl
BSA (10%)	200 µl
Proteaseinhibitor	1 Tbl.
dH <sub>2</sub> O	ad 10 ml
→ pH-Wert auf 7,4 einstellen	

<b>0,5 M EDTA</b>	
EDTA	9,3 g
dH <sub>2</sub> O	ad 50 ml
→ pH-Wert mit Tris auf 7,4 einstellen	

<b>10% BSA</b>	
BSA	5 g
dH <sub>2</sub> O	ad 50 ml

<b>0,05% Trypsin-Lösung</b>	
Trypsin 0,5% (10x)	0,5 ml
EDTA in PBS (10 mM)	4,5 ml

<b>Isolationspuffer 2 (IPm 2)</b>	
Saccharose (1 M)	5 ml
EGTA (0,1 M)	600 µl
Tris-HCl (1 M)	200 µl
dH <sub>2</sub> O	ad 20 ml
→ pH-Wert auf 7,4 einstellen	

### 2.3.7 Respiratorische Messung isolierter Mitochondrien

#### Versuchsspezifische Materialien und Lösungen

<b>Material/Substanz/Lösung</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Adenosine 5'-diphosphate (ADP)	A2754	Sigma-Aldrich
Elektrode	S1	Hansatech Instruments
Elektroden Reinigungsset	S16	Hansatech Instruments
Elektrodenverbindungskabel	S1/ADL	Hansatech Instruments
Glutamat	G1251	Sigma-Aldrich
Hamilton-Spritze (50 µl)	705N SYR	Hamilton
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	3904.1	Carl Roth
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O)	A537.1	Carl Roth
Magnetrührer (PTFE-überzogen)	S2/P	Hansatech Instruments
Malat	M1000	Sigma-Aldrich
Membranapplikator	A2	Hansatech Instruments
Natriumdithionit (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> )	157953	Sigma-Aldrich
O-Ringe, verschiedene Größen	S7A	Hansatech Instruments
Oxygraph Elektrodenkontrollereinheit RS232	OGYG1	Hansatech Instruments

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Bezugsquelle
PTFE Membran (0,012 mm x 25 mm)	S4	Hansatech Instruments
Rotilab-Y-Stücke, pp, natur	E775.1	Carl Roth
Sauerstoffelektrodenkammer	DW1/AD	Hansatech Instruments
Spacer (Zigarettenpapier)	-	RIZLA
Succinat	S3674	Sigma-Aldrich
USB zu RS232-Konverter	Aten	Hansatech Instruments
Wasserschlauch (12 x 6 mm)	069112	Hozelock
Wattestäbchen	-	diverse

### Puffer und Lösungen zur respiratorischen Messung

0,5 M MgCl <sub>2</sub>	
MgCl <sub>2</sub>	5,09 g
dH <sub>2</sub> O	ad 50 ml

gesättigte KCl	
KCl	17,5 g
dH <sub>2</sub> O	ad 100 ml

1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,81 g
dH <sub>2</sub> O	ad 50 ml
→ pH-Wert mit Tris auf 7,4 einstellen	

10 mM ADP-Lösung	
ADP	4,7 mg
dH <sub>2</sub> O	1 ml
→ 20µl Aliquots bei -80°C lagern	

0,5 M Succinat-Lösung	
Succinat	3 g
dH <sub>2</sub> O	ad 50 ml
→ 20µl Aliquots bei -20°C lagern	

0,25 M Glutamat/0,125 M Malat-Lsg.	
Glutamat	9,2 g
Malat	4,2 g
dH <sub>2</sub> O	ad 250 ml
→ 20µl Aliquots bei -20°C lagern	

Puffer zur Atmungsmessung (Respirationsmedium, RM)	
Tris-HCl (1 M)	200 µl
MgCl <sub>2</sub> (0,5 M)	200 µl
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1 M)	40 µl
EGTA/Tris (0,1 M)	4 µl
Sachharose (1 M)	5 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 20 ml
→ pH-Wert mit KOH auf 7,4 einstellen	

**Pharmakologische Substanzen für Stimulationsexperimente**

<b>NS11021 (300 µM)</b>	
NS11021 (30 mM)	100 µl
Respirationsmedium	9,90 ml
→ 20 µl Aliquots bei -20°C lagern	

<b>DMSO 0,1%</b>	
DMSO	10 µl
Respirationsmedium	990 µl

<b>NS11021 (30 µM)</b>	
NS11021 (300 µM)	1 ml
Respirationsmedium	9 ml
→ 20 µl Aliquots bei -20°C lagern	

<b>DMSO 0,01%</b>	
DMSO 0,1%	100 µl
Respirationsmedium	900 µl

<b>8-Br-cGMP (1 mM)</b>	
8-Br-cGMP (100 mM)	20 µl
Respirationsmedium	ad 2 ml

**2.3.8 Proteinanalytik****Versuchsspezifische Materialien und Lösungen**

<b>Material/Substanz/Lösung</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Acrylamidlösung (RotiphoreseGel)	3029.2	Carl Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	9592.2	Carl Roth
Bromphenolblau	15375	Serva
Coomassie-Brilliant-Blue G250	3862.2	Carl Roth
Dithiothreitol (DTT)	6908.1	Carl Roth
EGTA	E3889	Sigma-Aldrich
Essigsäure (100%)	3738.5	Carl Roth
Filterpapiere (0,35 mm)	CL67.1	Carl Roth
Glycerin	3783.1	Carl Roth
Glycin	3908.3	Carl Roth
Hamilton-Spritze (zur Probenapplikation)	X035	Carl Roth
Immobilion-FL Transfer Membran (PVDF-Membran, Western-Blot)	IPFL00010	Merck Millipore
Immobilion-P Transfer Membran (PVDF-Membran, Western-Blot)	T831.1	Carl Roth
Isopropanol	6752.3	Carl Roth
Methanol	4627.5	Carl Roth
Milchpulver	T145.3	Carl Roth
MOPS	6979.4	Carl Roth
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	K305	Carl Roth
Natriumchlorid (NaCl)	3957.2	Carl Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	6367.2	Carl Roth
Phosphatase-Inhibitor Cocktail 2	P5726	Sigma-Aldrich

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Bezugsquelle
Phosphatase-Inhibitor Cocktail 3	P0044	Sigma-Aldrich
Phosphorsäure (85%)	6366.1	Carl Roth
Proteaseinhibitor (cOmplete Mini, EDTA-frei)	11836170001	Roche
Proteinase K	03115836001	Roche
Protein-Marker IV	27-2110	PeqLab
Rinderserumalbumin (BSA)	8076.2	Carl Roth
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	5136.2	Carl Roth
Sterilfilter	BT25	Sarstedt
Tetramethylethyldiamid (TEMED)	263.3	Carl Roth
Tris	5429.3	Carl Roth
Tween	20 9127.1	Carl Roth
UV-Küvetten	10001387	Sarstedt
$\beta$ -Mercaptoethanol	4227.1	Carl Roth
$\epsilon$ -Aminocaprinsäure	A2504	Sigma-Aldrich

### Proteingewinnung und Konzentrationsbestimmung nach Bradford

#### 1 M Tris-HCl pH 8,3

Tris	6,06 g
dH <sub>2</sub> O	ad 50 ml
→ pH-Wert mit HCl auf 8,3 einstellen	

#### 10% SDS

SDS	10 g
dH <sub>2</sub> O	ad 100 ml

#### 4x Laemmli

SDS	2,25 g
Tris	1,2 g
Glycin	20 ml
Bromphenolblau	6 mg
dH <sub>2</sub> O	ad 50 ml
→ pH-Wert auf 6,7 einstellen	

#### 200 mM PMSF

PMSF	34,84 mg
Ethanol (100%)	1 ml

#### 4x Laemmli mit DTT

4x Laemmli	1,5 ml
DTT (1 M)	75 $\mu$ l

#### SDS-Lysepuffer

SDS (10%)	670 $\mu$ l
Tris-HCl (1 M, pH 8,3 )	210 $\mu$ l
$\beta$ -Mercaptoethanol	170 $\mu$ l
PMSF (200 mM)	20 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	ad 10 ml

#### SDS-Lysepuffer P

SDS (10%)	670 $\mu$ l
Tris-HCl (1 M, pH 8,3 )	210 $\mu$ l
$\beta$ -Mercaptoethanol	170 $\mu$ l
PMSF (200 mM)	20 $\mu$ l
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	100 $\mu$ l
Phosphatase Inhibitor Cocktail 3	100 $\mu$ l
Proteaseinhibitor	1 Tbl.
dH <sub>2</sub> O	ad 10 ml

**Bradford-Lösung**

Coomassie Brilliant-Blue G250	200 mg
Phosphorsäure (85%)	200 ml
Ethanol (100%)	100 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 2000 ml

→ über Nacht rühren lassen

→ filtrieren und Lagerung im Dunkeln bei 4°C

**Proteinlokalisierung in Mitochondrien****100 mM MOPS**

MOPS	2,09 g
dH <sub>2</sub> O	ad 100 ml

→ pH-Wert mit KOH auf 7,2 einstellen

**Proteinase K (20 mg/ml)**

Proteinase K	25 mg
dH <sub>2</sub> O	1,25 ml

**SEM-Puffer**

Saccharose (1 M)	2,5 ml
EDTA (0,5 M)	20 µl
MOPS (100 mM)	1 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 10 ml

**SDS-Gelelektrophorese****1,8 M Tris-HCl pH 8,8**

Tris	10,9 g
dH <sub>2</sub> O	ad 50 ml

→ pH-Wert auf 8,8 einstellen

**0,6 M Tris-HCl pH 6,8**

Tris	5,45 g
dH <sub>2</sub> O	ad 50 ml

→ pH-Wert auf 6,8 einstellen

**30% APS**

APS	30 g
dH <sub>2</sub> O	ad 100 ml

**10x Elphor**

Tris	3150 g
Glycin	720 g
SDS	50 g
dH <sub>2</sub> O	ad 5000 ml

→ pH-Wert auf 8,3 einstellen

**1x Elphor:** 1:10 Verdünnung des 10x Elphor

**Trenngel 7,5%**

dH <sub>2</sub> O	8,5 ml
Acrylamid (Rotiphorese)	4,3 ml
Tris-HCl (1,8 M, pH 8,8)	3,6 ml
SDS (10%)	167 µl
TEMED	20 µl
APS (30%)	66,6 µl

**Trenngel 12,5%**

dH <sub>2</sub> O	6,3 ml
Acrylamid (Rotiphorese)	7,1 ml
Tris-HCl (1,8 M, pH 8,8)	3,6 ml
SDS (10%)	167 µl
TEMED	20 µl
APS (30%)	66,6 µl

<b>Trenngel 17,5%</b>	
dH <sub>2</sub> O	3,4 ml
Acrylamid (Rotiphorese)	9,7 ml
Tris-HCl (1,8 M, pH 8,8)	3,6 ml
SDS (10%)	167 µl
TEMED	12 µl
APS (30%)	56,6 µl

<b>Sammelgel 5%</b>	
dH <sub>2</sub> O	7,2 ml
Acrylamid (Rotiphorese)	1,66 ml
Tris-HCl (0,6 M, pH 8,6)	1 ml
SDS (10%)	100 µl
TEMED	20 µl
APS (30%)	33,2 µl

Alle Angaben sind für jeweils 4 Gele berechnet.

### Western Blot

<b>Anodenpuffer 1</b>	
Tris	36,3 g
Methanol	200 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
→ pH-Wert auf 10,4 einstellen	

<b>Anodenpuffer 2</b>	
Tris	3,6 g
Methanol	200 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
→ pH-Wert auf 10,4 einstellen	

<b>Kathodenpuffer</b>	
Tris	3,0 g
ε-Aminocapronsäure	5,8 g
Methanol	200 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
→ pH-Wert auf 7,6 einstellen	

<b>10 x TBST</b>	
Tris	12,1 g
NaCl	82,3 g
Tween 20	5 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
→ pH-Wert auf 8,0 einstellen	
<b>1x TBST: 1:10 Verdünnung des 10x TBST</b>	

<b>Blockierlösung</b>	
Milchpulver	5 g
1x TBST	ad 100 ml

<b>Antikörperverdünnungslösung</b>	
BSA	5 g
NaN <sub>3</sub> (10%)	500 µl
1x TBST	95 ml

### Primärantikörper

<b>Primärantikörper</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Anti-α-Tubulin (DM1A)	Maus	1:1000	Cell Signaling Technology
Anti-Akt	Kaninchen	1:750	Cell Signaling Technology
Anti-BKα (690-1196)	Maus	1:1000	NeuroMab (clone L6/60)
Anti-BKα (RoCl; 674-1115)	Kaninchen	1:500	Eigenherstellung
Anti-Caspase-3 (8G10)	Kaninchen	1:750	Cell Signaling Technology
Anti-cGKI <sub>α/β</sub>	Kaninchen	1:500	Prof. Hofmann, München <sup>328</sup>
Anti-COX IV	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology
Anti-Cytochrom C (D18C7)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology
Anti-GAPDH	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology
Anti-GSK-3β	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology
Anti-HSP60 (H-300)	Kaninchen	1:200	Santa Cruz

Primärantikörper	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
Anti-K <sub>Ca</sub> (1057-1196) (APC-021)	Kaninchen	1:250	Alomone labs
Anti-K <sub>Ca</sub> (1184-1200) (APC-107)	Kaninchen	1:250	Alomone labs
Anti-NDUFS1	Kaninchen	1:1000	Proteintech
Anti-p44/42 MAPK (Erk1/2)	Kaninchen	1:750	Cell Signaling Technology
Anti-pGSK-3β (Ser9)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology
Anti-Phospho Akt (Ser473)	Kaninchen	1:750	Cell Signaling Technology
Anti-Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	Kaninchen	1:750	Cell Signaling Technology
Anti-PKCε	Kaninchen	1:200	Cell Signaling Technology
Anti-PKG-1 (C8A4)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology
Anti-p-PKCε (Ser729)	Kaninchen	1:200	Santa Cruz
Anti-TOM20 (F-10)	Maus	1:100	Santa Cruz
Anti-β <sub>1</sub> -AR	Kaninchen	1:200	Santa Cruz

### Sekundärantikörper (Fluorophor gekoppelt)

Sekundärantikörper	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
Anti-Kaninchen Cy 3 (Amersham <sup>TM</sup> ECL <sup>TM</sup> Plex goat-α-rabbit IgG Cy <sup>TM3</sup> )	Ziege	1:2000	GE Healthcare (28-9011-06)
Anti-Kaninchen Cy 5 (Amersham <sup>TM</sup> ECL <sup>TM</sup> Plex goat-α-rabbit IgG Cy <sup>TM5</sup> )	Ziege	1:2500	GE Healthcare (PA45011)
Anti-Maus Cy 3 (Amersham <sup>TM</sup> ECL <sup>TM</sup> Plex goat-α-mouse IgG Cy <sup>TM3</sup> )	Ziege	1:2500	GE Healthcare (PA43009)

### 2.3.9 Adenovirale Transduktion adulter Kardiomyozyten

#### Versuchsspezifische Materialien und Lösungen

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Bezugsquelle
Deckgläser (12 mm Ø)	613-1577	VWR
24-Well-Zellkulturplatten	3524	Corning
Laminin	354232	Corning

#### Adenovirale Vektoren

Adenoviraler Vektor	Konzentration (IFU/μl)
Ad-CMV-MTS-cGi500	2,2 x 10 <sup>6</sup>
Ad-CMV-GFP	3,3 x 10 <sup>7</sup>

Die adenoviralen Vektoren wurden von Frau Prof. Dr. Ulrike Naumann (Molekulare Neuro-Onkologie, Hertie-Institut für klinische Hirnforschung; Tübingen) hergestellt.

### 2.3.10 Anfärben von Mitochondrien mit MitoTracker® Orange CMTMRos

#### Versuchsspezifische Materialien und Lösungen

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Bezugsquelle
Dimethylsulfoxid (DMSO)	D 8418	Sigma-Aldrich
Hoechst	33258	Sigma-Aldrich
MitoTracker® Orange CMTMRos	M7510	Invitrogen
Paraformaldehyd (PFA)	0335.2	Carl Roth
Shandon® Immu-Mount	9990402	Thermo Scientific
Sudan Black B	0292.1	Carl Roth

#### Lösungen zur Färbung mit MitoTracker® Orange CMTMRos

MitoTracker Stocklösung (1 mM)	
MitoTracker	50 µg
DMSO	117 µl
→ im Dunkeln bei -20°C lagern	

MitoTracker ( 1 µM)	
MitoTracker Stock (1mM)	2 µl
Zellkulturmedium N	2 ml

MitoTracker ( 25 nM)	
MitoTracker (200nM)	250 µl
Zellkulturmedium N	ad 10 ml

#### Fixierung und Eindecken der Zellen

4% Paraformaldehyd-Lösung	
PFA	30 g
PBS	ad 750 ml
→ Auf 60°C erhitzen und rühren bis eine klare Lösung entsteht	

Eindeckmedium mit Hoechst (0,1%)	
Hoechst	5 µl
Shandon® Immu-Mount	5 ml
→ im Dunkeln bei 4°C lagern	

#### Lösung zur Reduktion der Autofluoreszenz

Sudan Schwarz Lösung (0,06%)	
Sudan Black B	0,06 g
Ethanol (70%)	100 ml



## 3 Methoden

### 3.1 Methoden der Mauszucht

#### 3.1.1 Tierhaltung

Alle Versuchstiere wurden gemäß den tierschutzrechtlichen Vorschriften in den Tierhaltungsräumen im Pharmazeutischen Institut in der Abteilung Pharmakologie, Toxikologie und klinische Pharmazie gezüchtet. In den Tierhaltungsräume herrschten folgende kontrollierte Lüftungs- und klimatische Bedingungen: Die Raumtemperatur betrug  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , die Luftfeuchtigkeit  $55 \pm 5\%$  und es herrschte ein 12-stündiger Tag/Nacht-Rhythmus. Die Versuchstiere wurden in 2-er oder 3-er Gruppen in Typ-2 Käfigen (Makrolonkäfig Typ II) gehalten. Zudem hatten alle Mäuse freien Zugang zu Wasser und standardisiertem Futter sowie Nistmaterial und einem Unterschlupf. Alle Organentnahmen wurden unter Beachtung der deutschen Tierschutzbestimmungen durchgeführt.

#### 3.1.2 Verpaarung der Versuchstiere

Die Zucht der Versuchstiere erfolgte in Dauerverpaarungen. Hierfür wurde ein männliches Tier (min. 8 Wochen alt) mit maximal zwei weiblichen Tieren (mind. 6 Wochen alt) in speziellen Typ-3 Käfigen (Makrolonkäfig Typ III) gehalten und die einzelnen erhaltenen Würfe wurden in einem Alter von 3 – 4 Wochen abgesetzt, geschlechts-spezifisch getrennt, mit Ohrmarkierungen versehen und genotypisiert (siehe Abschnitt 3.2).

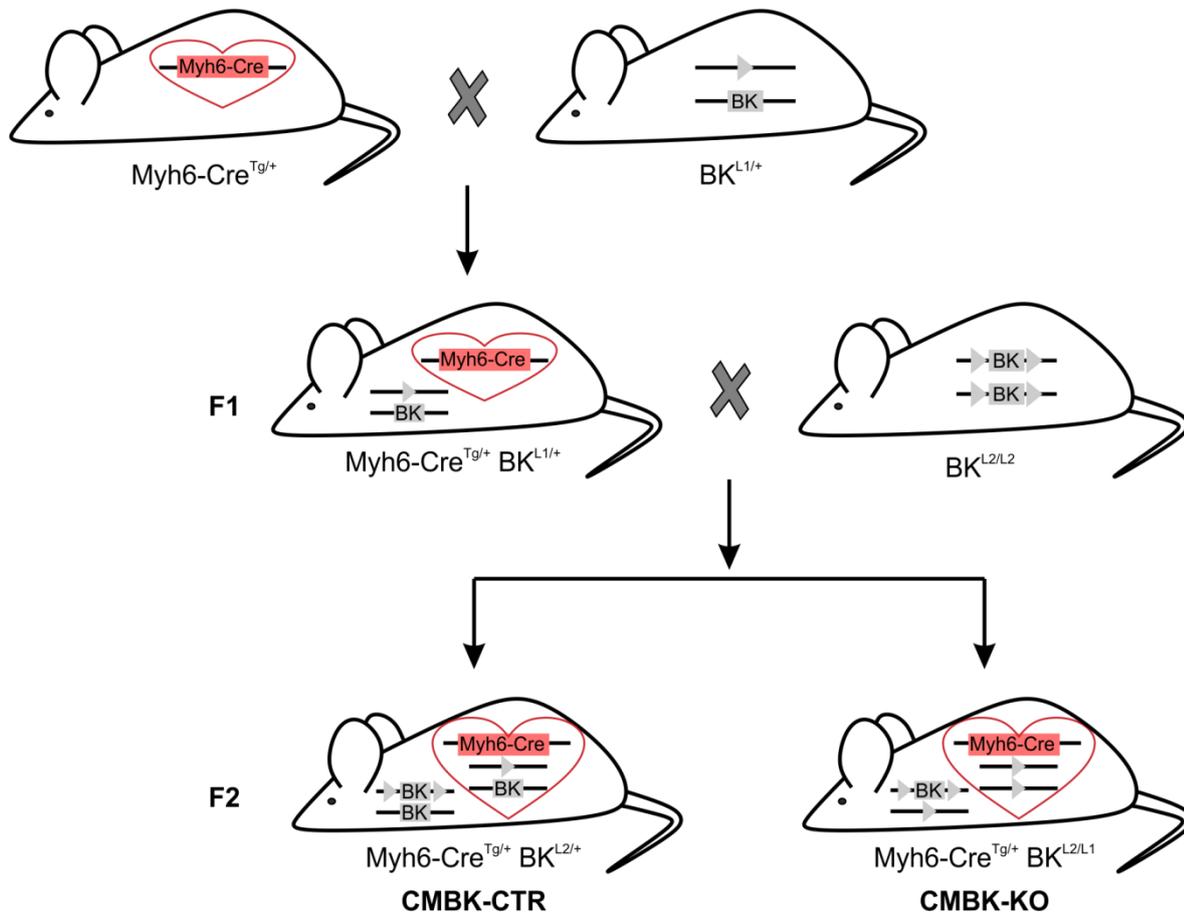
#### Globale BK-defiziente Mäuse

Zur Generierung einer globalen BK-Knockout ( $\text{BK}^{\text{L1/L1}}$ ; BK-KO) Maus wurde das Exon 7 des *KCNMA1*-Gens<sup>279</sup>, das ein Teil der porenbildenden Region der  $\alpha$ -Untereinheit darstellt und ein Teil des S6-Segments codiert, mittels homologer Rekombination deletiert<sup>329</sup>. Durch diese Deletion wurden BK-Kanal defiziente Mäuse mit globalem Verlust des Kanalproteins generiert. Als Kontrollen wurden Wildtyp-Wurfgeschwister ( $\text{BK}^{+/+}$ ; BK-WT) verwendet. Zur Generierung der homozygoten BK-KO und BK-WT Mäuse wurden heterozygote C57BL/6 BK-Mäuse ( $\text{BK}^{\text{L1/+}}$ ) mit heterozygoten SV129 BK-Mäusen ( $\text{BK}^{\text{L1/+}}$ ) verpaart. Aus diesen Verpaarungen entstanden BK-WT und BK-KO Tiere der F1-Generation mit einem gemischtem SV129/C57BL/6 Hintergrund.

#### Kardiomyozyten-spezifische BK-defiziente Mäuse (CMBK-Mäuse)

Zur Generierung von Kardiomyozyten-spezifischen BK-KO Mäusen ( $\text{Myh6-Cre}^{\text{Tg/+}} \text{BK}^{\text{L2/L1}}$ ; CMBK-KO;  $\text{CMBK}^{\text{L2/L1}}$ ) wurde das Cre/loxP-Rekombinase-System verwendet<sup>329</sup>. Die Cre-Rekombinase ermöglicht das gezielte Entfernen von DNA-Sequenzen in lebenden Organismen und katalysiert die Spaltung und Neuverknüpfung von DNA zwischen spezifischen loxP Erkennungssequenzen. Diese

wurden zuvor flankierend in den zu erkennenden Genabschnitt (gefloxtes Allel) eingebracht. Als Promotor für die Cre-Rekombinase wurde das Myosin-heavy chain 6c (Myh6c) Gen gewählt<sup>330</sup>. Der alpha-Myosin-heavy chain 6c ( $\alpha$ -Myosin schwere Kette 6c,  $\alpha$ Myh6c) Promotor kontrolliert die Kardiomyozyten-spezifische Expression der Cre-Rekombinase. Die Generierung der CMBK-Mäuse geht von der Verpaarung der Myh6-Cre<sup>Tg/+</sup> Mäuse mit der BK Mauslinie (siehe Abbildung 3.1) aus. Zur Generierung der Versuchstiere waren mehrere Verpaarungsschritte notwendig.



**Abbildung 3.1 Verpaarungsschema zur Generierung der CMBK-defizienten Mäuse**

Die Kreuzung der Myh6-Cre-transgenen Tiere mit  $BK^{L1/+}$ -Mäusen führte zu den F1-Elterntieren (*Genotyp:*  $Myh6-Cre^{Tg/+} BK^{L1/+}$ ). Diese wurden in einem zweiten Verpaarungsschritt mit geflochten BK-Tieren ( $BK^{L2/L2}$ ) gekreuzt, woraus die Versuchstiere resultierten. BK-Kanal-Wildtyp-Gen (+/—BK—), loxP-Erkennungssequenz (►), BK defizientes Allel (L1/—►—), von zwei loxP-Erkennungssequenzen umgebendes BK-Gen (L2/►—BK►—), Expression der Cre-Rekombinase im Herz unter Kontrolle des  $\alpha$  Myh6c Promoters ( $Myh6-Cre/Myh6-Cre$ ), Genotyp im Herzen (rotes Herz). Genaueres im Text.

Zunächst wurden heterozygote transgene B6.FVB-Tg(Myh6-cre)2182Mds/J Mäuse (*Genotyp:*  $Myh6-Cre^{Tg/+}$ ; Jackson Laboratory, Stock No.: 011038) mit heterozygoten globalen BK-defizienten (*Genotyp:*  $BK^{L1/+}$ ) Mäusen mit gemischtem SV129/C57BL/6 Hintergrund verpaart (Abbildung 3.1). Aus diesen Verpaarungen gingen in der F1-Generation doppelt-transgene Tiere hervor, die sowohl die Cre-Rekombinase in den Kardiomyozyten ( $Myh6-Cre^{Tg/+}$ ) exprimierten als auch heterozygot für den BK-Kanal ( $BK^{L1/+}$ ) waren. Tiere aus der F1-Generation mit dem Genotyp  $Myh6-Cre^{Tg/+} BK^{L1/+}$  dienten

als Eltern für die Zucht der eigentlichen Versuchstiere und wurden mit geflochten BK-Kanal (*Genotyp*: BK<sup>L2/L2</sup>) Tieren mit gemischtem SV129/C57BL/6 Hintergrund verpaart. Bei den geflochten BK<sup>L2/L2</sup> Mäusen handelt es sich hinsichtlich der BK-Kanal Konstitution um Wildtyp Tiere, bei denen sowohl vor als auch hinter dem für Exon 7 codierenden Abschnitt der KCNMA1-Gensequenz über homologe Rekombination loxP-Sequenzen eingebracht wurden. Diese loxP-Sequenzen dienen als Schnittstellen für die kardiomyozytär exprimierte Cre-Rekombinase. Aus dieser F2-Generation der Kreuzung entstanden die folgenden Versuchsmäuse mit den gewünschten Genotypen: Myh6-Cre<sup>Tg/+</sup> BK<sup>L2/L1</sup> (CMBK-KO) sowie deren Wurfgeschwisterkontrolliere Myh6-Cre<sup>Tg/+</sup> BK<sup>L2/+</sup> (CMBK-CTR).

## 3.2 Genotypisierung

Zur Identifikation des Genotyps wurden die Mäuse routinemäßig mit Ohrmarkierungen versehen (siehe 3.1.2) und eine 1 – 2 mm große Schwanzspitze zur Biopsie genommen. Aus diesen Schwanzspitzen wurde anschließend die DNA isoliert, mittels PCR vervielfältigt und mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert.

### 3.2.1 DNA Isolation

Die Isolation der DNA erfolgte mit Hilfe des *KAPA Mouse Genotyping Hot Start Kits* der Firma Roche (siehe 2.3.1). Dieses Kit wurde zur schnellen Extraktion und Amplifikation von DNA aus Mausgewebe entwickelt. Im ersten Schritt wurde ein Mastermix aus dem Extraktionsenzym (*KAPA Express Extract Enzym*), Extraktionspuffer (*KAPA Express Extract Buffer*) und dH<sub>2</sub>O zur DNA-Isolation hergestellt. Dabei wurde pro Probe 2 µl Extraktionsenzym, 10 µl Extraktionspuffer und 88 µl dH<sub>2</sub>O angesetzt. Die Schwanzbiopsien wurden in 100 µl dieses Mastermixes in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß bei 75°C für 10 min und 450 rpm in einem Thermoschüttler inkubiert. Hierbei erfolgte durch eine thermostabile Protease die Lyse der Zellen sowie Zersetzung der Proteine und Nukleasen. Nach Inaktivierung des Enzyms bei 90°C für 5 min und 450 rpm und anschließendes kurzes Zentrifugieren der Probe konnte die DNA im Überstand abgenommen und in ein neues autoklaviertes 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt werden. Die DNA Proben wurden entweder sofort weiterverwendet oder kurzfristig bei 4°C gelagert.

### 3.2.2 DNA-Vervielfältigung mittels Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR, polymerase chain Reaktion) ist ein *in vitro* Verfahren zur schnellen Vervielfältigung bestimmter DNA-Abschnitte<sup>331</sup>. Dabei muss der zu amplifizierende DNA-Abschnitt bekannt sein. Die PCR setzt sich aus mehreren Zyklen von drei aufeinanderfolgenden Schritten zusammen, wobei der gewünschte DNA-Abschnitt exponentiell vervielfältigt wird. Als Erstes erfolgt die Denaturierung der DNA. Bei einer Temperatur von 90°C werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen der DNA-Stränge aufgelöst und es entstehen zwei DNA-Einzelstränge. Bei der darauffolgenden Hybridisierung kommt es zur

Anlagerung (Annealing) der Primer an die komplementären DNA-Einzelstränge gemäß ihren Basen. Hierbei lagert sich der sogenannte *Forward*-Primer (F) an das 3'-Ende des kodierenden Stranges an, während der *Reverse*-Primer (R) an das 3'-Ende des komplementären Stranges bindet. Die Temperatur wird hierbei auf ca. 55°C heruntergekühlt. Diese Temperatur wird entsprechend dem Optimum der Primer abhängig von ihrer Länge, Sequenz und Schmelztemperatur gewählt. Durch Zugabe der Primer im Überschuss wird hierbei eine Rehybridisierung der Einzelstränge verhindert. Als nächstes erfolgt die Polymerisation. Es kommt nun zur Verlängerung (Elongation) der Stränge mit Hilfe der hitzestabilen DNA-Polymerase. Dabei wird die Temperatur auf ca. 70°C erhöht, was dem Temperaturoptimum des Enzyms entspricht. Die DNA-Polymerase lagert hierbei, beginnend an den hybridisierten Primern, komplementäre Desoxynukleotide (dNTPs) an die DNA-Einzelstränge an, wodurch ein jeweils neuer Strang synthetisiert wird.

Die mit dem KAPA *Express Extract* gewonnene DNA wurde mittels PCR und dem KAPA2G *Fast Genotyping Mix* (KAPA2G) amplifiziert. Der KAPA2G *Fast Genotyping Mix* enthält bereits die für die PCR notwendigen Bestandteile wie die DNA-Polymerase, Reaktionspuffer und Magnesiumchlorid (für die optimale Aktivität der Polymerase) sowie dNTPs und einen Ladepuffer. Die verwendeten Primer sind unter Abschnitt 2.3.1 aufgeführt. Die Pipettierschemata für jeweils eine Probe der BK und CMBK Mauslinie sowie das PCR Programm sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

**Tabelle 3.1 Pipettierschemata zur DNA-Amplifikation und PCR Programm**

Substanz	BK	Myh6-Cre <sup>Tg/+</sup>
KAPA2G	12,5 µl	12,5 µl
DMSO	1 µl	1 µl
dH <sub>2</sub> O	8,5 µl	7,5 µl
Primer F1/F2/R	je 1 µl	-
Primer F <sub>Tg</sub> /R <sub>Tg</sub> /F <sub>Ctrl</sub> /R <sub>Ctrl</sub>	-	je 1 µl

Schritt	Zeit
Initiale Denaturierung (94°C)	3 min
Denaturierung (94°C)	30 sec
Hybridisierung (54°C)	30 sec
Elongation (72°C)	30 sec
} Wdh. 30 Zyklen	
Terminale Elongation (72°C)	5 min
Kühlung (10°C)	max. 24 h

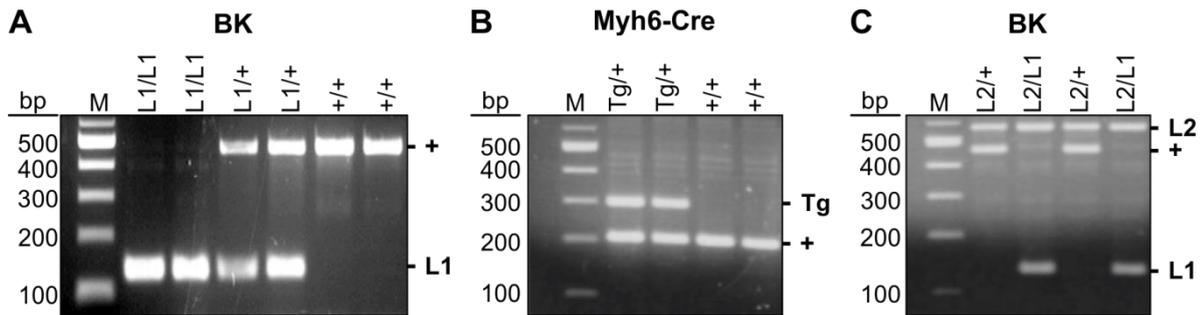
Zuerst wurde 25 µl des Mastermixes vorgelegt und dann 1 µl DNA hinzu pipettiert. Die Proben wurden gut gemischt und in einen Thermocycler (Mastercycler) gestellt. Der Thermocycler ermöglicht das Erhitzen und Abkühlen präzise auf die benötigte Temperatur. Das hier verwendete *KAPA Mouse Genotyping Hot Start Kit* beinhaltet eine spezielle DNA-Polymerase (KAPA2G *FAST Hot Start DNA-Polymerase*), die durch eine einmalige hohe Temperatur (92°C) zu Beginn aktiviert werden muss.

Nach initialer Aktivierung der DNA-Polymerase erfolgte die Denaturierung der DNA bei 94°C. Zum anschließenden Annealing wurde die Temperatur auf 54°C abgesenkt und anschließend zur Elongation wieder auf 72°C erhöht. Diese drei Schritte wurden 30 Mal wiederholt, um eine ausreichende Vervielfältigung des gewünschten DNA-Abschnittes zu erhalten.

### 3.2.3 Detektion der DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes erfolgt die Auftrennung der DNA-Fragmente Richtung Anode (Pluspol) auf Grund der negativen Ladung die durch Phosphatgruppen des Zucker-Phosphat-Rückgrats der DNA entsteht. Das Agarose-Gel hat dabei die Funktion eines Siebes, wodurch kleinere Moleküle schneller durch das Gel wandern und größere Fragmente zurückgehalten werden. Die Größe der DNA-Fragmente wird anhand eines DNA-Längenstandards bestimmt.

Zur Genotypisierung wurden 2% Agarosegele (siehe 2.3.1) eingesetzt. Hierzu wurde die Agarose im Elektrophoresepuffer (1x TBE-Puffer), damit sich diese löst, in einer Mikrowelle kurz aufgekocht. Anschließend wurde die Lösung unter Rühren auf einem Magnetrührer heruntergekühlt und mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml versetzt. Das Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff und interkaliert in die DNA, wodurch diese später durch Anregung mit UV-Licht sichtbar gemacht werden kann. Währenddessen wurde ein Gelschlitten mit Kämmen vorbereitet. Nach Eingießen der abgekühlten Lösung und Aushärten des Gels wurden die Proben in die entstandenen Taschen pipettiert und die Elektrophorese durch Anlegen von 80 V gestartet. Die DNA-Fragmente, die mit Hilfe des *KAPA Mouse Genotyping Hot Start Kits* (siehe 3.2.2) gewonnen wurden, konnten direkt in die Taschen pipettiert werden, da diese bereits den erforderlichen Ladepuffer enthielten. Durch den Elektrophoresepuffer mit einem pH-Wert von 8,0 der das Gel bedeckte, wurde der polyanionische Zustand der DNA garantiert. Zusätzlich wurde noch ein DNA-Längenstandard (siehe 2.3.1) aufgetragen. Dieser enthielt Moleküle mit definierter Größe, anhand dessen später die Größe der DNA-Probenfragmente abgelesen werden konnten. Nach ca. 10 min wurde die Spannung auf 120 V erhöht, und nach erfolgter Auftrennung konnten die Banden mittels UV-Licht sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert werden. Anhand der DNA-Probenfragmentgröße konnten die Genotypen wie in Abbildung 3.2 dargestellt den Versuchstieren zugeordnet werden. Die Untersuchung des BK-Genotyps basiert auf dem Nachweis von Exon 7 des *KCNMA1*-Gens<sup>279</sup>. Da dieses bei den BK-defizienten Mäusen deletiert wurde, entsteht beim Nachweis des L1-Allels ein PCR-Fragment von 132 bp, während das DNA-Fragment des WT-Allels eine Größe von 466 bp aufweist. Bei heterozygoten BK-Tieren konnten entsprechend beide Fragmente detektiert werden. Gefloxt L2-Allele, bei denen das *KCNMA1*-Gen von loxP-sites flankiert ist, wiesen eine etwas höhere Fragmentgröße von 577 bp auf. Das  $\alpha$ Myh6-cre-Transgen konnte durch ein DNA-Fragment mit einer Größe von 300 bp detektiert werden. Zusätzlich diente hier ein DNA-Fragment von ca. 200 bp als interne Positivkontrolle zur Überprüfung der PCR.



**Abbildung 3.2 Genotypisierung und Identifizierung der Versuchstiere**

Repräsentative Bilder nach Auftrennung der PCR-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese. (A) BK-Mauslinie (B) und (C) Myh6-Cre<sup>Tg/+</sup> BK<sup>L2/+ / L2/L1</sup>-Mauslinie. bp: Basenpaare; M: Marker; +: Wildtyp L1: BK-Knockout-Gen; L2: gefloxtes/von loxP-sites flankiertes BK-Gen; Tg: Transgen. Weitere Erläuterungen im Text.

### 3.3 Organentnahme und Kardiomyozytenisolation

#### 3.3.1 Organentnahme und Bestimmung des kardialen Phänotyps

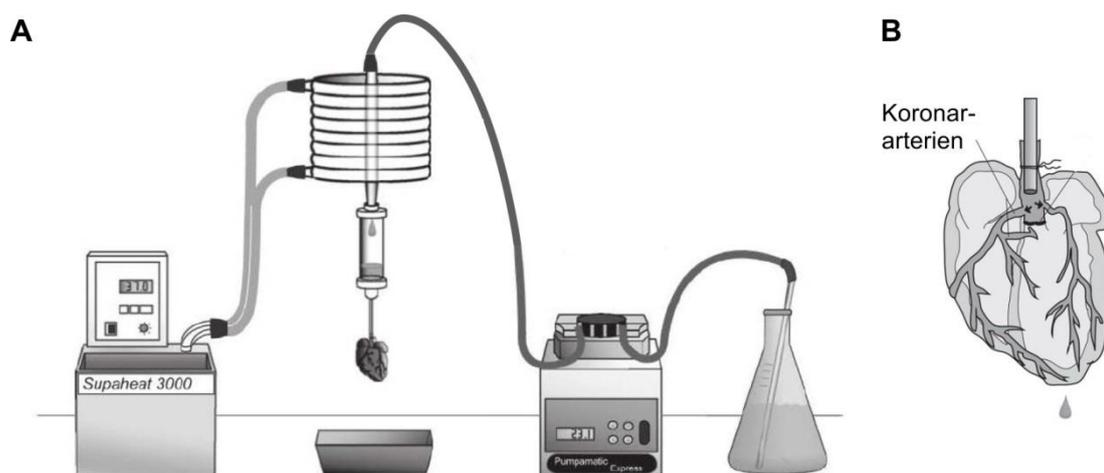
Sämtliche Versuchstiere wurden entweder durch Inhalation von Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) eingeschläfert oder durch zervikale Dislokation getötet. Das Einleiten von CO<sub>2</sub> erfolgte im gewohnten Haltungskäfig der Tiere. Dabei wurde das Gas zur gleichmäßigen Verteilung im Käfig langsam und kontinuierlich bei geschlossenem Deckel eingeleitet, was die Maus zunächst in tiefe Bewusstlosigkeit fallen ließ und dann zum Tod führte. Da es beim Einleiten von CO<sub>2</sub>, durch Reaktion des Kohlenstoffdioxids mit Hämoglobin zu Carboxyhämoglobin, zu einer Hypoxämie und blockierter Anlagerung von Sauerstoff kommt, wurden alle Tiere, deren Organe für Hypoxie-Reoxygenierungsversuche entnommen wurden, mit zervikaler Dislokation getötet. Bei der zervikalen Dislokation wurde der Schädel des Tieres mit einer Schere am Hinterhauptbein fixiert und durch einen ruckartig starken Zug, kaudal leicht nach oben (ca. 45°-Winkel), wurden das Rückenmark und die versorgenden Blutgefäße des Gehirns durchtrennt. Dies führte zur Zerstörung des Atem- und Schmerzzentrums und zum sofortigen Tod des Tieres.

Nach direktem Eintreten des Todes wurde das Tier gewogen, der Thorax geöffnet, das Herz freigelegt und unter einer Stereolupe in eiskalter isotonischer phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) von anhaftendem Thymus und Bindegewebe befreit. Um mögliche Thromben und Blutreste zu entfernen wurde das Herz mit einer 2 ml Spritze und einer dünnen Kanüle (25G; 0,5x16 mm) über die Aorta mit PBS gespült. Danach wurde das Herz transversal halbiert, auf einem fusselreifen Tuch getrocknet und mit einer Analysenwaage gewogen. Um Unterschiede im Herzgewicht zwischen BK-KO bzw. CMBK-KO und ihren Wurfgeschwisterkontrolltieren (BK-WT bzw. CMBK-CTR) festzustellen, wurde das Herzgewicht ins Verhältnis zum Körpergewicht (HG/KG) gesetzt. Darüber hinaus wurde das Herzgewicht zusätzlich auf die Tibialänge (HG/TL) normalisiert. Hierzu wurde dem Tier die rechte Tibia entfernt, indem das Kniegelenk oberhalb des Schienbeinkopfes durchtrennt wurde. Anschließend wurde die Tibia ca. 15 min gekocht und so von Muskelfasern und Sehnen befreit. Die

Messung erfolgte mittels Schieblehre. Zusätzlich wurden im Laufe dieser Arbeit auch Aorten entnommen. Hierzu wurde die Aorta entlang der Wirbelsäule bis zur Höhe der Leber mit einer Schere herausgeschnitten. Anschließend wurde die Aorta mit feinen Pinzetten von Bindegewebe, Blut und venösen Gefäßen freipräpariert.

### 3.3.2 Isolation adulter muriner Kardiomyozyten

Die Isolation der Kardiomyozyten erfolgte nach der Langendorff-Methode, welcher das Protokoll der Alliance for Signaling (AfCs Protokoll PP00000125) zu Grunde liegt. Die Langendorff-Perfusion basiert auf einer retrograden Perfusion des Herzens, mit einer Enzymlösung über die Aorta. Die Enzymlösung bestand aus Trypsin und Collagenase II bzw. Liberase DH. Zu Beginn der Arbeit wurden die Kardiomyozyten mit Collagenase II isoliert. Die Collagenase II ist eine Mischung verschiedener proteolytischer Enzyme, unterliegt als biologisches Produkt natürlichen Schwankungen, weshalb jede Charge daher individuell getestet und in ihrer Menge angepasst werden muss. Da im Laufe der Experimente Schwierigkeiten in der Isolation, einhergehend mit einer schlechten Viabilität und Ausbeute der Kardiomyozyten (durch Verwendung einer neuen Collagenase II-Charge und einer schlechten BDM-Charge) auftraten wurde auf Liberase DH als Isolationsenzym umgestellt. Liberase DH ist eine Mischung aus hochgereinigter Collagenase I und Collagenase II sowie neutralen Proteasen und enthält reduzierte Clostripain- und Trypsin-Aktivitäten sowie einen reduzierten Endotoxingehalt. Daher enthält jede Charge an Liberase DH gleichwertige Formulierungen und unterliegt keinen schwerwiegenden Schwankungen, sondern hat hohe experimentelle Reproduzierbarkeit. Das Langendorff-Perfusionssystem (siehe Abbildung 3.3) bestand aus einer peristaltischen Schlauchpumpe, die während der Perfusion konstant auf eine Flussrate von 2,5 ml/min eingestellt war, einem Wasserbad zur optimalen Erwärmung des Systems und der Puffer auf 37°C sowie einer Perfusionskanüle, über die das Herz an das Perfusionssystem angeschlossen wurde.



**Abbildung 3.3 Langendorff-Perfusion zur Isolation von Kardiomyozyten**

(A) Langendorff-Perfusionssystem mit einer peristaltischen Pumpe, einer Perfusionskanüle zum "aufhängen" des Herzens und einem Wasserbad zur optimalen Erwärmung des Systems. (B) Das Herz wird retrograd mit enzymhaltigem Puffer über die Koronararterien perfundiert. Näheres siehe im Text. Abbildung modifiziert nach Louch et al.<sup>332</sup>.

Zu Beginn der Isolation wurden der Verdaupuffer sowie die beiden Stopp-Puffer (Stopp-Puffer I und Stopp-Puffer II) hergestellt (siehe 2.3.2) und auf 37°C vorgewärmt. Dem Verdaupuffer wurde vor Zugabe der Collagenase II bzw. Liberase DH - Lösung 2,5 ml abgenommen und in ein 5 ml Becherglas überführt. Je nach Größe des Herzens wurden 15 mg Collagenase II bzw. 300 – 400 µl der Liberase DH-Lösung kurz vorher in den Verdaupuffer zugegeben. Für die Isolation und Kultivierung muriner adulter Kardiomyozyten wurden 8 – 10 Wochen alte Mäuse verwendet. Um die Bildung von Thromben zu verhindern, wurde den Mäusen 10 min vorher 250 I.E. Heparin (in 0,9% NaCl) i.p. gespritzt. Nach Entnahme des Herzens, Entfernen des Bindegewebes und Freilegen der Aorta wurde das Herz vorsichtig über diese auf die Perfusionskanüle gezogen, mit Seide verknotet und an die Perfusionsanlage angeschlossen. Nach 3 min Perfusion mit dem Perfusionspuffer wurde auf den Verdaupuffer mit Collagenase II bzw. Liberase DH-Lösung gewechselt und für weitere 12 min perfundiert. Danach wurde das Herz abgenommen, die Vorhöfe abgetrennt und das Herz in 2,5 ml Verdaupuffer (ohne Enzyme) in das 5 ml Becherglas überführt und für 30 sek mechanisch mit einer Federschere zerkleinert. Anschließend wurde der Stopp-Puffer I hinzugegeben und alle weiteren Schritte erfolgten unter der Sterilwerkbank. Zur Vereinzlung weiterer Kardiomyozyten wurde die Suspension mit einer 5 ml Stripette 3 min lang vorsichtig homogenisiert und danach, zur Abtrennung von Gewebetrümmern, über ein Zellsieb (100 µm Maschenweite) in ein 50 ml Falcontube abgelassen. Nach 10 min Sedimentation der Zellen bei Raumtemperatur (RT) unter der Sterilwerkbank wurde der Überstand, der kardiale Fibroblasten enthielt, abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wurde im vorgewärmten Stopp-Puffer II vorsichtig resuspendiert und in eine 10 cm Petrischale überführt. Um Ca<sup>2+</sup>-tolerante Kardiomyozyten zu erhalten, wurde nun die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration nach einem Ca<sup>2+</sup>-Reinduktionsprotokoll schrittweise auf 1 mmol/L erhöht. Hierzu wurden im Abstand von 4 min zuerst zweimal 50 µl und einmal 100 µl einer 10 mM sowie anschließend 30 µl und 50 µl einer 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung zugegeben und diese durch vorsichtiges schwenken verteilt. Nach der Ca<sup>2+</sup>-Reinduktion wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Falcontube überführt und für 12 min zur Sedimentation der Zellen bei RT unter der Sterilwerkbank stehen gelassen. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Zellpellet mit den enthaltenen Kardiomyozyten wurde in 3 – 4 ml des Aussaatmediums NH homogenisiert.

Zur Kultivierung der Kardiomyozyten und anschließenden adenoviralen Transduktion (siehe Abschnitt 3.8) wurden diese auf Laminin-beschichtete 24-Well Zellkulturplatten ausgebracht. Zur Hypoxie-Reoxygenierung (siehe Abschnitt 3.4) wurde die Zellsuspension auf Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt.

#### **3.3.3 DNA-Isolation aus Kardiomyozyten und Geweben**

Um die Gewebespezifität der Myh6-Cre-Rekombinase zu überprüfen wurden neben Kardiomyozyten Atrium, Ventrikel, Aorta und Leber auf ihre BK-Kanal-Expression untersucht. Hierfür wurden die Gewebe den Tieren entnommen und die DNA-Isolation erfolgte mit dem *High Pure PCR Preparation Kit* der Firma Roche (siehe 2.3.2). Die Gewebeproben wurden mit 200 µl Lysepuffer und 40 µl Proteinase K über Nacht bei 55°C auf dem Schüttler (450 U/min) inkubiert. Durch die Bestandteile des Lysepuffers werden Zellmembranen zerstört. Die Proteinase K fungiert als Endo-/Exopeptidase und sorgt für den Abbau der Proteine im Zellysate. Zudem werden mit Hilfe der enthaltenen EDTA

endogene DNAsen inaktiviert. Im Anschluss wurden die Gewebeproben mechanisch zerkleinert und in einer Lösung aus 200 µl Bindepuffer und 100 µl Isopropanol bei 13.000 U/min für 5 min zentrifugiert. Die DNA im Überstand wurde in ein Polypropylen-Filterröhrchen transferiert. Durch ihre Silica-Beschichtung wird in Gegenwart von Guanidin eine Bindung der Nukleinsäuren an die Säulenmatrix ermöglicht. Nach Zentrifugation bei 8000 U/min für 1 min erfolgten zwei Waschschrte mit je 500 µl Waschpuffer bei 8000 U/min für 1 min. Die Elution der DNA erfolgte anschließend mit 200 µl Elutionspuffer, der durch seine hohe TRIS-Konzentration die DNA-Silica-Bindung destabilisiert. Mithilfe eines Nanophotometers wurde anschließend die DNA-Konzentration bestimmt und mit Elutionspuffer (siehe Abschnitt 2.3.2) auf eine Konzentration von 10 ng/µl eingestellt. Für die Durchführung der PCR und der Gelelektrophorese siehe Abschnitte 3.2.2 und 3.2.3. Für die PCR wurde allerdings hier das *High Pure PCR Preparation Kit* der Firma Roche verwendet. Bei diesem Kit mussten, im Gegensatz zum KAPA2G (siehe 3.2.2), die notwendigen Bestandteile wie die DNA-Polymerase, Reaktionspuffer sowie Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) einzeln hinzugegeben werden. Die verwendeten Primer sind unter 2.3.1 aufgeführt, das Pipettierschema zur PCR des BK für eine Probe ist in Tabelle 3.2 dargestellt und das PCR Programm entspricht dem in Abschnitt 3.2.2 Tabelle 3.1. Zur Gelelektrophorese (s. Abschnitt 3.2.3) wurden die Proben anschließend mit 6-fach konzentriertem Gel-Ladepuffer (s. 2.3.1) im Verhältnis 1:6 versetzt.

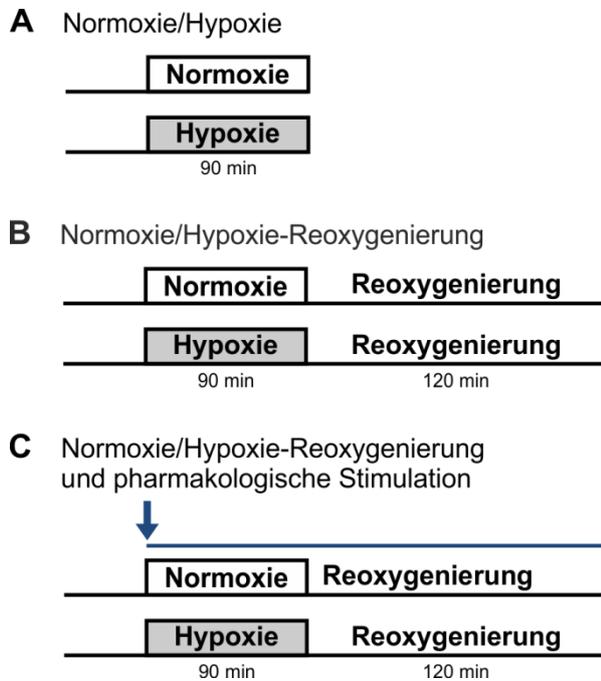
**Tabelle 3.2 Pipettierschema zur PCR mit dem High Pure PCR Preparation Kit**

Substanz	
isolierte DNA	3 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Taq-Puffer (10x)	5 µl
Taq DNA-Polymerase	0,2 µl
Primer: F1/F2/R	je 1 µl
dH <sub>2</sub> O	36,8 µl

### 3.4 Hypoxie-Reoxygenierung isolierter Kardiomyozyten

Da sich die Kardiomyozyten unter längerer normoxischer und hypoxischer Kultivierung von den Laminin-beschichteten Platten ablösen, somit beim Mediumwechsel und für den weiteren Versuch verloren gingen (siehe auch Abschnitt 4.6), fanden alle Versuche unter Hypoxie-Reoxygenierung, ähnlich des Prinzips des „*ischemic pelleting*“<sup>333</sup>, in Eppendorf-Reaktionsgefäßen statt. Während der Hypoxie wurden Substratfreiheit (Glucose/Serum) und Sauerstoffentzug durch Inkubation in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator mit Sauerstoffregelung und einem HEPES-gepuffertem Medium ohne Serum und Glucose (siehe 2.3.3) erreicht. Die Bedingungen unter Hypoxie im Brutschrank waren 5% CO<sub>2</sub>, 0% O<sub>2</sub> und 95% N<sub>2</sub> bei 37°C. Zur Normoxie und Reoxygenierung wurde ein HEPES-gepuffertes Medium, das Serum (5%) und Glucose (5,5 mM) enthielt, eingesetzt (siehe 2.3.3) und die Zellen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 21% O<sub>2</sub> in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert. Die Zellkulturmedien wurden am Tag zuvor hergestellt und über Nacht im entsprechenden Brutschrank equilibriert. Die isolierten Kardiomyozyten (siehe Abschnitt 3.3.2) wurden in Aussaatmedium NH homogenisiert und die Suspension gleichmäßig auf Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt. Nach 30 min Inkubation unter normoxischen Bedingungen,

zur Gewöhnung der Zellen an die Kultivierungsbedingungen, wurden die Zellen nach Zentrifugation bei 250x g für 1 min in jeweils 1 ml Zellkulturmedium N oder Zellkulturmedium H (Zellkulturmedium N/H) homogenisiert und auf die in Abbildung 3.4 dargestellten Behandlungsgruppen aufgeteilt:



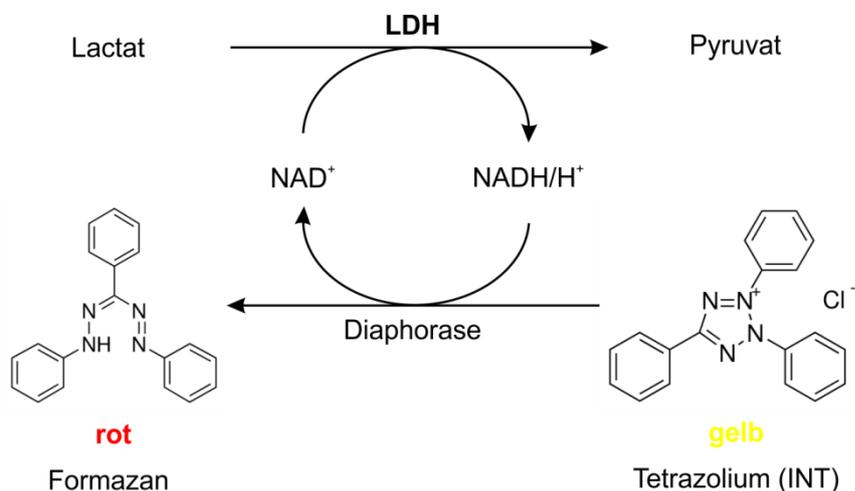
**Abbildung 3.4 *In vitro* Normoxie- und Hypoxie-Reoxygenierung isolierter Kardiomyozyten**

Die Zellen wurden nach Isolation gleichmäßig auf die Gruppen der Protokolle A bis C aufgeteilt. Nach 30 min Gewöhnung der Zellen an die Kultivierungsbedingungen erfolgte ein Mediumwechsel. Nach 90 min Inkubation unter Normoxie oder Hypoxie erfolgte bei anschließender Reoxygenierung von 120 min ein erneuter Mediumwechsel nach Normoxie/Hypoxie. Die pharmakologische Stimulation der Zellen (C, blauer Pfeil) mit 8-Br-cGMP (100  $\mu$ M), NS-11021 (300 nM und 30 nM) oder Cinaciguat (25 nM) erfolgte sowohl während der Normoxie bzw. Hypoxie als auch während der Reoxygenierung. Weitere Details im Text.

Dabei wurde jeweils für 90 min unter Normoxie oder Hypoxie inkubiert (Abbildung 3.4, Protokoll A – C). Erfolgte anschließend eine Reoxygenierung von 120 min (Abbildung 3.4, Protokoll B und C) wurden die Zellen nach Zentrifugation bei 250x g für 1 min und Abnahme des Überstandes vorsichtig in 1 ml Zellkulturmedium N homogenisiert und im Brutschrank unter normoxischen Bedingungen inkubiert. Wurden die Kardiomyozyten während der Normoxie oder Hypoxie und anschließender Reoxygenierung mit unterschiedlichen Substanzen stimuliert (Abbildung 3.4, Protokoll C), wurde das jeweilige Zellkulturmedium mit NS11021 (Endkonzentration 300 nM und 30 nM), Cinaciguat (Endkonzentration 25 nM) oder 8-Br-cGMP (Endkonzentration 100  $\mu$ M) versetzt (siehe 2.3.3). Als Kontrolle dienten für NS11021 und Cinaciguat identische Mengen des DMSO um sicherzugehen, dass der Einsatz von DMSO in dieser Konzentration nicht selbst einen Einfluss auf die Normoxie/Hypoxie-Reoxygenierung ausübt. Eine Stimulation der Kardiomyozyten erfolgte über die gesamte Versuchszeit (siehe Abbildung 3.4, Protokoll C). Das Ausmaß des nekrotischen Zelltod erfolgte über die Bestimmung der LDH-Aktivität (siehe 3.4.1). Die Erfassung des apoptotischen Zelltods erfolgte durch die Messung der Caspase-3-Aktivität (siehe 3.4.2). Für die mikroskopischen Untersuchungen wurden die Zellen nach 90 min Inkubation unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen in eine Petrischale (8 cm<sup>2</sup>) überführt und anschließend wurden mit dem Mikroskop (Inverses Mikroskop Axiovert 200 M) (siehe 2.1.1) repräsentative Bilder angefertigt.

### 3.4.1 Bestimmung der LDH-Aktivität im Zellüberstand

Zur Bestimmung der LDH Aktivität wurde das *CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Kit* der Firma Promega (siehe 2.3.4) verwendet. Die Bestimmung der LDH-Aktivität ist eine weit verbreitete Methode zur Bestimmung des nekrotischen Zelltods<sup>334</sup>. Das Prinzip der LDH Messung beruht auf dem Nachweis des cytosolischen Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH) das beschädigte Zellen durch den Verlust der Integrität ihrer Zellmembran freisetzen<sup>335</sup>. Dieses kann dann als Marker des nekrotischen Zelltods im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. Das Prinzip des enzymatischen Tests ist in Abbildung 3.5 dargestellt und basiert auf der kolorimetrischen Bestimmung von Formazan, das photometrisch quantifiziert wird. Freigesetztes LDH im Medium katalysiert die Reduktion von  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}/\text{H}^+$ , das anschließend die Reaktion eines Tetrazoliumsals (INT) durch Diaphorase zu einem roten Formazansalz katalysiert. Es erfolgt somit eine quantitative Messung der LDH-Freisetzung, da die Menge des gebildeten Formazan direkt proportional zur Menge der freigesetzten LDH im Medium ist.



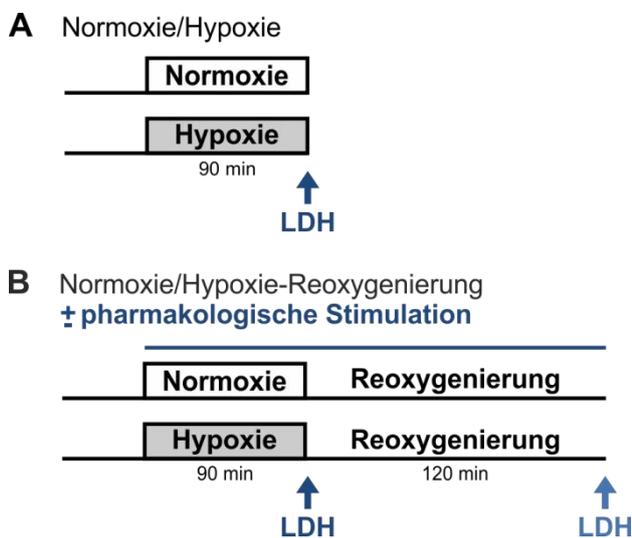
**Abbildung 3.5 Prinzip der LDH-Aktivitätsbestimmung**

Die LDH-katalysierte Umwandlung von Lactat zu Pyruvat resultiert in der Reduktion von  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}/\text{H}^+$ . In der sich anschließenden, durch Diaphorase katalysierten Redoxreaktion, wird das gelbe Tetrazoliumsals (INT) zu rotem Formazan reduziert, welches photometrisch quantifiziert wird. Genauer im Text.

#### Probennahme und Aufbereitung

Der Zeitpunkt der Probennahme zur LDH-Messung ist in Abbildung 3.6 dargestellt. Nach 90 min Inkubation unter Normoxie oder Hypoxie wurde nach Zentrifugation bei 250x g für 1 min jeweils 300  $\mu\text{l}$  Medium zur LDH-Aktivitätsmessung abgenommen. Dieser Überstand wurde erneut bei 250x g für 4 min zentrifugiert, um eventuell mitabgenommene Zellbestandteile zu beseitigen und der erhaltene Überstand in einem neuen Eppendorf-Reaktionsgefäß bis zur Vermessung auf 4°C gehalten. Das restliche Medium wurde vorsichtig abgenommen und die Zellen in SDS-Lysepuffer P (siehe 2.3.8) resuspendiert, für 5 min bei 95°C und 450 rpm zur Denaturierung inkubiert und anschließend die Konzentration mittels Bradford (siehe 3.7.2) gemessen.

Wenn eine Reoxygenierung erfolgte (Abbildung 3.6B) wurde ebenfalls 300 µl Medium nach Normoxie/Hypoxie zur LDH-Aktivitätsmessung abgenommen und analog aufbereitet. Nach vollständiger Abnahme des Zellkulturmediums (siehe auch Abschnitt 3.4) wurden die Zellen in 1 ml Zellkulturmedium N homogenisiert. Nach 120 min Reoxygenierung wurde mit den Proben gleich Verfahren wie zuvor: Nach Zentrifugation bei 250x g für 1 min wurde jeweils 300 µl Medium zur LDH-Aktivitätsmessung abgenommen, dieses erneut bei 250x g für 4 min zentrifugiert und der Überstand in einem neuen Eppendorf-Reaktionsgefäß bis zur Vermessung auf 4°C gehalten. Das restliche Medium wurde ebenfalls vorsichtig abgenommen und das Pellet in entsprechendem Volumen SDS-Lysepuffer P (siehe 2.3.8) resuspendiert. Nach Denaturierung für 5 min bei 95°C und 450 rpm wurde anschließend die Konzentration mittels Bradford (siehe 3.7.2) gemessen. Bei den Proben, die nach Normoxie bzw. Hypoxie anschließend reoxygeniert wurden, setzt sich somit die LDH-Aktivität aus der gemessenen LDH-Aktivität nach Normoxie/Hypoxie und der gemessenen LDH-Aktivität nach Reoxygenierung zusammen.



### Abbildung 3.6 Probennahme zur LDH-Aktivitätsmessung

Die Probennahme zur LDH-Aktivitätsmessung erfolgte nach (A)/(B) 90 min Normoxie bzw. 90 min Hypoxie. (B) Erfolgte eine anschließende Reoxygenierung wurde erneut Medium zur LDH-Aktivitätsmessung nach 120 min Reoxygenierung abgenommen. Die LDH-Aktivität nach Normoxie- bzw. Hypoxie-Reoxygenierung ergibt sich somit aus der Summe der LDH-Aktivität nach 90 min Normoxie/Hypoxie und der LDH-Aktivität nach 120 min Reoxygenierung.

### Durchführung und Auswertung

Die LDH-Aktivitätsbestimmung wurde gemäß den Angaben des Herstellers (Promega) durchgeführt. Zunächst wurde eine Verdünnungsreihe der LDH-Positivkontrolle (siehe 2.3.4) für die spätere Standardkurve angefertigt. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe der im Kit enthaltenen LDH-Positivkontrolle mit equilibriertem Zellkulturmedium hergestellt. Für die Proben nach Normoxie und Reoxygenierung wurde eine Verdünnungsreihe mit Zellkulturmedium N für die Proben nach Hypoxie mit Zellkulturmedium H (weiterhin als Zellkulturmedium N/H bezeichnet) hergestellt. Hierfür wurde zunächst 1 µl LDH mit jeweils 2,5 ml Zellkulturmedium N/H gemischt, was einer Konzentration von 1600 U/ml entspricht. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe mit Zellkulturmedium N/H im Verhältnis 1:2 mit absteigenden LDH-Konzentrationen von 800 U/ml, 400 U/ml, 200 U/ml, 100 U/ml, 50 U/ml und 25 U/ml hergestellt. Jeweils 50 µl der Proben und der LDH-Verdünnungsreihe wurden dann in eine 96-Well-Mikrotiterplatte überführt. Zur Quantifizierung der Proben wurden auch 50 µl eines Nullabgleichs (Blank; B1) aufgetragen. Zum B1 wurde das entsprechende Zellkulturmedium verwendet. Jede Probe, LDH-Konzentration und der Nullabgleich wurden als Duplikate aufgetragen und später der Mittelwert berechnet. Anschließend wurde zu jedem Well

jeweils 50 µl des Substratmixes, der zuvor in 12 ml Probenpuffer gelöst wurde, hinzu pipettiert. Nach 30-minütiger Inkubation im Dunkeln bei RT wurde die Reaktion durch die im Kit enthaltene Stopp Lösung abgestoppt und die Absorption jedes Wells mit einem ELISA-Reader (Infinite F200 PRO, Tecan) bei einer Wellenlänge von 492 nm photometrisch gemessen.

Die Auswertung des Assay erfolgte zunächst mit der Software *Magellan 7* von Tecan. Dabei wurde von allen Duplikaten der Mittelwert berechnet sowie der Nullabgleich subtrahiert. Auf Grund der LDH-Standardkurve konnte für jede Probe die tatsächliche LDH-Konzentration (in U/ml) angegeben werden. Zu Normierungszwecken wurden diese Werte anschließend auf die gemessenen Konzentrationen der Kardiomyozytenlysate bezogen.

### 3.4.2 Colorimetrische Messung der Caspase-3-Aktivität

Die Caspase-3 stellt eine zentrale Komponente der Apoptose und der Caspase-Kaskade dar. Die Aktivität der Caspase-3 dient als charakteristischer Apoptosemarker<sup>336</sup>. Die Bestimmung der Caspase-3-Aktivität erfolgte mit dem *Caspase-3 Colorimetric Assay Kit* der Firma R&D Systems (siehe 2.3.5). Der kolorimetrische Test basiert auf der Hydrolyse von DEVD-pNA, einem Caspase-spezifischen Peptid konjugiert an das Reporter-Molekül p-Nitroanilin durch die Caspase-3<sup>337</sup>. Dies führt zur Freisetzung des Chromophors p-Nitroanilin (pNA), das spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm quantifiziert werden kann. Die Caspase-3-Enzymaktivität ist direkt proportional zur Freisetzung des pNA.

#### Durchführung und Auswertung

Die Messung der Caspase-3-Aktivität wurde gemäß den Angaben des Herstellers (R&D Systems) durchgeführt. Nach 90 min Inkubation unter Normoxie oder Hypoxie (siehe Abschnitt 3.4) und anschließender Reoxygenierung von 120 min wurden die Proben bei 250x g für 10 min zentrifugiert und der Überstand anschließend abgenommen. Das Zellpellet wurde im mitgelieferten Lyse Puffer homogenisiert. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde bei 10.000x g für 1 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die Konzentration mittels Bradford (siehe 3.7.2) gemessen und die Proben auf 4 mg/ml mit dem mitgelieferten Verdünnungspuffer eingestellt. Jeweils 50 µl (entsprechend 200 µg Protein) der Proben wurden zu Duplikaten in eine 96-Well-Mikrotiterplatte überführt. Zur Bestimmung eines Nullabgleichs (Blank, Bl) wurde zusätzlich 50 µl Verdünnungspuffer (als Duplikat) aufgetragen. In jedes Well wurde anschließend 50 µl Reaktionspuffer 3, der kurz zuvor mit 10 µl 1 M DTT pro 1 ml versetzt wurde, hinzu pipettiert. Die Reaktion wurde durch Zugaben von 5 µl des Caspase-3 kolorimetrischen Substrates (DEVD-pNA) gestartet. Im Nullabgleich wurden statt des DEVD-pNA Substrates 5 µl dH<sub>2</sub>O hinzu pipettiert. Nach Inkubation (Inkubator, Amersham pharmacia biotech) für 2 h bei 37°C wurde die Absorption jedes Wells mit einem ELISA-Reader (Infinite F200 PRO, Tecan) bei einer Wellenlänge von 405 nm photometrisch gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der Software *Magellan 7* von Tecan. Dabei wurde von allen Duplikaten der Mittelwert berechnet sowie der Nullabgleich subtrahiert. Da keine Standardkurve erstellt wurde, wurden die Ergebnisse als Erhöhung der Caspase-3-Aktivität im Vergleich zur Normoxie-Reoxygenierung des BK-WT berechnet und angegeben.

## **3.5 Isolation von Mitochondrien**

### **3.5.1 Isolation von Mitochondrien aus Ventrikel**

Die Isolation der Mitochondrien aus dem Ventrikel erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Frezza et al.<sup>338</sup> mittels differentieller Zentrifugation. Dabei werden die ventrikulären Mitochondrien (VM) durch mehrere aufeinanderfolgende Zentrifugationsschritte von Zelltrümmern, cytosolischen Proteinen und der Zellkernfraktion abgetrennt. Die Isolation erfolgte bei 4°C, um die Aktivierung von Phospholipasen und Proteasen zu minimieren. Zu Beginn der Isolation wurden die beiden Isolationspuffer 1 und 2 (IPm 1 und IPm 2), sowie 10 mM EDTA in PBS (EDTA/PBS) als auch 0,05% Trypsin-Lösung hergestellt (siehe Abschnitt 2.3.6) und mittels Eis auf 4°C gehalten. Nach Entfernen des Herzens wurde dieses unter dem Stereomikroskop in eiskalter 10 mM EDTA/PBS von Bindegewebe befreit. Die Vorhöfe wurden abgetrennt, die Ventrikel in kleine Stücke geschnitten und diese anschließend in einem 15 ml Falcontube in 0,05% Trypsin-Lösung inkubiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis, unter gelegentlichem Schütteln, erfolgte eine Zentrifugation für 8 min bei 4°C und 200x g. Der entstandene Überstand wurde entweder verworfen oder zur späteren Aufreinigung des Cytosols (siehe Abschnitt 3.5.3) auf 4°C gehalten. Das Pellet wurde in 2 ml eiskaltem IPm 1 resuspendiert, in den vorgekühlten Glas-Potter überführt und 50-mal durch drehende Auf- und Ab-Bewegung des Teflon-Stößels bei 4°C homogenisiert. Danach wurde die Suspension in ein 15 ml Falcontube überführt, der Glas-Potter zweimal mit je 1 ml eiskalter IPm 1 ausgespült und die gesamte vereinigte Suspension für 10 min bei 4°C und 700x g zentrifugiert. Das erhaltene Pellet mit der nuklearen Fraktion wurde verworfen und der Überstand auf zwei vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße (2 ml) aufgeteilt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 8.000x g wurde der Überstand entweder verworfen oder zur späteren Aufreinigung des Cytosols (siehe Abschnitt 3.5.3) mittels Eis auf 4°C gehalten. Die beiden Pellets wurden jeweils in 1 ml eiskaltem IPm 2 resuspendiert und vereinigt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 8.000x g wurde das erhaltene Pellet mit den Mitochondrien je nach Versuch weiterverarbeitet.

Erfolgte die Isolation zur respiratorischen Messung der Mitochondrien wurde das Pellet je nach Größe in 150 – 200 µl eiskalter IPm 2 vorsichtig homogenisiert und der Proteingehalt mittels Bradford (siehe 3.6) bestimmt. Die isolierten Mitochondrien wurden bis zu ihrer Vermessung auf 4°C gehalten. Wurden die Mitochondrien zur Western Blot Analyse weiter verarbeitet, wurde das Pellet entweder bis zur weiteren Verwendung auf flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert oder direkt mit entsprechendem Volumen an Lysepuffer (siehe 2.3.8) versetzt.

### **3.5.2 Isolation von Mitochondrien aus Kardiomyozyten**

Zur Isolation von Mitochondrien aus Kardiomyozyten (CMM) wurden zuerst Kardiomyozyten wie unter Abschnitt 3.3.2 beschrieben isoliert. Nach enzymatischer Perfusion des Herzens und anschließendem zerkleinern mit der Federschere wurden einzelne Kardiomyozyten durch vorsichtiges Homogenisieren mit einer 5 ml Stripette für 3 min herausgelöst. Anschließend wurde die Suspension in einem 15 ml Falcontube bei 100x g für 2 min und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde wie unter Abschnitt 3.5.1 beschrieben ebenfalls in 2 ml eiskalter IPm 1

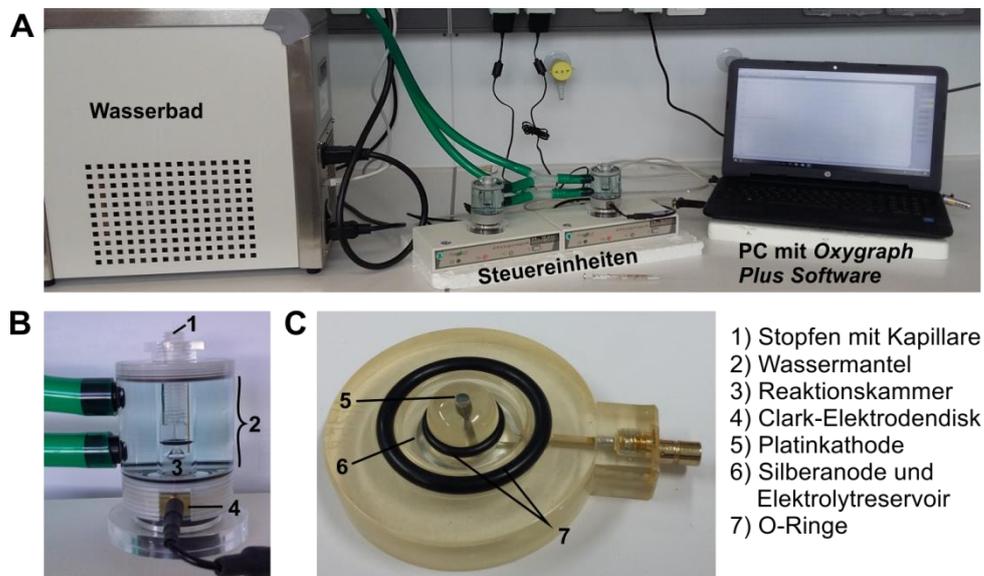
resuspendiert und die Mitochondrien weiter nach diesem Protokoll isoliert. Das entstandene Pellet mit den Mitochondrien wurde je nach Größe in 60 – 80 µl des entsprechenden Puffers (je nach Versuch; siehe Abschnitt 3.5.1) vorsichtig homogenisiert.

### **3.5.3 Aufreinigung des Cytosols**

Um aus einer Maus sowohl Mitochondrien als auch Cytosol zu gewinnen, wurden die erhaltenen Überstände bei der Mitochondrienisolation sowohl aus Ventrikel als auch aus Kardiomyozyten (s. Abschnitt 3.5.1 und 3.5.2) weiter verarbeitet. Die jeweils beiden entstanden Überstände wurden vereinigt und, um jegliche mitochondrialen und membranären Bestandteile zu entfernen, bei 100.000x g für 60 min in einer Ultrazentrifuge (SS34 RCSC plus, Sorvall, siehe 2.1.1) zentrifugiert. Die im Überstand befindlichen cytosolischen Proteine wurden anschließend durch eine Trichloressigsäure – Präzipitation (TCA-Präzipitation) gefällt. Dazu wurde der Überstand mit einem Zehntel Volumen eiskalter 100% Trichloressigsäure (TCA) versetzt und für 45 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 14.000 rpm wurde das entstandene Pellet mit eiskaltem 80% Aceton (-20°C) versetzt, um TCA Reste zu entfernen. Die Probe wurde gevortext und erneut für 10 min bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert. Der Aceton-Waschschritt wurde ein weiteres Mal wiederholt und anschließend wurde das Pellet bei RT für ca. 5 min getrocknet und für die SDS-PAGE (siehe Abschnitt 3.7.4) in entsprechender Menge Lysepuffer resuspendiert.

### 3.6 Respiratorische Messung isolierter Mitochondrien

Die respiratorische Messung isolierter Mitochondrien erfolgte polarographisch mit einer elektrochemischen Zelle, bekannt als Clark-Typ polarographischer Sensor<sup>339,340</sup> bei 37°C. Die Clark-Sauerstoffelektrode wurde von Chance und Williams<sup>341</sup> erstmals zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs isolierter Mitochondrien verwendet. In dieser Arbeit kamen zwei Clark-Elektroden-Einheiten von Hansatech Instruments (siehe 2.3.7) zum Einsatz, die in Abbildung 3.7 dargestellt sind. Das Messprinzip beruht auf der Messung von elektrischem Strom der durch Reduktion von molekularem Sauerstoff (O<sub>2</sub>) bei der Bildung von ATP (siehe Abbildung 1.1) an der Kathode entsteht.



**Abbildung 3.7 Messaufbau der respiratorischen Messungen und Clark-Elektrodendisk**

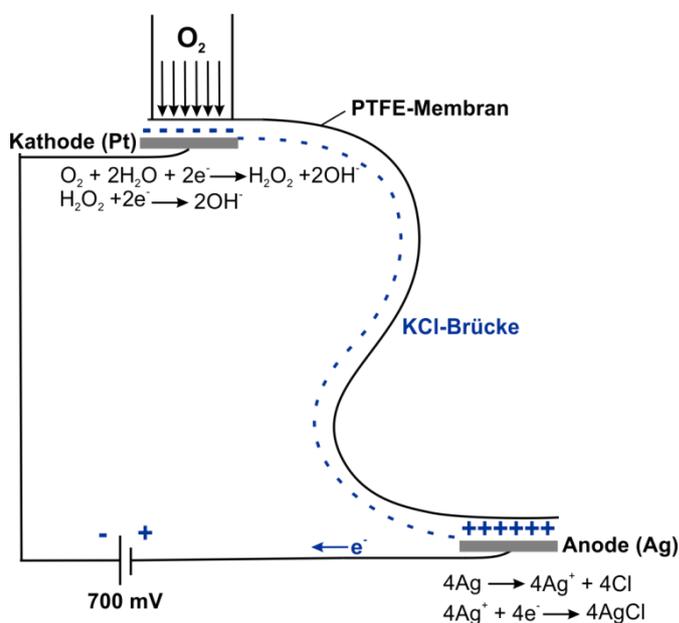
(A) Allgemeiner Aufbau der Respirationsmessung mit Wasserbad zur Temperierung und PC zur Aufnahme des Signals. (B) Die Elektrodenzelle befindet sich in einer verschließbaren Messkammer, die durch einen umgebenden Wassermantel auf 37°C temperiert und an die Steuereinheit angeschlossen wird. (C) Clark-Elektrodendisk im Detail mit Platinkathode (5), Silberanode und Elektrolytreservoir (6) sowie die beiden O-Ringe (7), die die PTFE-Membran fixieren und die Reaktionskammer luftdicht abschließen. Genaueres siehe im Text.

#### 3.6.1 Die Clark-Sauerstoffelektrode

##### Aufbau und Funktionsweise

Die Clark-Sauerstoffelektrode besteht aus einer in Epoxidharz eingefassten zentralen Platinkathode (2 mm Durchmesser) und einer konzentrischen Silberanode (siehe Abbildung 3.7C). Während die Platin-Kathode sich in einer Erhebung (Kuppel) befindet, ist die Silberanode in einer kreisförmigen Rille, die ein Elektrolytreservoir darstellt, eingelassen. Während der Messung sind Kathode und Anode durch eine 50%-ige gesättigte Kaliumchlorid (KCl)-Elektrolytlösung verbunden. Der Elektrolyt bildet mit Hilfe eines feinen Spacers (Zigarettenpapier), der als Papierdocht dient, eine Brücke zwischen Kathode und Anode. Über dem Spacer befindet sich eine, für Sauerstoff selektiv

durchlässige PTFE-Membran und beide werden durch einen O-Ring in ihrer Position gehalten. Vor jeder Messung musste die Elektrode neu präpariert werden (siehe weiter unten im Abschnitt). Wird die Elektrode nun mit der Steuereinheit verbunden und eine Spannung von etwa 700 mV angelegt, liefert dies die treibende Kraft für die Reaktion an der Platinkathode sowie Silberanode. Die ablaufende Reaktion an den Elektroden ist in Abbildung 3.8 dargestellt. Durch die angelegte Spannung wird das Platin (Pt) negativ (d.h. es wird zur Kathode) und das Silber (Ag) wird positiv (d.h. es wird zur Anode). Sauerstoff diffundiert durch die PTFE-Membran, wird an der Kathodenoberfläche reduziert und durch die KCl-Elektrolytbrücke entsteht ein Stromkreis. Das Silber wird dabei zu Silberchlorid oxidiert. Der erzeugte Strom ist direkt proportional zum Sauerstoffverbrauch im Reaktionsgefäß oberhalb der Platinkathode und durch gleichmäßiges elektromagnetisches Rühren wird die Probe optimal durchmischt, sodass eine Sauerstoffverarmung an der Platinkathode verhindert wird. Mit Hilfe der Elektrodensteuereinheit wird der erzeugte Strom in eine Spannung umgewandelt, digitalisiert und die Software *Oxygraph Plus* der Firma Hansatech Instruments zeichnet die Signale der Clark-Elektrode auf.



**Abbildung 3.8 Reaktionen an der Clark-Elektrode**

Die angelegte Spannung von 700 mV bewirkt eine Polarisation der Platinkathode (Pt). Sauerstoff kann durch die Membran diffundieren und wird an der Oberfläche der Kathode zu  $H_2O_2$  reduziert während das Silber (Ag) oxidiert wird. Der durch die KCl-Brücke entstandene Stromkreis ist proportional zum Sauerstoffverbrauch. Näheres im Text. Abbildung modifiziert nach *Hansatech Instruments Manuel*<sup>342</sup>.

### Bespannen und Kalibrieren der Elektrode

Da nur eine sorgfältig bespannte Elektrode reproduzierbare und interpretierbare Ergebnisse liefert und die Elektrode auf keinen Fall längere Zeit unbenutzt bespannt sein sollte, da der Elektrolyt sonst in die kleinen Poren des Epoxidharzes eindringen und ihn porös machen könnte, wurde die Elektrode an jedem Messtag neu bespannt und kalibriert. Zuerst wurde die Anode von Silberchlorid ( $AgCl_2$ )-Ablagerungen mittels Reinigungspaste aus dem Elektroden Reinigungsset (siehe 2.3.7) befreit, poliert und mit destilliertem Wasser gründlich abgespült, sodass keine Reste der Reinigungspaste zurück blieben. Mit einer Pipette wurde ein Tropfen KCl-Lösung auf die Kuppe der Kathode gegeben und weitere 3 – 4 Tropfen wurden in das Elektrolytreservoir auf der Anode verteilt. Anschließend wurde auf den Tropfen der Kathode der Spacer ( $2 \times 2 \text{ cm}^2$ ) gelegt, wodurch dieser gleichmäßig vom Elektrolyten durchtränkt wurde und somit als Papierdocht und Brücke zwischen Anode und Kathode

wirken konnte. Um die PFTE-Membran (ebenfalls  $2 \times 2 \text{ cm}^2$  groß) fettfrei zu halten, wurde diese anschließend mit einer Pinzette faltenfrei über den Spacer gelegt. Mit Hilfe des Membran-Applikators wurde der O-Ring über die Kuppe gedrückt bis er in der Einkerbung saß, wodurch die Membran straff über die Kuppe gezogen wurde. Es ist darauf zu achten, dass sich keine Falten und Luftblasen vor allem im Bereich der Kathode befinden, da dies die Empfindlichkeit der Elektrode beeinflusst und zu Fehlmessungen führt. Der zweite O-Ring wurde platziert, damit kein Sauerstoff von außen in die Messkammer eindringen kann und die Elektrode wurde in die Elektrodenkammer montiert. Nach Anschließen an das Wasserbad und equilibrieren auf  $37^\circ\text{C}$ , wurde die Elektrode kalibriert, um das erhaltene elektrische Signal als tatsächlich kalibrierte Einheit in  $\text{nmol/L}$  darstellen zu können. Dies erfolgte in zwei Schritten als Flüssigphasen-Kalibrierung mit luftgesättigtem deionisiertem Wasser ( $\text{dH}_2\text{O}$ ) und Natriumdithionit ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ). Das Signal von der Sauerstoffelektrode wird dabei auf zwei bekannte Sauerstoffkonzentrationen bezogen. Als erste Bezugskonzentration dient die in der Messkammer vorhandene Sauerstoffkonzentration in luftgesättigtem  $\text{dH}_2\text{O}$ , die bei jeder gegebenen Temperatur und atmosphärischem Luftdruck berechnet werden kann<sup>343</sup>. Dazu wird zu Beginn der Kalibrierung  $37^\circ\text{C}$  warmes luftgesättigtes  $\text{dH}_2\text{O}$  in die Messkammer eingefüllt sowie die Temperatur in der Messkammer ( $37^\circ\text{C}$ ) und der atmosphärische Druck ( $101,32 \text{ kPa}$ ) angegeben. Als zweiter Bezugswert dient der Sauerstoff Nullwert, der durch Zugabe von Natriumdithionit erreicht wird. Als starkes Reduktionsmittel verbraucht es den gesamten Sauerstoff in der Messkammer, sodass die Sauerstoffmessung nach Zugabe von  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  und erfolgter Sauerstoffreduktion dem Nullwert entspricht. Anhand dieser beiden Kalibrierungspunkte wird nun ein Kalibrierfaktor berechnet, der der gesamten Messung zugrunde liegt, und das elektrische Signal kann direkt in  $\text{nmol/L}$  angegeben werden.

#### 3.6.2 Basale Respirationsmessung

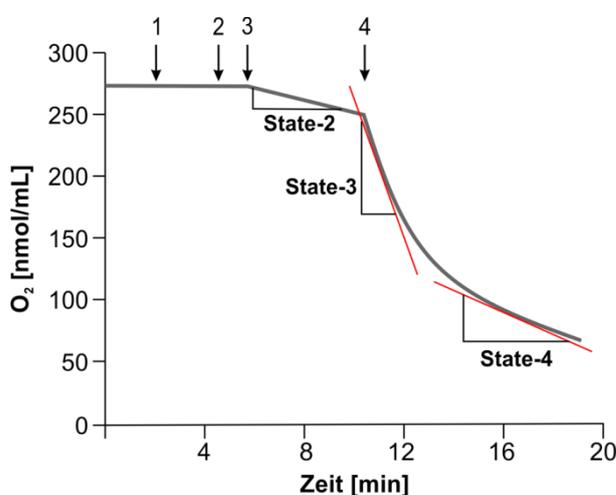
Nach erfolgreicher Kalibrierung und Isolation der Mitochondrien (siehe 3.5) wurde die Reaktionskammer mit  $500 \mu\text{l}$  des auf  $37^\circ\text{C}$  vorgewärmten und Sauerstoff-equilibriertem Respirationsmediums (RM, siehe 2.3.7) befüllt. Anschließend wurde die Reaktionskammer mit einem Stopfen verschlossen und die Messung gestartet. Der Stopfen enthielt im Inneren eine Kapillare, durch die genug Sauerstoff in die Reaktionskammer gelangte und durch die mit einer Hamilton-Spritze Substanzen verabreicht werden konnten. Durch langsames kontinuierliches Rühren mit einem PTFE-Magnetrührer wurde sichergestellt, dass der gelöste Sauerstoff sowie dazugegebene Substanzen gleichmäßig in der Probe verteilt wurden und es zu keiner Sauerstoffverarmung im Bereich der Kathode kam. Der kurze Anstieg bei Zugabe der Mitochondrien, pharmakologischen Substanzen, Substraten oder ADP kommt dabei durch eine leichte Irritation des polarographischen Sauerstoffsensors mittels Injektion der Hamilton-Spritze zustande. Nach Erreichen einer stabilen Grundlinie (ca. 3 min) wurden die Mitochondrien hinzu gegeben (siehe auch Abbildung 3.9). Hierbei ist nahezu kein Verbrauch an Sauerstoff zu beobachten, da sich im RM keine Substrate befinden und nur endogene Substrate von den Mitochondrien verbraucht werden. Der Sauerstoffgehalt in der Lösung bleibt konstant und wird als State-1 Atmung bezeichnet. Danach erfolgte die basale Atmungsmessung in Gegenwart verschiedener Substrate. Hier wurde die Atmung zum einen durch die gleichzeitige Gabe von Glutamat (Endkonzentration  $5 \text{ mM}$ ) und Malat (Endkonzentration  $2,5 \text{ mM}$ )

und zum anderen in einem zweiten Setup durch Gabe von Succinat (Endkonzentration 5 mM) stimuliert. Glutamat und Malat fungieren als Stimulatoren des Komplex I und müssen zuvor durch den TCA in der Matrix der Mitochondrien zur Bildung von NADH metabolisiert werden. Succinat hingegen stimuliert Komplex II, der direkt Elektronen auf Coenzym Q übertragen kann. Durch exogene Zugabe dieser Substrate erfolgt nun ein Verbrauch an Sauerstoff und Bildung von ATP (siehe auch Abbildung 1.1) charakterisiert durch ein Überschuss an Substraten. Dies wird als State-2 Atmung bezeichnet. Nach 4 min Messung erfolgte die Zugabe von ADP in einer Endkonzentration von 100  $\mu\text{M}$ . Es erfolgt nun ein hoher Verbrauch an Sauerstoff durch die ADP-stimulierte Bildung von ATP. Diese maximale durch ADP-stimulierte Atmung wird als State-3 Atmung bezeichnet und wird durch die katalytische Kapazität der Atmungskettenenzyme limitiert. Die State-3 Atmung geht schließlich durch den vollständigen Verbrauch des exogen zugegebenen ADPs in die State-4 Atmung über. Die State-4 Atmung liegt bei intakten Mitochondrien im Größenbereich der State-2 Atmung. Nach 5 min Messung wurde die Messung gestoppt. Vor jeder neuen Messung wurde gründlich mit deionisiertem Wasser gespült.

Wurde der Einfluss verschiedener pharmakologischer Substanzen wie NS11021 und 8-Br-cGMP (siehe 2.3.7) auf die basale Atmung untersucht, erfolgte deren Zugabe 1 min vor der Substratzugabe (siehe auch Abbildung 3.9). Als Kontrolle dienten für NS11021 identische Mengen des DMSO:RM-Gemisches und für 8-Br-cGMP identische Mengen deionisiertes  $\text{H}_2\text{O}$  um sicherzugehen, dass der Einsatz von DMSO (bzw.  $\text{H}_2\text{O}$ ) in dieser Konzentration nicht selbst einen Einfluss auf die Atmung ausübt.

### 3.6.3 Auswertung und respiratorischer Kontrollindex

Durch Anlegen von Tangenten<sup>344</sup> an State-2, -3 und -4 mit Hilfe der O2view Software von Hansatech konnte die Atmungsgeschwindigkeit über die Zeit bestimmt werden und somit der Sauerstoffverbrauch der vermessenen Mitochondrien über die Zeit ermittelt werden. Die Auswertung ist in Abbildung 3.9 dargestellt.



**Abbildung 3.9 Auswertung der respiratorischen Messungen**

Nach Erreichen einer stabilen Grundlinie erfolgte die Zugabe von (1) Mitochondrien, (2) pharmakologischen Substanzen, (3) Substrat (Glutamat und Malat oder Succinat) und (4) ADP. Durch Anlegen von Tangenten kann der Sauerstoffverbrauch über die Zeit in  $[\text{nmol}/\text{mL}/\text{min}]$  gemessen werden und der respiratorische Kontrollindex (RCR) als Quotient der State-3 Atmung zur State-4 Atmung berechnet werden. Genaueres im Text.

Der respiratorische Kontrollindex (RCR) wird als Quotient der State-3 Atmung zur State-4 Atmung berechnet. Er ist ein Maß für die Intaktheit der Mitochondrien und quantifiziert die Kopplung zwischen der Elektronentransportkette (Substratoxidation) und der oxidativen Phosphorylierung (ATP-Bildung). Der Wert des RCR ist dabei Substrat- und Gewebeabhängig. Er gibt Auskunft über mögliche Schäden der inneren Mitochondrienmembran und erlaubt Rückschlüsse auf die Funktionsfähigkeit der untersuchten Mitochondrien. Durch Schäden an der inneren Mitochondrienmembran wäre der Rückfluss von Protonen in die Matrix möglich, was zu einer Substratoxidation ohne ATP-Bildung führen würde. Dies hätte eine höhere State-4 Atmung und somit einen niedrigeren RCR zur Folge. Je niedriger der RCR ist, desto stärker ist die Schädigung der Mitochondrien.

## 3.7 Proteinbiochemie

### 3.7.1 Proteingewinnung aus Gewebe und Zellen

Zur Proteingewinnung aus Herzgewebe wurde das Herz wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben entnommen, mit eiskalter PBS durchspült sowie die Aorta und das Fettgewebe entfernt und das Herz entweder direkt weiterverarbeitet oder auf flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Proteinisolation wurde der SDS-Lysepuffer (siehe 2.3.8) verwendet. Dieser enthält SDS, ein anionisches Tensid das Proteine denaturiert sowie  $\beta$ -Mercaptoethanol, das zur Denaturierung beiträgt und die in den Proteinen enthaltene Disulfidbrücken zu freien Thiolen reduziert. Das SDS verleiht den Proteinen zusätzlich eine negative Ladung, die zur späteren Auftrennung im elektrischen Feld wichtig ist (s. 3.7.4). Das enthaltene PMSF dient als unspezifischer Serinproteaseinhibitor und verhindert die Degradation der Proteine. Zur Proteingewinnung wurde das Herz je nach Größe mit 800 – 1000  $\mu\text{l}$  SDS-Lysepuffer versetzt und mit einem Gewebehomogenisator (Ultra Turrax) für ca. 2 min und steigender Drehzahl homogenisiert. Zur vollständigen Denaturierung wurde das Lysat anschließend für 10 min bei  $95^{\circ}\text{C}$  erhitzt, durch Vortexen gemischt und bei 13000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neuen Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und, sofern keine Weiterverarbeitung erfolgte, bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Zur Proteingewinnung aus Kardiomyozyten wurden diese wie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben isoliert und am Ende 1 ml des Pellets, das die Kardiomyozyten enthält, in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation für 1 min bei 1500 rpm wurde das erhaltene Pellet direkt in SDS-Lysepuffer P suspendiert oder, wenn keine sofortige Weiterverarbeitung erfolgte, auf flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Anschließend wurden die suspendierten Kardiomyozyten für 5 min bei  $95^{\circ}\text{C}$  zur Denaturierung erhitzt und durch Vortexen gemischt. Zur Proteingewinnung aus Mitochondrien wurden diese nach Gewinnung (siehe 3.5) oder Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  je nach Größe des Pellets in 80 – 100  $\mu\text{l}$  SDS-Lysepuffer suspendiert, ebenfalls für 5 min bei  $95^{\circ}\text{C}$  zur Denaturierung erhitzt und anschließend durch Vortexen gemischt.

### 3.7.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinmenge erfolge nach der Methode von Marion Bradford<sup>345</sup>. Diese stellt auf Grund ihrer hohen Sensitivität noch immer eine wichtige Methode zur quantitativen photometrischen Bestimmung von Proteinkonzentrationen dar und basiert auf hydrophoben und ionischen Wechselwirkungen des Triphenylmethanfarbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau G-250 mit kationischen Aminogruppen basischer Seitenketten von Proteinen. Durch Komplexierung der Proteine mit diesem Farbstoff in saurer Lösung kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 470 nm (rot) zu 595 nm (blau). Diese Absorption kann mittels Photometer gemessen werden. Die Quantifizierung der Proben erfolgte gegen eine mit bovinem Serumalbumin (BSA) erzeugte Eichkurve. Zunächst wurden 95 µl dH<sub>2</sub>O in einer Einmalküvette vorgelegt und 5 µl Probe hinzu pipettiert. Anschließend wurden die Proben mit 1 ml Bradford-Lösung versetzt. Nach 5 min Inkubation im Dunkeln zur vollständigen Farbentwicklung wurden die Proben zweimal vermessen. Als Nullabgleich diente anstatt der 5 µl Probe 5 µl des entsprechenden Suspensionspuffers (SDS-Lysepuffer oder IPm2 bei respiratorischen Messungen).

### 3.7.3 Biochemische Analyse der Proteinlokalisierung in Mitochondrien

Um die Lokalisation eines Proteins in den Mitochondrien zu bestimmen, d.h. um zu spezifizieren ob sich ein Protein in der Matrix, im Intermembranraum oder der äußeren Mitochondrienmembran befindet wurde ein Verdau mit Proteinase K (Proteinase K *Protection Assay*) durchgeführt<sup>346</sup>. Die Proteinase K ist eine Serinprotease mit starker proteolytischer Aktivität und breiter Variabilität. Die frisch isolierten Mitochondrien aus Kardiomyozyten wurden nach dem letzten Zentrifugationsschritt (siehe Abschnitt 3.5.2) zu 1 µg/µl in isoosmotischem SEM-Puffer (siehe 2.3.8) resuspendiert. Anschließend wurde die Hälfte der Suspension mit 20 µg/ml Proteinase K versetzt, die andere Hälfte mit entsprechendem SEM-Puffer als Negativkontrolle und für 15 min auf Eis inkubiert. Da die Mitochondrien im isoosmotischen Puffer noch intakt sind, werden nur Proteine auf der äußeren Mitochondrienmembran proteolytisch gespalten. Die Proteinase K wurde anschließend durch Zugabe von PMSF in einer Endkonzentration von 2 mM gestoppt und für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 10.000x g für 15 min bei 4°C wurden die enthaltenen Pellets in entsprechendem Volumen Lysepuffer P resuspendiert, für 5 min bei 95°C zur Denaturierung der Proteine erhitzt und anschließend bis zur Western-Blot-Analyse bei -80°C weggefroren.

### 3.7.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient zur Auftrennung von Proteinen in einem elektrischen Feld. Dabei werden die Proteine nach ihrer Größe in einer Gelmatrix (Polyacrylamidgel) aufgetrennt. Auf Grund ihrer gleichmäßigen negativen Ladung, erhalten durch Komplexbildung mit Natriumdodecylsulfat (SDS), werden die Proteine ausschließlich nach ihrer Größe aufgetrennt. Größere Moleküle wandern wegen des höheren Widerstandes langsamer durch das Gel als kleinere Moleküle. Außerdem bewirkt SDS eine Denaturierung der Proteine. Die Gelmatrix entsteht durch radikalische Polymerisation von Polyacrylamid in speziellen Gelgieß-

Apparaturen, das über Bisacrylamid zu einem dreidimensionalen Geflecht quervernetzt wird. Ammoniumperoxidsulfatlösung (APS) dient als Radikalstarter und das enthaltene Tetramethylethyldiamin (TEMED) dient als Katalysator, durch den die Polymerisation des Gels gestartet wird. Bei der hier angewandten SDS-PAGE nach Laemmli<sup>347</sup> handelt es sich um ein diskontinuierliches System aus zwei Gelen: einem Trenngel (feinporig) und einem Sammelgel (grobporig). Zunächst werden die Proben im Sammelgel gemeinsam an der Grenze zum Trenngel konzentriert, bevor sie im Trenngel aufgetrennt werden. Zur Herstellung der Gele wurden zwei Glasplatten, die in einem Plastikkonstrukt zusammen gehalten wurden, in eine Gelgieß-Apparatur eingespannt. Zwischen den Glasplatten war ein Abstand von 0,75 cm, in die das Gel gegossen werden konnte. Zuerst wurde ein Trenngel (s. 2.3.8) zwischen die Glasplatten gegossen. Dieses wurde, um Luftblasen zu verhindern und eine glatte Oberfläche des Gels zu gewährleisten, mit Isopropanol beschichtet. Die Dichte des Trenngels richtet sich dabei nach der Größe der aufzutrennenden Proteine. Für kleinere Proteine wurde ein höherprozentiges dichteres Gel hergestellt während für größere Moleküle ein niedrigprozentiges Gel hergestellt wurde. Nach Auspolymerisieren des Trenngels wurde der Isopropanol vollständig entfernt und das 5% ige Sammelgel gegossen. Mit Hilfe von Kämmen entstanden hier Aussparungen (Taschen), in die später die Proben pipettiert werden konnten. Da die verwendeten Polyacrylamidgele am Vortag hergestellt wurden erfolgte die Aufbewahrung, um ein Austrocknen zu verhindern bei 4°C in feuchter Umgebung.

Die Konzentration der Proben wurde wie beschrieben nach Bradford gemessen (siehe 3.7.2). Anschließend wurden diese mit dH<sub>2</sub>O auf die gewünschte Konzentration von 80 µg eingestellt, mit 4 x Laemmli und enthaltenem DTT (siehe 2.3.8) versehen und für 10 min bei 95°C in einem Thermoschüttler bei 450 rpm erhitzt. Das im Laemmli enthaltene Dithiothreitol (DTT) reduziert Disulfidbrücken, wodurch es zur vollständigen Denaturierung kommt. Währenddessen wurden die Glasplatten kurz mit demineralisiertem Wasser abgespült und die Kämmen vorsichtig entfernt. Nach Einspannen der Gele in das Laufmodul der Elektrophoresekammer und Übersichten mit Elektrophorese-Puffer (1x Elphor, s. 2.3.8) wurden jeweils 20 µl Probe mit Hilfe einer Hamilton-Spritze in die Taschen eingebracht. Zusätzlich wurde ein Längenstandard (3 µl) mit eingefärbten Proteinfragmenten definierter Größe von 10 – 170 kDa aufgetragen. Anhand dieses Längenstandards lässt sich der Verlauf der Elektrophorese verfolgen und anschließend die Größe der detektierten Proteine abschätzen. Die Elektrophorese wurde zunächst bei einer angelegten Spannung von 80 V gestartet und, sobald die Proben nach ca. 20 min aus dem Sammelgel herausgewandert waren, wurde auf 120 V erhöht.

#### **3.7.5 Western-Blot**

Mit Hilfe des Western-Blots können Proteine aus einem Elektrophoresegel auf eine Membran übertragen werden. Dies ermöglicht eine Konservierung der Proteine für anschließende Identitäts- und Aktivitätsnachweise. Im Rahmen dieser Arbeit wurden hydrophobe Membranen aus Polyvenylidendifluorid (PVDF) verwendet. Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mit einem sogenannten Semidry-Blot vom Elektrophoresegel auf die Membran transferiert. Hierzu wurde die Anodenplatte ausreichend mit demineralisiertem Wasser befeuchtet. Anschließend legte man drei in Anodenpuffer I und zwei in Anodenpuffer II getränkte Filterpapiere (siehe 2.3.8) darauf.

Die PVDF-Membran wurde in Methanol und anschließend kurz in Anodenpuffer II getaucht, woraufhin sie auf die Filterpapiere gelegt wurde. Das Agarose-Gel aus der Gelelektrophorese wurde vorsichtig aus den Glasplatten entnommen und nach Abtrennen des Sammelgels auf die Membran gelegt. Darüber folgten fünf in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere und die mit demineralisiertem Wasser befeuchtete Kathodenplatte. Die Proteine wurden bei einer angelegten Stromstärke von 60 mA für 60 min, gefolgt von weiteren 15 min bei 90 mA (pro Gel), auf die Membran übertragen. Beim Blotting von Proteinen zur Detektion des BK-Kanals wurde zuerst eine Stromstärke von 80 mA für 90 min, gefolgt von 110 mA für 15 min pro Gel, angelegt. Die Membran wurde danach für eine Stunde in einer 5%igen Milchpulverlösung (siehe 2.3.8) zur Blockierung unspezifischer Bindestellen auf einem Schüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 10 min in 1x TBS-T wurde die Membran gegebenenfalls mit einem Skalpell zugeschnitten (um mehrere Proteine unterschiedlicher Größe auf einer Membran zu detektieren) und die entstandenen Membranen in die entsprechenden Antikörperlösungen (siehe 2.3.8) in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C auf einem Rotor. Die Antikörperlösung enthielt den Primärantikörper (siehe 2.3.8), welcher nun an spezifische Epitope der geblotteten Proteine auf der PVDF-Membran bindet. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal für jeweils 10 min mit 1x TBS-T gewaschen. Es folgte eine einstündige Inkubation mit einem Fluorophor-gekoppeltem Sekundärantikörper in 1x TBS-T (siehe 2.3.8) bei RT im Dunkeln. Im Anschluss wurde die Membran im Dunkel fünfmal für 5 min gewaschen und zwischen fusselreifen Tüchern getrocknet. Die Detektion der Proteine erfolgte mit dem EttanDige Imager oder dem Amersham Imager 600. Zur Auswertung und Quantifizierung der Proteine wurde die ImageQuant TL Software verwendet.

### 3.8 Adenovirale Transduktion adulter Kardiomyozyten

Die adenovirale Transduktion ermöglicht eine effiziente und stabile Genübertragung auf isolierte adulte Kardiomyozyten<sup>332,348,349</sup>. Die humanpathogenen Adenoviren sind unbehüllte Viren, die eine doppelsträngige lineare DNA enthalten. Diese kann leicht manipuliert werden und größere Inserts von bis zu 35 kb können eingebracht werden. Eine Vielzahl von Studien haben Adenoviren für den Gentransfer in neonatalen und adulten Kardiomyozyten eingesetzt und die Infektionseffizienz wurde für beide Zelltypen an die 100% beschrieben<sup>348</sup>. Die adenoviralen Vektoren (siehe 2.3.9) wurden von Frau Prof. Dr. Ulrike Naumann (Molekulare Neuro-Onkologie, Hertie-Institut für klinische Hirnforschung; Tübingen) hergestellt. Die Expression beider Vektoren wird durch den menschlichen CMV-Promotor (Cytomegalovirus) gesteuert. Der Ad-CMV-GFP Vektor codiert ein grün fluoreszierendes Protein (GFP), während der mitochondriale Ad-CMV-MTS-cGi500 Vektor den cGMP-Sensor cGi500<sup>350</sup> (cGMP-Indikator mit einer EC<sub>50</sub> von 500 nM für cGMP) codiert und an die Cytochrom C-Oxidase getagged ist. Dieses Konstrukt sollte spezifische Mitochondrienlokalisation zeigen. Der cGMP-Sensor cGi500 trägt die zwei cGMP-Bindungsstellen der cGKI, eingeschlossen zwischen CFP (*cyan fluoreszent protein*) und YFP (*yellow fluorescent protein*). Mittels Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer<sup>351</sup> (FRET; *Fluorescence resonance energy transfer*) kann nach erfolgreicher Transduktion cGMP in der Zelle bzw. in den Mitochondrien gemessen werden. Der Nachweis von cGMP basiert dabei auf einer Abnahme des FRET-Signals von CFP zu YFP bei der Bindung von cGMP<sup>232</sup>.

#### Durchführung

Zur adenoviralen Transduktion wurden die isolierten Kardiomyozyten (siehe 3.3.2) auf Laminin-beschichteten 24-well Platten ausgesät (siehe 2.3.9). Hierzu wurden die 24-well Platten zuvor mit autoklavierten Glas-coverslips ( $\varnothing$  12 mm) ausgelegt, diese mit Laminin (10  $\mu\text{g/ml}$ ) beschichtet und für ca. 3 h bei 37°C belassen. Vor Aussäen der Zellen wurde das Laminin von den Platten abgesaugt und zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellsuspension wurde dann je nach Ausbeute an Zellen auf 4 – 6 Wells verteilt und im Brutschrank bei 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Nach einer Stunde waren die Zellen adhärent, sodass ein Wechsel zum Zellkulturmedium N durchgeführt werden konnte. Anschließend wurden die Zellen mit einer *Multiplicity of infection* (MOI; Multiplizität der Infektion) von 30 des adenoviralen Vektors transfiziert. Die MOI gibt das Verhältnis von infektiösen Viruspartikeln zur Zellzahl an. Nach maximal 20 h wurde das Medium gewechselt. Zuvor wurde zweimal vorsichtig mit Zellkulturmedium N gewaschen um nicht verbrauchte Viruspartikel vollständig zu entfernen.

### 3.9 Anfärben von Mitochondrien mit MitoTracker® Orange CMTMRos

Die Färbung der Mitochondrien erfolgte mit dem MitoTracker® Orange CMTMRos (MitoTracker) der Firma Invitrogen (siehe 2.3.10), ein Fluoreszenzfarbstoff der selektiv aktive Mitochondrien anfärbt. Als ein Derivat des Tetramethylrosamins enthält er Thiol-reaktive Chloromethyl-Gruppen, die nach aktiver Aufnahme in die Mitochondrien mit Thiolverbindungen von Proteinen und Peptiden der Atmungskette reagieren. Während der Inkubation mit dem Farbstoff erfolgt ein passiver Transport des MitoTrackers durch die Plasmamembran. Darüber hinaus wird die Färbung der Mitochondrien auch nach der Fixierung beibehalten<sup>352</sup>.

#### Durchführung

Der MitoTracker® Orange CMTMRos (50  $\mu\text{g}$ ) wurde für ca. 20 min bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend steril in Dimethylsulfoxid (DMSO) zu einer Endkonzentration von 1 mmol/L gelöst. Zunächst wurde eine 1 mM Stammlösung in Zellkulturmedium N hergestellt und diese dann mit Zellkulturmedium N auf 25 nM verdünnt (siehe 2.3.10). Anschließend wurde von den transfizierten Zellen (siehe Abschnitt 3.8) das Medium abgenommen und dieses durch je 1 ml Zellkulturmedium N mit 25 nM MitoTracker ersetzt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  im Brutschrank wurden die Zellen zweimal mit Zellkulturmedium N gewaschen und anschließend für 20 min mit 4% Paraformaldehyd-Lösung (PFA) bei RT und im Dunkeln fixiert (siehe 2.3.9). Um die Autofluoreszenz zu verringern, wurden die Zellen anschließend in Sudan Schwarz Lösung inkubiert<sup>353,354</sup>. Dazu wurden die Coverslips zuerst drei-mal 8 min in PBS gewaschen, anschließend für 5 min in 0,06% Sudan Schwarz Lösung inkubiert und nach erneutem dreimaligem Waschen für 8 min wurden die Zellen in einer ImmuMount-Hoechst-Lösung (siehe 2.3.9) eingebettet. Hoechst interkaliert mit der DNA und dient somit zur Kernfärbung. Die Aufnahme repräsentativer Bilder erfolgte zeitnah an einem Fluoreszenzmikroskop (AxioImager Z1, Zeiss). Als Negativkontrolle dienten Zellen, die gleich lange in Kultur gehalten wurden. Sie wurden ebenfalls in 4% PFA für 20 min fixiert, anschließend in Sudan Schwarz-Lösung inkubiert und mit ImmuMount-Hoechst-Lösung eingebettet. Sie wurden jedoch nicht transfiziert und nicht mit MitoTracker angefärbt.

### 3.10 Statistik

In den dargestellten Diagrammen sind alle erhobenen Ergebnisse als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) dargestellt und, sofern nicht anders angegeben, sind alle Statistiken mit *Microsoft Excel 2010* und *Microsoft Excel 2013* vorgenommen worden. Signifikanzberechnungen wurden mit Hilfe eines ungepaarten zweiseitigen Student's t-test durchgeführt. Erhaltene p-Werte  $<0,05$  wurden als statistisch signifikant,  $<0,01$  als hoch signifikant und p-Werte  $<0,001$  als höchst signifikant betrachtet und mit der entsprechenden Anzahl an Sternen (\*), Rauten (#) oder Paragraphen (§) gekennzeichnet (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ ). Nicht signifikante Unterschiede  $p>0,05$  sind nicht gekennzeichnet.



## 4 Ergebnisse

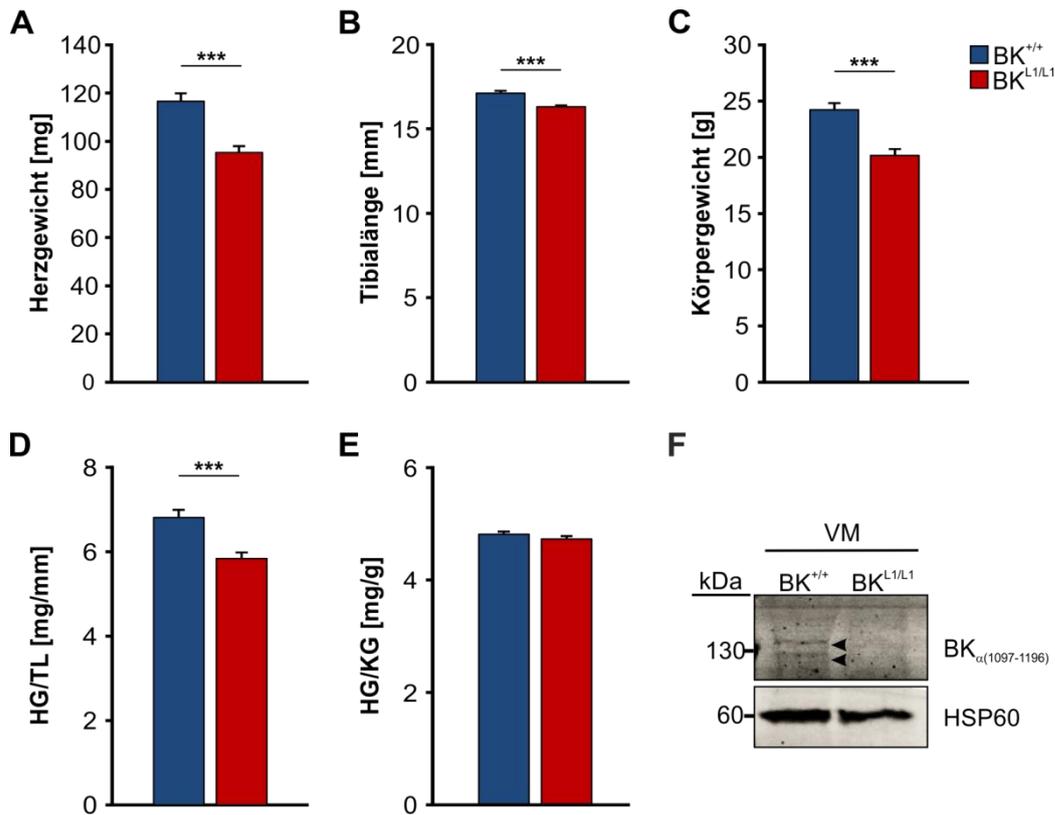
Vorrausgegangene Arbeiten implizieren, dass der mitoBK in Kardiomyozyten eine wichtige Komponente des Zellüberlebens bei Hypoxie-Reoxygenierung darstellt und an der Kardioprotektion durch Stimulation des cGMP-Signalwegs beteiligt sein könnte (siehe Abschnitt 1.7.4 und 1.7.5). Eine aktuelle *in vivo* Studie postuliert, dass der mitoBK kardioprotektiv wirkt<sup>355</sup>. Es wird darüber hinaus vermutet, dass das kardioprotektive Signal über cGMP/cGKI an den mitoBK weitergeleitet wird, jedoch ist die genaue Signalübertragung noch unklar. In diesem Zusammenhang wird eine über mitoBK-vermittelte Entkopplung der Elektronentransportkette und damit ROS-Bildung diskutiert<sup>116,218</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit wurde schwerpunktmäßig der Zusammenhang zwischen dem mitoBK und der Elektronentransportkette sowie die Rolle des mitoBKs bei *in vitro* Hypoxie-Reoxygenierung für das Überleben isolierter Kardiomyozyten untersucht.

### 4.1 Allgemeine Herzparameter der Versuchstiere und Untersuchungen zur mitochondrialen Lokalisation des BK-Kanals

#### 4.1.1 Einfluss einer globalen BK-Deletion auf die Herzgröße und Expression des mitoBKs

Um den Einfluss einer globalen BK-Deletion auf das Herz zu untersuchen wurden Herzen von globalen BK-WT und BK-KO Tieren im Alter von ca. 12 Wochen entnommen und gewogen (siehe 3.3.1). Um potentielle Unterschiede in der Größe und dem Gewicht des Tieres sowie zwischen den Geschlechtern zu eliminieren wurde das Herzgewicht (HG) zum einen auf die Tibialänge (HG/TL) und zum anderen auf das Körpergewicht (HG/KG) normiert (Abbildung 4.1). Sowohl die isoliert betrachteten Herzgewichte als auch die Tibialängen und die Körpergewichte wiesen zwischen den Genotypen hoch signifikante Unterschiede auf (Abbildung 4.1A – E). Die globalen BK-KO Tiere zeigten mit  $95,3 \pm 2,7$  mg ein signifikant niedrigeres Herzgewicht, eine signifikant kürzere Tibia von  $16,31 \pm 0,08$  mm und ein signifikant verringertes Körpergewicht mit  $20,2 \pm 0,60$  g im Vergleich zu ihren WT-Wurfgeschwistern (HG:  $116,6 \pm 3,3$  mg; TL:  $17,12 \pm 0,14$  mm; KG:  $24,2 \pm 0,60$  g). Diese signifikanten Unterschiede waren auch nach Normierung der Herzgewichte auf die Tibialängen zu beobachten (Abbildung 4.1D), wohingegen die Normierung der Herzgewichte auf die Körpergewichte diesen signifikanten Unterschied nicht bestätigen konnte (Abbildung 4.1E).

Die globale Deletion des BK-Kanals hat offensichtlich einen erheblichen Einfluss auf die untersuchten Parameter. Die Betrachtung der weiblichen und männlichen Tiere getrennt änderte nichts an diesen Befunden (*Daten nicht gezeigt*).



**Abbildung 4.1 Herz-, Größen- und Gewichtsparameter von BK-WT und BK-KO Tieren sowie ventrikuläre Expression des mitoBKs**

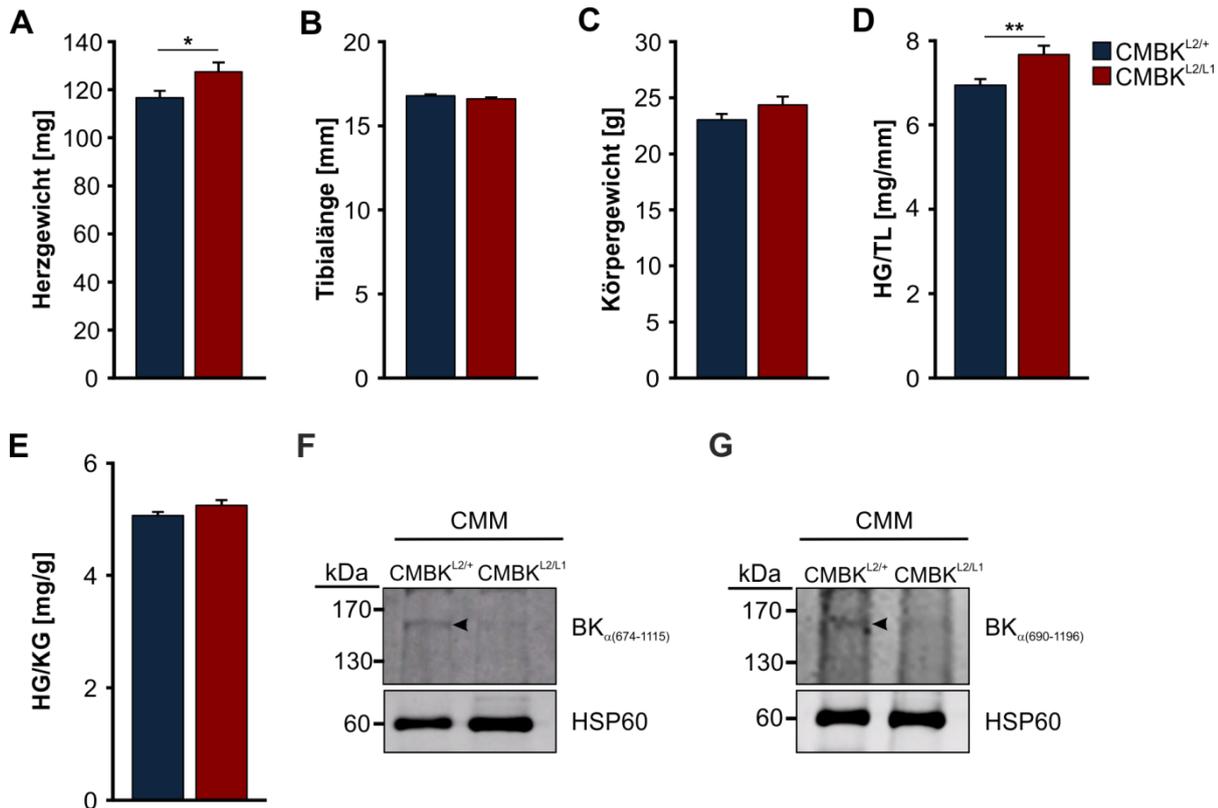
Bestimmung (A) des Herzgewichts (HG), (B) der Tibialänge (TL) und (C) des absoluten Körpergewichts (KG) von BK-WT und BK-KO Mäusen. (D) Herzgewicht-Tibialängen (HG/TL)-Verhältnis und (E) die Normierung der Herzgewichte auf die Körpergewichte (HG/KG) beider Genotypen. BK-WT (BK<sup>+/+</sup>); BK-KO (BK<sup>L1/L1</sup>) mit je n=21. (F) Immunreaktive Banden, die dem vorhergesagten Molekulargewicht des BK-Kanals (ca. 130 kDa) entsprechen, wurden nur in mitochondrialen Proteinlysaten die aus BK-WT Ventrikelgewebe (ventrikuläre Mitochondrien; VM) gewonnen wurden nachgewiesen (schwarze Pfeile), während mitochondriale Lysate aus BK-defizienten Ventrikeln BK-negativ blieben. Durch die Identifizierung des mitochondrialen Hitzeschockproteins 60 (HSP60) wurde eine gleichmäßige Beladung der Proben bestätigt. Dieser Western-Blot wurde bereits in Soltysinska et al. 2014<sup>271</sup> veröffentlicht. Ein Protein-Marker wurde verwendet um die Größen der jeweiligen Proteine zu schätzen (*nicht gezeigt*). Balken repräsentieren Mittelwerte ± SEM; \*\*\*p<0,001.

Zur Untersuchung der mitochondrialen BK-Kanal Expression wurden Mitochondrien wie in Abschnitt 3.5.1 beschrieben aus BK-WT und BK-KO Ventrikeln isoliert und mittels Western-Blot-Analyse (siehe Abschnitt 3.7.5) untersucht. Der BK-Kanal wurde mit einem gut etablierten BK-spezifischen Antikörper (siehe 2.3.8), der gegen eine spezifische C-Terminale Sequenz der  $\alpha$ -Untereinheit des plasmamembranären BK-Kanals gerichtet ist, detektiert. In den BK-WT VM-Proben konnten zwei Banden bei ca. 130 kDa (Abbildung 4.1F, schwarze Pfeile) detektiert werden, während die VM-Proteinlysate der BK-defizienten Tiere BK-negativ waren. Das Molekulargewicht der immunreaktiven Banden weist darauf hin, dass der mitoBK nahezu dieselbe molekulare Größe wie plasmamembranäre BK-Kanäle von anderen Zellen aufweist. Die mitochondriale Lokalisation des BK-Kanals wird gestützt durch die ergänzend durchgeführten Western-Blot-Analysen zur Reinheit der isolierten Mitochondrien (Anhang Abbildung 7.1). Der membranständige  $\beta_1$ -Adrenorezeptor ( $\beta_1$ -AR) und  $\alpha$ -Tubulin, ein Hauptbestandteil der Mikrotubuli, dienten hierbei als Markerproteine für

die membranäre bzw. cytosolische Proteinfraction und sollten Verunreinigung der Mitochondrienlysate ausschließen. Im Gesamtproteinlysat der Herzen (HL) konnten erwartungsgemäß Banden des  $\beta_1$ -AR und  $\alpha$ -Tubulins detektiert werden. In den mitochondrialen Proteinlysaten waren diese Markerproteine dagegen nicht zu detektieren (Anhang Abbildung 7.1A). Der Nachweis der mitochondrialen Proteine Komplex I und Cytochrom-C-Oxidase (COX IV) erfolgte in allen Proben; mit einer deutlich erkennbaren Anreicherung in den mitochondrialen Fraktionen (Anhang Abbildung 7.1A). Im aufgereinigten Cytosol der Kardiomyozyten (siehe Abschnitt 3.5.3) konnte die cytosolische Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) aber nicht der mitochondriale Komplex I detektiert werden (Anhang Abbildung 7.1B). Die Ergebnisse dieser Western-Blot-Analysen implizieren, dass die isolierten Mitochondrien frei von membranären sowie cytosolischen Verunreinigungen sind und die Isolationsmethode der Mitochondrien geeignet ist, um Rückschlüsse bezüglich der mitochondrialen Lokalisation des BK-Kanals zu ziehen.

#### **4.1.2 Einfluss der Kardiomyozyten-spezifischen BK-Deletion auf die Herzgröße und Expression des mitoBKs**

Neben globalen BK-defizienten Mäusen wurden auch Mäuse mit einer Kardiomyozyten-spezifischen Deletion des BK-Kanals (CMBK-KO) und deren Wurfgeschwisterkontrolltiere (CMBK-CTR) analysiert (siehe Abschnitt 3.1.2). Von diesen Tieren wurden ebenfalls die Körper- und Herzgewichte sowie die Tibialängen bestimmt und Expressionsuntersuchungen des BK-Kanals in Mitochondrien aus Kardiomyozyten (CMM) vorgenommen. Makroskopisch zeigten die CMBK-defizienten Tiere zunächst keinen auffälligen Phänotyp. Interessanterweise lag die Überlebenszeit der Myh6-Cre transgenen Mäuse, unabhängig von der BK-Kanaldeletion, bei ca. einem Jahr, während bei den globalen BK-defizienten Mäusen keine verkürzte Lebenszeit zu beobachten war (*Daten nicht gezeigt*). Dies spricht für eine toxische Wirkung der kardialen Myh6-Cre-Expression im Herzen. Es beeinträchtigt die Versuche jedoch nicht, da Mäuse im Alter von 8 – 12 Wochen analysiert wurden. Im Alter von ca. 12 Wochen zeigte die Analyse der Herzgewichte Unterschiede auf (Abbildung 4.2A). Das Herzgewicht der CMBK-KO Tiere war mit  $127,5 \pm 3,9$  mg im Vergleich zu den CMBK-CTR Tieren ( $116,7 \pm 2,8$  mg) hochsignifikant erhöht. Die Tibialänge und das Körpergewicht der Genotypen war jedoch nahezu identisch (Abbildung 4.2B und C). Die entsprechenden Mittelwerte sind im Anhang (Tabelle 7.1) zu finden. Die Normierung auf die Tibialängen (HG/TL) bestätigte den hochsignifikanten Unterschied (Abbildung 4.2D), wohingegen die Normierung auf die Körpergewichte (HG/KG) diesen Unterschied zwischen den Genotypen nicht bestätigen konnte (Abbildung 4.2E; CMBK-CTR:  $5,07 \pm 0,06$  mg/g; CMBK-KO:  $5,25 \pm 0,09$  mg/g). Die Betrachtung der weiblichen und männlichen Tiere getrennt, ergab nur für das HG/TL-Verhältnis der männlichen Tiere einen signifikanten Unterschied (CMBK-CTR:  $6,95 \pm 0,14$  mg/mm; CMBK-KO:  $7,67 \pm 0,21$  mg/mm; siehe auch Anhang Tabelle 7.1).



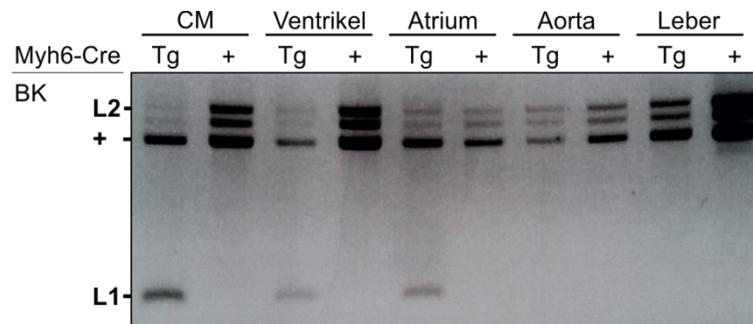
**Abbildung 4.2 Herz-, Größen- und Gewichtsparameter von CMBK-CTR und CMBK-KO Mäusen sowie Expression des mitoBKs in kardiomyozytären Mitochondrien**

Bestimmung (A) des Herzgewichts (HG), (B) der Tibialänge (TL) und (C) des absoluten Körpergewichts (KG) von CMBK-CTR und CMBK-KO Mäusen. (D) Herzgewicht-Tibialängen (HG/TL)-Verhältnis und (E) die Normierung der Herzgewichte auf die Körpergewichte (HG/KG) beider Genotypen. CMBK-CTR (CMBK<sup>L2/+</sup>) n=25; CMBK-KO (CMBK<sup>L2/L1</sup>) n=23. (F) und (G) zeigen immunreaktive Banden der  $\alpha$ -Untereinheit des BK-Kanals, die nur in mitochondrialen Proteinfraktionen (Mitochondrien aus Kardiomyozyten; CMM) aus CMBK-CTR (schwarze Pfeile) nachgewiesen wurden, während mitochondriale Lysate aus CMBK-KO BK-negativ blieben. Die verwendeten Antikörper waren (F) aus Eigenherstellung und (G) von NeuroMab (clone L6/60). Durch die Identifizierung des mitochondrialen Hitzeschockproteins 60 (HSP60) wurde eine gleichmäßige Beladung der Proben bestätigt. Ein Protein-Marker wurde verwendet um die Größen der jeweiligen Proteine zu schätzen (*nicht gezeigt*). Balken repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM; \*\*p<0,01; \*p<0,05.

Zur Untersuchung der mitochondrialen BK-Kanal Expression in CMBK-CTR Mäusen wurden Mitochondrien aus Kardiomyozyten (CMM) wie in Abschnitt 3.5.2 beschrieben isoliert und mittels Western-Blot-Analyse (siehe Abschnitt 3.7.5) untersucht. Der BK-Kanal wurde mit zwei unterschiedlichen BK-spezifischen Antikörpern (siehe 2.3.8) die jeweils gegen eine spezifische C-Terminale Sequenz der  $\alpha$ -Untereinheit des plasmamembranären BK-Kanals gerichtet sind detektiert. Mit beiden Antikörpern konnte eine immunreaktive Bande (Abbildung 4.2F und G, schwarze Pfeile) in den CMM-Proben von CMBK-CTR Herzen detektiert werden, während die entsprechenden CMBK-KO Proben BK-negativ waren. Die detektierte Proteinbande der CMBK-CTR Lysate war jeweils auf Höhe von ca. 150 kDa sichtbar. Auf Grund der vorherigen Reinheitsbestimmungen der isolierten Mitochondrien mittels Western-Blot-Analyse (Anhang Abbildung 7.1) kann auch hier auf eine mitochondriale Lokalisation des BK-Kanals geschlossen werden.

## 4.2 Spezifität der Myh6-Cre-Rekombinase

Zur Generierung der Kardiomyozyten-spezifischen BK-Mutanten wurden transgene Tiere mit der gewebespezifischen Myh6-Cre-Rekombinase mit BK<sup>L2/L2</sup> Mäusen verpaart, bei denen das Exon 7 des BK-Gens von zwei loxP-Sequenzen flankiert ist (siehe Abschnitt 3.1.2). Diese loxP-Stellen dienen wiederum als Erkennungs- und Schnittstellen für die Cre-Rekombinase. Die durch entsprechende Verpaarung erhaltenen Tiere wurden hinsichtlich der Gewebespezifität der verwendeten Cre-Rekombinase untersucht. Die eingesetzte Myh6-Cre stellt dabei eine weitverbreitete etablierte Rekombinase zur gezielten Ausschaltung von Genen bzw. Genabschnitten in Kardiomyozyten dar<sup>330</sup>. Nach erfolgter DNA-Isolation aus Kardiomyozyten, Ventrikel und Atrium sowie Kontrollgeweben (Aorta und Leber) von Myh6-Cre transgenen (Myh6-Cre<sup>Tg/+</sup>; Tg) und nichttransgenen (Myh6-Cre<sup>+/+</sup>; +) BK-CTR (*Genotyp*: BK<sup>L2/+</sup>) Mäusen und Amplifizierung mittels PCR (siehe Abschnitt 3.3.1 und 3.3.3) wurden die Amplifikate anschließend mit der Agarose-Gelelektrophorese detektiert (siehe Abschnitt 3.2.3). Durch herzspezifische Cre-Rekombinase Aktivität resultierte die Deletion des geflochtenen BK-L2-Allels ausschließlich in den Kardiomyozyten (Abbildung 4.3). Sowohl in den Kardiomyozyten (CM) als auch im Ventrikel und Atrium war eine deutliche L1-Bande zu erkennen, was die erfolgreiche Generierung des BK-Knockoutallels in den Myh6-Cre-transgenen Tieren zeigt. Durch die Analyse der Kontrollgewebe Aorta und Leber ließ sich die hohe Gewebespezifität sicherstellen. Entsprechend konnte hier neben dem BK-Wildtypallel (+) nur das unveränderte geflochte BK-Allel (L2) detektiert werden.



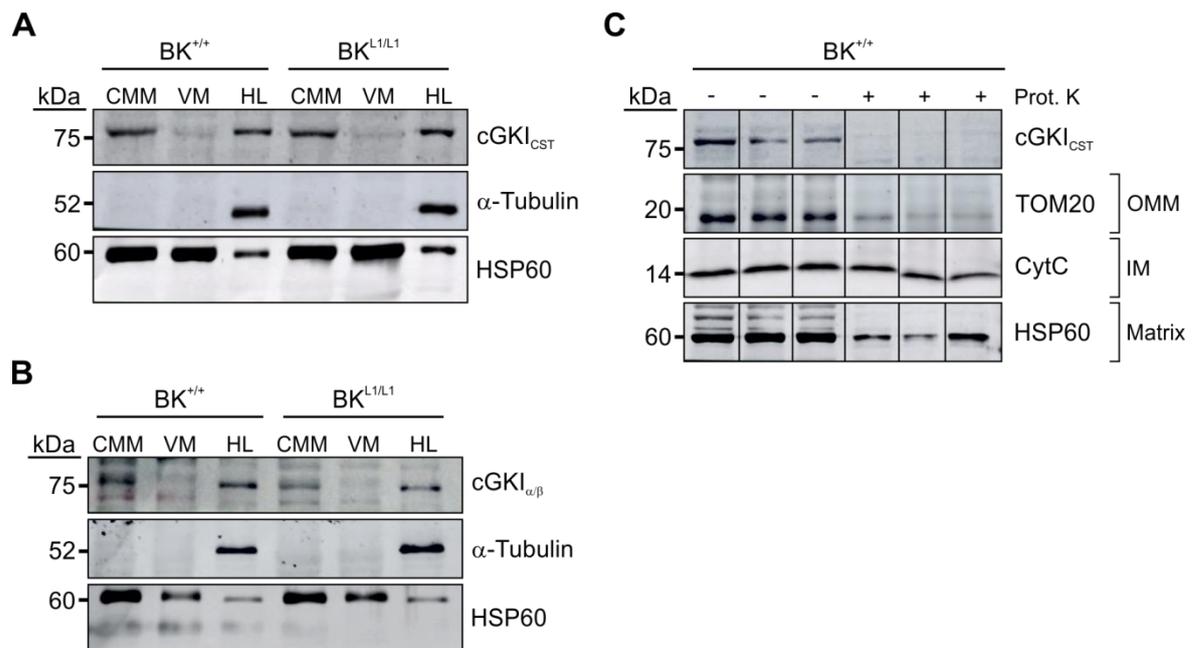
**Abbildung 4.3 PCR-Analyse der Myh6-Cre-induzierten Deletion des BK-Kanals**

Die erfolgreiche Generierung des Knockouts wurde in isolierten adulten Kardiomyozyten (CM), Ventrikel und Atrium durch die Amplifikate der BK-WT- (+) und BK-KO- (L1) Allele verdeutlicht. Im Gegensatz dazu war in der Aorta und in der Leber der untersuchten Myh6-Cre<sup>Tg/+</sup> BK<sup>L2/+</sup>-Tiere keine Rekombination erkennbar. Tg: transgen; +: nicht transgen; L2: geflochtenes BK-Allel +: BK-WT Allel; L1: BK-KO Allel; BK (L2): 577 bp, BK (+): 466 bp, BK (L1): 132 bp

### 4.3 Analyse der cGKI-Lokalisation in kardialen Mitochondrien

Es wurde bereits gezeigt, dass die cGKI eine wichtige Rolle in der kardioprotektiven cGMP-abhängigen Signaltransduktion spielt und dass der BK-Kanal in anderen Zelltypen (z.B. Glattmuskelzellen und Nierenzellen) direkt durch die cGKI phosphoryliert werden kann<sup>192,196,296</sup>. Drei Serinreste am C-Terminus der  $\alpha$ -Untereinheit des BK-Kanals wurden als Phosphorylierungsstellen *in vitro* identifiziert<sup>297</sup> (siehe auch Abschnitt 1.6.4 und 1.7.3). Der genaue Mechanismus, wie das Signal der cytosolischen cGKI über die OMM zum mitoBK in der IMM transferiert wird, ist noch unklar. Es könnte zum einen, wie beim plasmamembranären BK-Kanal, eine direkte Phosphorylierung des mitoBKs durch die cGKI erfolgen. Dabei müsste die bereit aktivierte cGKI an die IMM gelangen oder dort durch cGMP aktiviert werden. Alternativ könnte die cytosolische cGKI ein bislang unbekanntes, zwischengeschaltetes Protein phosphorylieren, wodurch ein kardioprotektives cGMP-Signal an den mitoBK weitergeleitet wird. Dass es einen Zusammenhang zwischen der cGMP/cGKI-abhängigen Signaltransduktion und der Funktion von  $K^+$ -Kanälen gibt konnte bereits für den mitoK<sub>ATP</sub>-Kanal gezeigt werden<sup>218</sup>. Um zu überprüfen, ob die cGKI mit den Mitochondrien assoziiert ist oder sich sogar im mitochondrialen IM oder der Matrix befindet, wurde im Folgenden die Lokalisation der cGKI im Herzen und insbesondere in kardialen Mitochondrien mittels Western-Blot-Analyse untersucht.

Zunächst wurde die Expression der cGKI in Mitochondrienlysaten (CMM und VM; Isolation siehe Abschnitt 3.7.1) und gesamten Herzproteinlysaten (HL) von BK-WT (BK<sup>+/+</sup>) und BK-KO (BK<sup>L1/L1</sup>) Tieren untersucht. Mit zwei unterschiedlichen spezifischen cGKI-Antikörpern (Abbildung 4.4A: cGKI-Antikörper von Cell Signaling Technology (CST); Abbildung 4.4B: cGKI-Antikörper von Prof. Hofmann, München (cGKI <sub>$\alpha/\beta$</sub> ); siehe auch 2.3.8) wurde mittels Western-Blot-Analyse die cGKI detektiert. Die verwendeten Antikörper waren gegen beide Isoformen der Kinase (cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$ ) gerichtet. Dabei war in beiden Genotypen sowohl in den CMM-Proben als auch in den HL-Proben mit beiden cGKI-Antikörpern eine deutliche Proteinbande bei ca. 75 kDa, was dem Molekulargewicht der cGKI entspricht, sichtbar. Auch in den VM-Proben konnte eine schwache Proteinbande detektiert werden (Abbildung 4.4A und B). Dass die Proteinbanden in den mitochondrialen Lysaten nicht durch membranäre oder cytosolische Verunreinigungen zustande kamen wurde durch Detektion des cytosolischen  $\alpha$ -Tubulins auf derselben Membran deutlich. Außerdem haben die vorrausgegangenen Experimente bereits die Reinheit der isolierten Mitochondrien bestätigt (siehe Anhang Abbildung 7.1). Zusätzlich wurde HSP60 als Ladungskontrolle detektiert. Erwartungsgemäß war eine deutliche Anreicherung des mitochondrialen HSP60-Proteins in den CMM- und VM-Proben im Vergleich zu den HL-Proben zu beobachten (Abbildung 4.4A und B). Dieses Experiment wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Für jedes Experiment wurden neue CMM- sowie VM- und HL-Proben aus BK-WT bzw. BK-KO Tieren isoliert und anschließend Western-Blot-Analysen mit beiden spezifischen cGKI-Antikörpern durchgeführt. Die in Abbildung 4.4A und B dargestellten Befunde wurden auch in den weiteren Experimenten bestätigt. Die weiteren Western-Blot-Analysen sind im Anhang (Abbildung 7.2A – D) abgebildet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen erlauben somit die Feststellung, dass die cGKI mit den Mitochondrien assoziiert ist.



#### Abbildung 4.4 Lokalisation der cGKI in kardialen Mitochondrien

(A) und (B) Repräsentative immunreaktive Banden ( $n=3$ , siehe auch Anhang Abbildung 7.2), die dem vorhergesagten Molekulargewicht (ca. 75 kDa) der cGKI entsprechen, konnten sowohl in mitochondrialen Proteinfraktionen aus Kardiomyozyten (CMM) und Ventrikel (VM) als auch im Herzlysat (HL) nachgewiesen werden. Dabei wurden spezifische cGKI-Antikörper (A) von Cell Signaling Technology (CST) und (B) von Prof. Hofmann, München (cGKI<sub>αβ</sub>) verwendet. Durch Identifizierung von cytosolischen und mitochondrialen Proteinen (α-Tubulin und HSP60), wurde die Reinheit der isolierten Mitochondrien und eine gleichmäßige Beladung der Proben bestätigt. (C) Proteinase K (Prot. K) *Protection Assay* von BK-WT CMM. Das Ausmaß des Verdauens wurde durch Blotten wichtiger intra-mitochondrialer Markerproteine (TOM20, CytC und HSP60) bestimmt und deutet auf eine Lokalisation der cGKI an der äußeren Mitochondrienmembran (OMM) hin. HSP60: Hitzeschockprotein 60; CytC: Cytochrom C; IM: Intermembranraum; IMM: innere Mitochondrienmembran. Ein Protein-Marker wurde verwendet, um die Größen der jeweiligen Proteine zu schätzen (*nicht gezeigt*).

Um die Frage zu klären, ob sich die cGKI an der OMM, im mitochondrialen IM oder der Matrix befindet, wurde die mitochondriale Lokalisation der cGKI mit Hilfe des Proteinase K (Prot. K) *Protection Assays* untersucht (Durchführung siehe Abschnitt 3.7.3). Da eine deutliche Aufkonzentrierung der cGKI in den CMM- im Vergleich zu den VM-Proben zu beobachten war (Abbildung 4.4A und B), wurde die biochemische Analyse der Lokalisation der cGKI nur in BK-WT CMM untersucht. Zur Kontrolle des Prot. K *Protection Assays* wurden intra-mitochondriale Markerproteine nachgewiesen, anhand derer das Ausmaß des Verdauens bestimmt werden konnte. Identifiziert wurden TOM20, eine Komponente des mitochondrialen Importsystems, lokalisiert an der OMM, Cytochrom C (CytC) als mitochondriales Protein im IM und HSP60 als Matrixprotein. In Abbildung 4.4C sind repräsentative Proteinbanden des Prot. K *Protection Assays* dargestellt. In den Kontroll-CMM-Lysaten, die nicht mit Prot. K inkubiert wurden, ließen sich deutliche Banden der cGKI auf Höhe von ca. 75 kDa detektieren sowie alle intra-mitochondrialen Markerproteine. Nach der Prot. K Inkubation intakter Mitochondrien waren hingegen nur sehr schwache Banden der cGKI sowie von TOM20 erkennbar. CytC und HSP60 als IM- und Matrixproteine waren hingegen auch in den Prot. K behandelten CMM-Proben eindeutig detektierbar. Diese Befunde deuten auf eine Lokalisation der cGKI an der äußeren Mitochondrienmembran hin. Die schwachen Banden der cGKI und von

TOM20 lassen auf einen unvollständigen Prot. K Verdau schließen. Die Western-Blot-Analyse wurde mit beiden spezifischen cGKI-Antikörpern durchgeführt. Dabei wurden mit dem cGKI-Antikörper von Prof. Hofmann der hier dargestellte Western-Blot, mit dem cGKI-Antikörper von Cell Signaling Technology (CST), bestätigt (siehe Anhang Abbildung 7.2E).

### 4.4 Einfluss des BK-Kanals auf die mitochondriale Respiration

Neueste Studien implizieren eine Assoziation zwischen mitoBK-Kanälen und der ETC der Mitochondrien. Es wurde *in vitro* an permeabilisierten ventrikulären Muskelfasern gezeigt, dass eine BK-Deletion die OXPHOS abschwächt<sup>271</sup>. Darüber hinaus postulieren neue Studien eine direkte Interaktion zwischen der  $\beta_1$ -Untereinheit des mitoBKs und der Cytochrom-C-Oxidase (Komplex IV)<sup>278</sup> und eine umfassende Proteomanalyse deckte weitere mitochondriale BK-Kanalpartner auf<sup>277</sup>. Darunter wurden neben TOM22, einer Komponente des mitochondrialen Importsystems der OMM sowie der Adenosinnukleotid-Translokase, weitere Proteine des Tricarbonsäurezyklus und der oxidativen Phosphorylierung als Interaktionspartner identifiziert. Daher wurde im Folgenden die Assoziation zwischen mitoBK und der Elektronentransportkette mittels respiratorischen Sauerstoffmessungen in isolierten kardialen Mitochondrien aus BK- und CMBK-Mutanten untersucht. Es wurde analysiert, ob die Ablation des BK-Kanals einen Einfluss auf die Mitochondrienfunktion hat. Zur Isolation der Mitochondrien wurden Mäuse beider Geschlechter im Alter von 8 bis 10 Wochen herangezogen. Die Durchführung und Auswertung der respiratorischen Messungen mittels polarographischer Clark-Sauerstoffelektrode sind in Abschnitt 3.6 beschrieben.

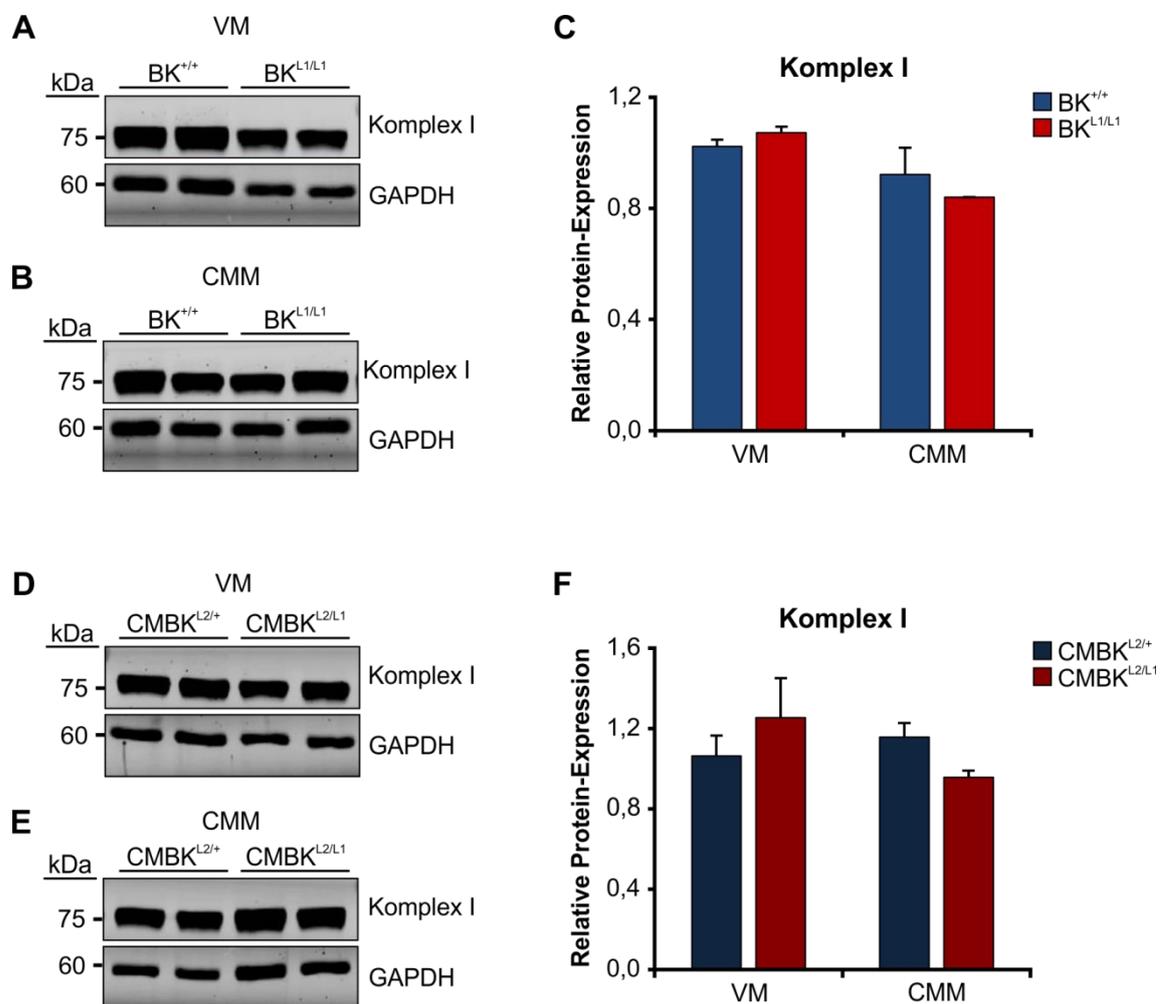
#### 4.4.1 Expressionsanalysen von Komplexen und Elektronencarriern der Elektronentransportkette

Es wurde bereits postuliert, dass in den BK-KO Tieren eine dysregulierte mitochondriale Funktion bei Normoxie (und Reoxygenierung), angezeigt durch eine reduzierte OXPHOS, in Zusammenhang mit einem Verlust der COX-Aktivität steht<sup>271</sup>. Um auszuschließen, dass eventuelle Unterschiede in der Respiration zwischen den Genotypen durch unterschiedliche Expressionslevel der ETC-Komplexe zustande kommen, wurde zunächst die Expression der an der ETC beteiligten Proteine untersucht.

##### 4.4.1.1 Expressionslevel von Komplex I

Komplex I (NADH-Dehydrogenase) der Atmungskette ist ein sehr großer Enzymkomplex und der Erste in der Elektronentransportkette der Mitochondrien. Er überträgt mittels Reduktionsäquivalenten NADH, die vor allem aus dem TCA stammen, Elektronen auf Coenzym Q. Dabei werden netto die ersten vier Protonen in den Intermembranraum zur Erzeugung des Membranpotentials transportiert (siehe auch Abschnitt 1.2 und Abbildung 1.1). Der Komplex I ist in der IMM lokalisiert und kann in drei verschiedene Subkomplexe unterteilt werden: Eine Flavoprotein-Fraktion, eine Eisen-Schwefel-Protein-Fraktion und eine hydrophobe Fraktion<sup>356</sup>. Zur Detektion und Expressionsanalyse des Komplex I wurde ein spezifischer Antikörper (siehe 2.3.8) verwendet, der gegen die größte

Untereinheit von Komplex I (NDUFS1) gerichtet und Bestandteil des Eisen-Schwefel-Fragments des Enzyms ist. In Abbildung 4.5 sind repräsentative Proteinbanden von Komplex I und des mitochondrialen HSP60 als Ladungskontrolle sowie die Quantifizierung als relative Proteinexpression von Komplex I bezogen auf HSP60 dargestellt.



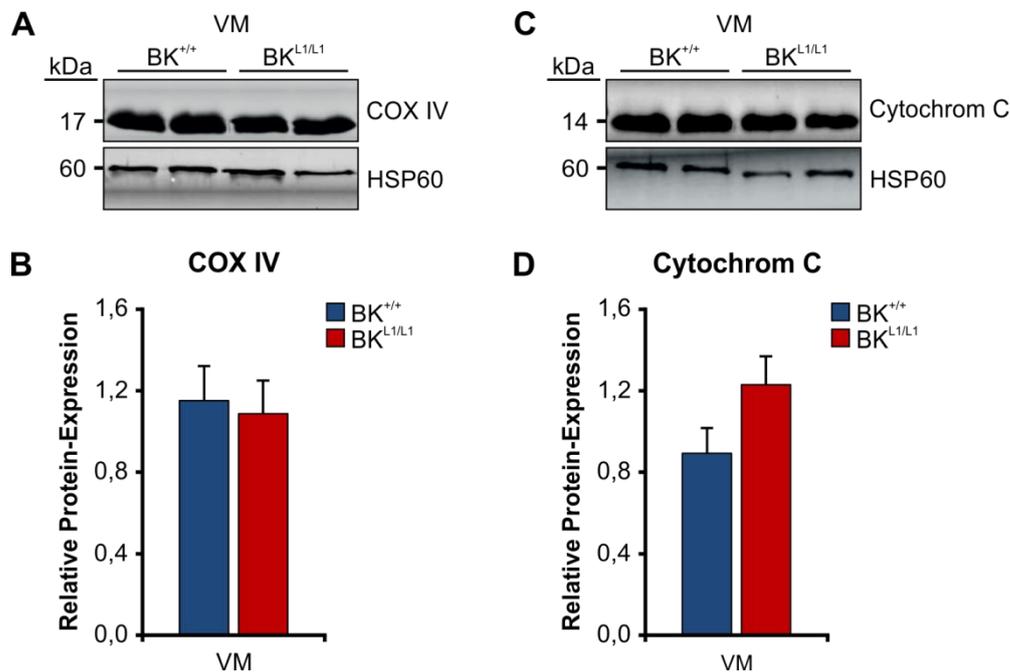
**Abbildung 4.5** Expressionslevel von Komplex I in BK-WT bzw. CMBK-CTR sowie BK- und CMBK-defizienten Tieren

Repräsentative Western-Blot-Analyse der Expression von Komplex I in (A) VM von BK-WT und BK-KO, (B) CMM von BK-WT und BK-KO, (D) VM von CMBK-CTR und CMBK-KO und (E) CMM von CMBK-CTR und CMBK-KO. (C) und (F) Es zeigten sich keine genotypspezifischen Unterschiede im Expressionslevel des Komplex I. Die relative Expression wurde auf HSP60 bezogen. Balken repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM; BK-WT (BK<sup>+/+</sup>); BK-KO (BK<sup>L1/L1</sup>); CMBK-CTR (CMBK<sup>L2/+</sup>); CMBK-KO (CMBK<sup>L2/L1</sup>) mit je n=3 unabhängige Experimente.

Es wurden sowohl aus den globalen BK-defizienten Tieren (Abbildung 4.5A – B) als auch aus den Kardiomyozyten-spezifischen Tieren (Abbildung 4.5D – E) und deren Wurfgeschwisterkontrollen (BK-WT bzw. CMBK-CTR) VM und CMM isoliert und untersucht. Genotypspezifische Unterschiede im Expressionslevel von Komplex I (Abbildung 4.5C und F) waren nicht erkennbar. Die Mittelwerte der Quantifizierung sind im Anhang (Tabelle 7.2) zu finden.

#### 4.4.1.2 Expressionslevel von Cytochrom-C-Oxidase und Cytochrom C

Die Cytochrom-C-Oxidase (COX) ist der terminale Komplex (Komplex IV) der Atmungskette und katalysiert den letzten Schritt der mitochondrialen ETC. Sie überträgt Elektronen von Cytochrom C (CytC) auf molekularen Sauerstoff (siehe Abbildung 1.1), wodurch dieser zu Wasser reduziert wird. Sie gilt als eine der wichtigsten Regulierungsstellen für die oxidative Phosphorylierung<sup>357,358</sup>. Der Proteinkomplex hat 13 verschiedene Untereinheiten. Die drei größten Untereinheiten COX I, II und III, die vom mitochondrialen Genom kodiert werden, bilden den funktionellen Kern des Enzymkomplexes. Die restlichen Untereinheiten werden durch nukleare Gene codiert<sup>358</sup>. Cytochrom C (CytC) fungiert als Elektronenüberträger zwischen Komplex III und Komplex IV der ETC und ist im Intermembranraum lokalisiert (siehe auch Abbildung 1.1). An Komplex IV wird CytC oxidiert und dabei ein Elektron auf den Komplex IV übertragen. Es wird außerdem während der Apoptose freigesetzt und ist ein wichtiger Trigger der Caspase-Kaskade-Aktivierung (siehe Abschnitt 1.4). Zur Untersuchung der Expression von COX und CytC wurden Mitochondrien aus Ventrikel (VM) (siehe Abschnitt 3.5.1) der globalen BK-defizienten Tiere und ihren Wurfgeschwisterkontrolltieren (BK-WT) isoliert und mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Die Detektion der COX und des CytC erfolgte mit spezifischen Antikörpern die gegen die COX IV-Untereinheit bzw. das Cytochrom C gerichtet sind. In Abbildung 4.6 sind repräsentative Proteinbanden von COX IV sowie Cytochrom C und des mitochondrialen HSP60 als Ladungskontrolle dargestellt.



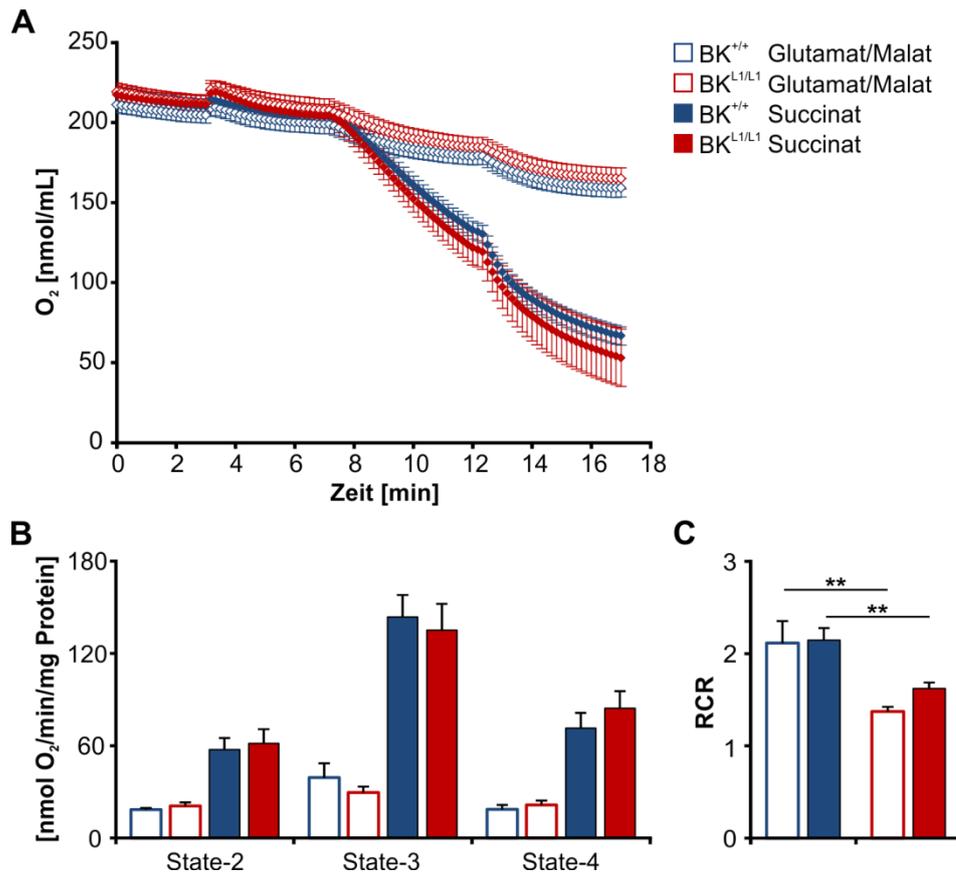
**Abbildung 4.6 Expressionslevel von Cytochrom-C-Oxidase und Cytochrom C**

Repräsentative Western-Blots der Expression von (A) Cytochrom-C-Oxidase (COX IV) und (C) Cytochrom C in VM von BK-WT und BK-KO Tieren. Es zeigten sich keine genotypspezifischen Unterschiede in den Expressionslevel für (B) COX IV und (D) Cytochrom C. Die relative Expression wurde auf HSP60 bezogen. Balken repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM; BK-WT (BK<sup>+/+</sup>); BK-KO (BK<sup>L1/L1</sup>) mit je n=6 unabhängige Experimente.

Bei der Analyse von COX IV (Abbildung 4.6A und B) zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Genotypen. Bezüglich der Cytochrom C-Expressionslevel (Abbildung 4.6C und D) konnte in den BK-KO Proben eine leichte Tendenz zu einer höheren Expression beobachtet werden, woraus sich jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied ergab. Die Mittelwerte der Quantifizierung sind im Anhang (Tabelle 7.2) zu finden.

#### 4.4.2 Basale Respiration von Mitochondrien aus Ventrikel

Zunächst wurde der Einfluss einer globalen BK-Deletion auf die basale Respiration von Mitochondrien aus Ventrikel untersucht. Hierzu wurden die isolierten VM mittels Clark-Typ polarographischem Sensor (siehe Abschnitt 3.6) vermessen. Es wurde sowohl Komplex I mit der gleichzeitigen Gabe der Substrate Glutamat und Malat (Glutamat/Malat) als auch in einem separaten Setup Komplex II mit dem Substrat Succinat stimuliert. Die Mitochondrien wurden schließlich durch Zugabe von ADP zu maximaler ADP-stimulierter Atmung angeregt (Durchführung und Auswertung siehe Abschnitt 3.6.2 und 3.6.3). Der Sauerstoffverbrauch ist in Abbildung 4.7A als Mittelwert aller Messungen dargestellt. Durch die Stimulation von Komplex I bzw. Komplex II war ein deutlicher Anstieg der Atmungsaktivität zu verzeichnen. Die Glutamat/Malat-stimulierte Atmung verläuft per se langsamer als die Succinat-stimulierte Atmung, da Glutamat und Malat zuerst in der mitochondrialen Matrix durch den Tricarbonsäurezyklus metabolisiert werden müssen. Erst dann können die Elektronen mittels NADH auf Komplex I übertragen werden. Succinat hingegen kann direkt an Komplex II der ETC zu Fumarat oxidiert werden und Elektronen auf Coenzym Q übertragen. Zwischen den Genotypen war kein Unterschied zwischen der mit Glutamat/Malat- bzw. Succinat-stimulierten Atmung zu erkennen (Abbildung 4.7B State-2). Durch die Zugabe an ADP wurde die Atmung erwartungsgemäß stark stimuliert, was an einem deutlichen Abfall der Sauerstoffkonzentration erkennbar war. Die Auswertung der ADP-stimulierten Atmung (Abbildung 4.7B State-3 und State-4) ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen. Betrachtet man den respiratorischen Kontrollindex (RCR, Abbildung 4.7C), welcher sich aus dem Quotient der State-3 und State-4 Atmung berechnet, zeigte sich zwischen den Genotypen ein signifikanter Unterschied. Der RCR war in BK-WT VM sowohl mit Glutamat/Malat als Komplex I-Substrate mit  $2,11 \pm 0,24$  als auch mit Succinat als Komplex II-Substrat mit  $2,14 \pm 0,13$  signifikant höher als in BK-KO VM (Glutamat/Malat:  $1,37 \pm 0,05$ ; Succinat:  $1,62 \pm 0,06$ ). Dabei fiel auf, dass die ADP-stimulierte State-3 Atmung in den BK-KO VM im Vergleich zu den BK-WT VM jeweils etwas erniedrigt die State-4 Atmung jedoch etwas erhöht war (Abbildung 4.7B). Dadurch lassen sich die niedrigeren RCR-Werte der BK-KO VM erklären. Die Mittelwerte der mitochondrialen Atmung und des RCR sind im Anhang (Tabelle 7.3) zu finden.



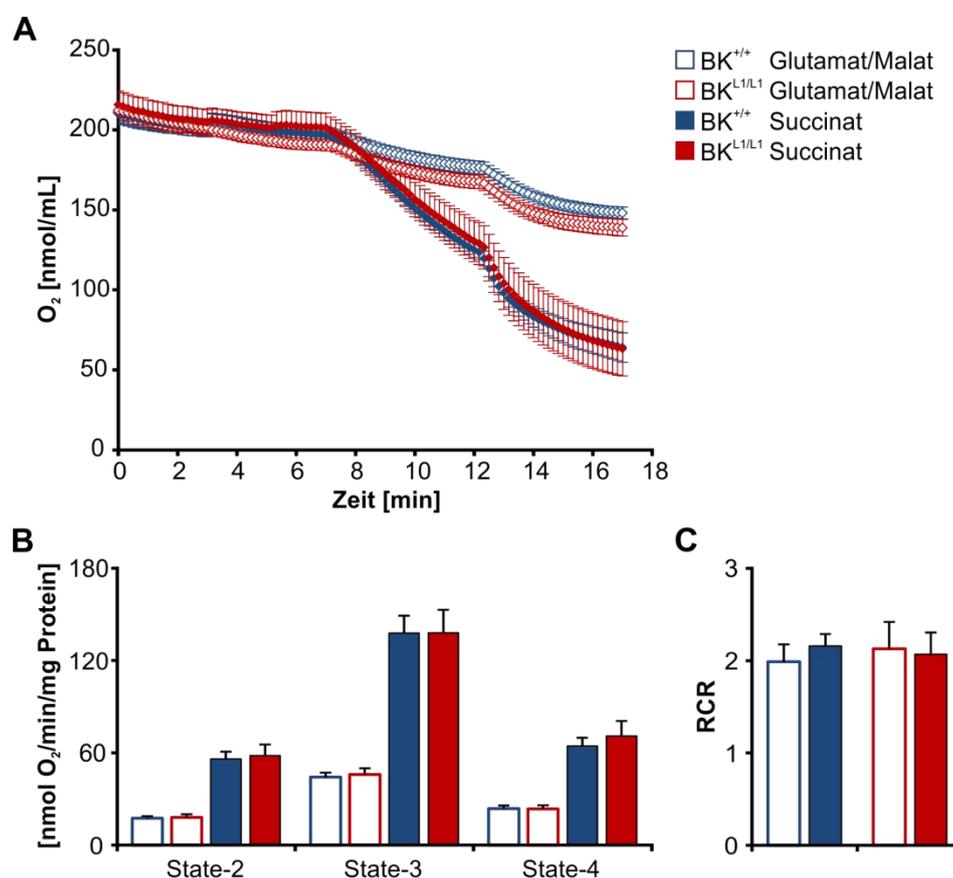
**Abbildung 4.7 Einfluss des BK-Kanals auf die Respiration ventrikulärer Mitochondrien**

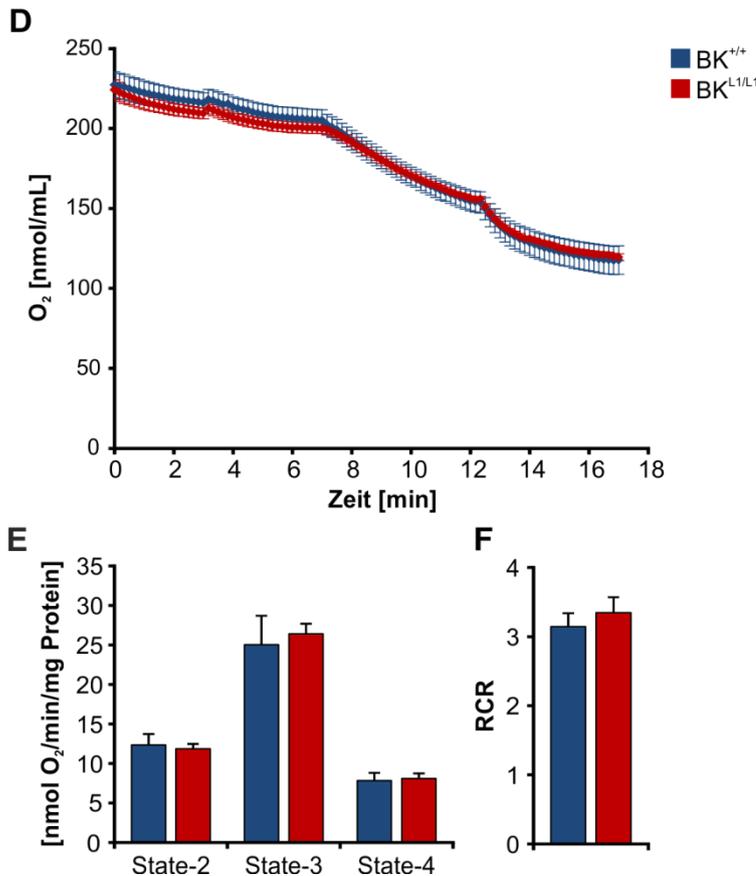
(A) Sauerstoffverbrauch der sowohl mit Glutamat/Malat (G/M)- als auch mit Succinat (S)-stimulierten Atmung von BK-WT und BK-KO VM. BK-WT (BK<sup>+/+</sup>) n=13 für G/M und n=14 für S; BK-KO (BK<sup>L1/L1</sup>) n=13 für G/M und n=11 für S. (B) Für die mitochondriale Atmung zeigte sich kein Unterschied zwischen den Genotypen. Eine Tendenz des BK-WTs zu erhöhter State-3 und erniedrigter State-4 Atmung war jedoch erkennbar. (C) Der respiratorische Kontrollindex ergab signifikante Unterschiede in der mit Glutamat/Malat- bzw. Succinat-stimulierten Atmung zwischen BK-WT und BK-KO VM. BK-WT (BK<sup>+/+</sup>) n=13 für G/M und n=15 für S; BK-KO (BK<sup>L1/L1</sup>) n=13 für G/M und n=12 für S. Rauten und Balken repräsentieren Mittelwerte ± SEM; \*\*p<0,01.

#### 4.4.3 Basale Respiration von Mitochondrien aus Kardiomyozyten

Da postuliert wird, dass der mitoBK in den Kardiomyozyten an der Entkopplung der ETC und der kardioprotektiven Wirkung beteiligt sein könnte (siehe Abschnitt 1.7.4 und 1.7.5), wurde als nächstes der Einfluss einer globalen BK-Deletion auf die basale Respiration von Mitochondrien aus Kardiomyozyten (CMM) untersucht. Im ersten Versuchsansatz (Abschnitt 4.4.2) wurden Mitochondrien aus Ventrikel vermessen die nicht nur Mitochondrien aus Kardiomyozyten enthalten, sondern unter anderem auch aus Fibroblasten, Endothelzellen und Glattmuskelzellen. Die isolierten CMM wurden ebenfalls mittels Clark-Typ polarographischem Sensor (siehe Abschnitt 3.6) vermessen und sowohl Komplex I als auch in einem separaten Setup Komplex II stimuliert (Durchführung und Auswertung siehe Abschnitt 3.6.2 und 3.6.3). Der Sauerstoffverbrauch ist in Abbildung 4.8A als Mittelwert aller Messungen dargestellt. Die Auswertung der mitochondrialen Atmung sowie der berechnete RCR sind in Abbildung 4.8B und C dargestellt. Dabei zeigten sich weder zwischen den einzelnen Genotypen noch zwischen den verschiedenen Substraten innerhalb eines

Genotyps signifikante Unterschied. Die Isolation der Kardiomyozyten, aus denen die Mitochondrien für die bisherigen Untersuchungen (Abbildung 4.8A – C) isoliert wurden, erfolgte mittels Collagenase II (siehe auch Abschnitt 3.3.2). Da nach primärer Charakterisierung der basalen Atmungsmessungen der BK-defizienten Tiere und ihren Wurfgeschwisterkontrollen jedoch zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit weitere respiratorische Messungen (von CMM der CMBK-Mutanten) nötig waren und zu diesem Zeitpunkt die Liberase DH als Isolationsenzym der Kardiomyozyten genutzt wurde, wurden die basalen respiratorischen CMM-Messungen von BK-WT und BK-KO wiederholt. Dieses Vorgehen war nötig um auszuschließen, dass die unterschiedliche enzymatische Isolation einen Einfluss auf die Respiration der Mitochondrien hat. Zudem änderten sich weitere Faktoren während der Versuchsreihen: Es standen eine neue Bradford-Lösung zur Vermessung der Proteinmenge sowie ein neues Photometer zur Verfügung. Im Zuge dessen musste auch die eingesetzte Proteinmenge der Mitochondrien angepasst (erhöht) werden. Die Ergebnisse dieser respiratorischen CMM-Messungen sind in Abbildung 4.8D – F dargestellt. Die Daten bestätigen die bisherigen Messungen der CMM. Auch hier gab es keine genotypspezifischen Unterschiede in der mitochondrialen Respiration. Weder die Auswertung der mitochondrialen Atmung (Abbildung 4.8D und E) noch der RCR (Abbildung 4.8F) zeigten Unterschiede auf. Die geänderten Faktoren haben demnach keinen Einfluss auf die mitochondriale Respiration. Lediglich die relativen Werte fallen auf Grund der höheren Mitochondrienproteinmenge kleiner aus. Die jeweiligen Mittelwerte der mitochondrialen Atmung und des RCR sind im Anhang (Tabelle 7.4) zu finden. Nach diesen basalen respiratorischen Messungen zu beurteilen scheint der kardiomyozytäre mitoBK keinen Einfluss auf die ETC zu haben. Der zunächst beobachtete Effekt auf die ETC in den basalen Respirationssmessungen der VM (Abschnitt 4.4.2) konnte in den CMM-Proben nicht bestätigt werden.





#### Abbildung 4.8 Einfluss des BK-Kanals auf die Respiration von Mitochondrien aus Kardiomyozyten

(A) Sauerstoffverbrauch der sowohl mit Glutamat/Malat (G/M)- als auch mit Succinat (S)-stimulierten Atmung von BK-WT und BK-KO CMM. Die Kardiomyozyten wurden mit Collagenase II isoliert. BK-WT (BK<sup>+/+</sup>) n=10 für G/M und für S; BK-KO (BK<sup>L1/L1</sup>) n=10 für G/M und n=6 für S. (B) Es zeigten sich keine genotypspezifischen Unterschiede in der mitochondrialen Atmung. (C) Der respiratorische Kontrollindex (RCR) ergab ebenfalls keinen Unterschied zwischen den Genotypen. BK-WT (BK<sup>+/+</sup>) n=12 für G/M und n=10 für S; BK-KO (BK<sup>L1/L1</sup>) n=11 für G/M und n=9 für S. (D) Der Sauerstoffverbrauch von CMM bei einer Isolation der Kardiomyozyten mit Liberase DH. BK-WT (BK<sup>+/+</sup>) n=10, BK-KO (BK<sup>L1/L1</sup>) n=9. (E) Die mitochondriale Atmung sowie (F) der RCR ergaben keine Unterschiede zwischen den Genotypen. BK-WT (BK<sup>+/+</sup>) n=10, BK-KO (BK<sup>L1/L1</sup>) n=9. Rauten und Balken repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM.

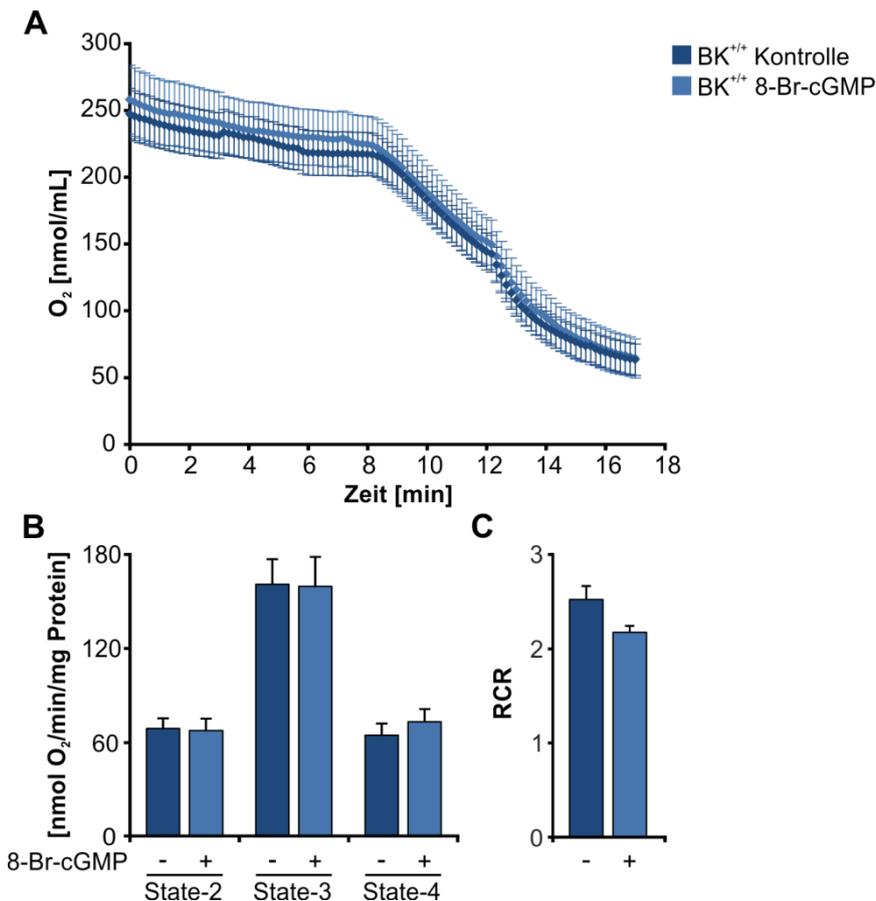
Die basalen respiratorischen Messungen wurden auch mit CMM der gewebespezifischen CMBK-Mutanten durchgeführt um den Einfluss einer Kardiomyozyten-spezifischen Deletion des BK-Kanals auf die Respiration von isolierten Mitochondrien zu untersuchen. Diese Messungen sind im Anhang in Abbildung 7.3 dargestellt, wobei nur Succinat als Substrat verwendet wurde. Da die Messungen zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit durchgeführt wurden erfolgte die Isolation der Kardiomyozyten mit Liberase DH. Überraschenderweise war der Sauerstoffverbrauch der kardiomyozytären CMBK-KO und CMBK-CTR Mitochondrien signifikant unterschiedlich (Abbildung 7.3B). Die ADP-stimulierte Atmung der CMBK-KO CMM (State-3:  $32,24 \pm 0,60$  nmol O<sub>2</sub>/min/mg Protein; State-4:  $8,83 \pm 0,46$  nmol O<sub>2</sub>/min/mg Protein) war signifikant höher als die der CMBK-CTR (State-3:  $24,41 \pm 1,75$  nmol O<sub>2</sub>/min/mg Protein; State-4:  $7,37 \pm 0,71$  nmol O<sub>2</sub>/min/mg Protein). Im RCR waren diese signifikanten Unterschiede jedoch nicht zu detektieren.

## 4.5 Einfluss einer pharmakologischen Modulation des BK-Kanals auf die mitochondriale Respiration

Die bisherigen respiratorischen Messungen erfolgten ohne jegliche pharmakologische Stimulation des mitoBKs bzw. des cGMP/cGKI-Signalweges. Die basalen respiratorischen CMM-Messungen konnten kein Unterschied zwischen kardiomyozytären BK-WT und BK-KO Mitochondrien aufzeigen (siehe Abschnitt 4.4.3). Im Gegensatz hierzu konnte *in vitro* in Mitochondrien aus Meerschweinchenherzen gezeigt werden, dass eine mitoBK-Öffnung mittels NS1619 die Energieproduktion der Mitochondrien beeinflusst<sup>294,295</sup>. Im folgenden Abschnitt wurde daher der Einfluss einer pharmakologischen Modulation mittels 8-Br-cGMP und NS11021 auf die Respiration der Mitochondrien untersucht. Hierfür wurden Mitochondrien aus Kardiomyozyten von BK-defizienten Tiere und ihren Wurfgeschwisterkontrollen (BK-WT) isoliert.

### 4.5.1 Auswirkungen einer pharmakologischen Stimulation mit 8-Br-cGMP auf die mitochondriale Respiration

Um zu überprüfen, ob eine Stimulation der Mitochondrien-assoziierten cGKI (siehe Abschnitt 4.3) Auswirkungen auf die Respiration BK-positiver Mitochondrien hat wurde das membrangängige Analogon 8-Br-cGMP verwendet. Für diese Versuche wurden BK-WT CMM, deren Isolation mit Collagenase II erfolgte, mit 8-Br-cGMP (10  $\mu$ M) stimuliert<sup>218,359</sup>. Die Ergebnisse dieser respiratorischen Messungen sind in Abbildung 4.9 dargestellt. Es zeigten sich dabei keine Unterschiede in der mitochondrialen Respiration  $\pm$  8-Br-cGMP. Die Kurven der Sauerstoffmessungen  $\pm$  8-Br-cGMP (Abbildung 4.9A) verliefen parallel und daher waren weder Unterschiede in der mitochondrialen Atmung (Abbildung 4.9B) noch im RCR (Abbildung 4.9C) zu ermitteln. Die erhaltenen Werte waren zudem vergleichbar mit den basalen CMM-Messungen (vgl. Abbildung 4.8A – C). 8-Br-cGMP in der eingesetzten Konzentration von 10  $\mu$ M hat somit keinen Einfluss auf die Respiration kardiomyozytärer Mitochondrien.



**Abbildung 4.9 Einfluss von 8-Br-cGMP auf die Respiration von BK-WT CMM**

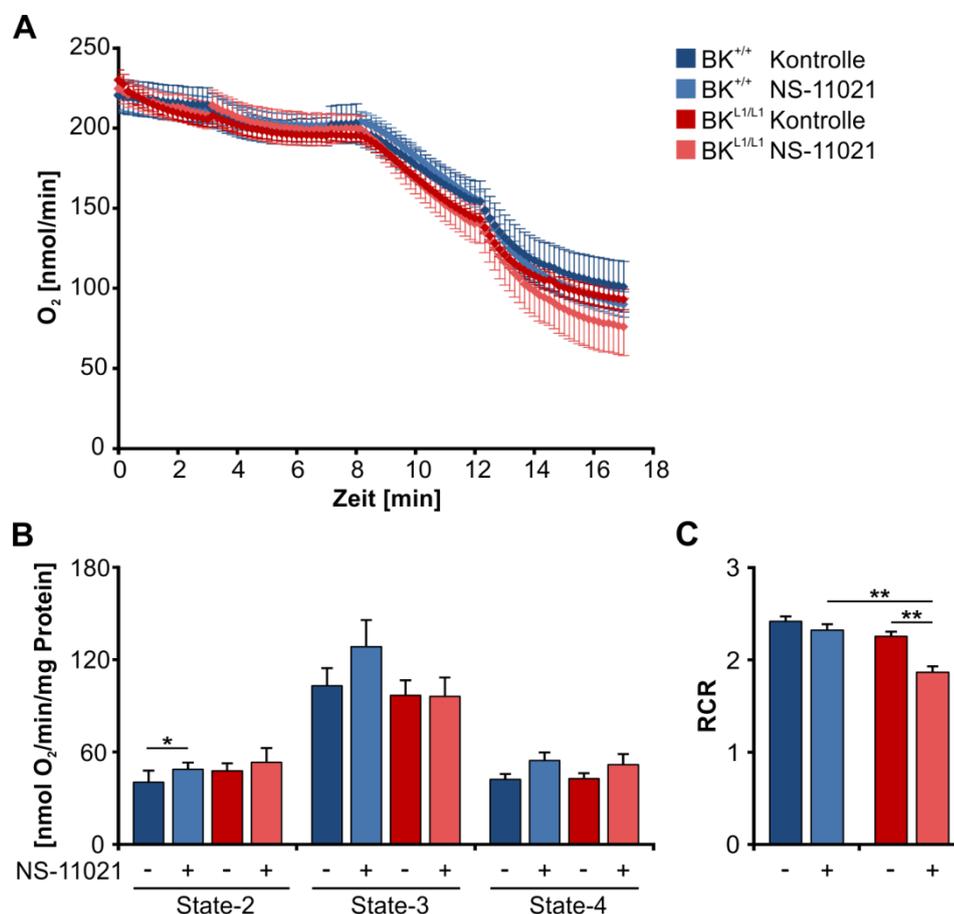
(A) Sauerstoffverbrauch der mit Succinat ± 8-Br-cGMP-stimulierten Atmung von BK-WT CMM. (B) Es zeigten sich keine Unterschiede in der mitochondrialen Atmung ± 8-Br-cGMP und (C) im respiratorischen Kontrollindex (RCR).

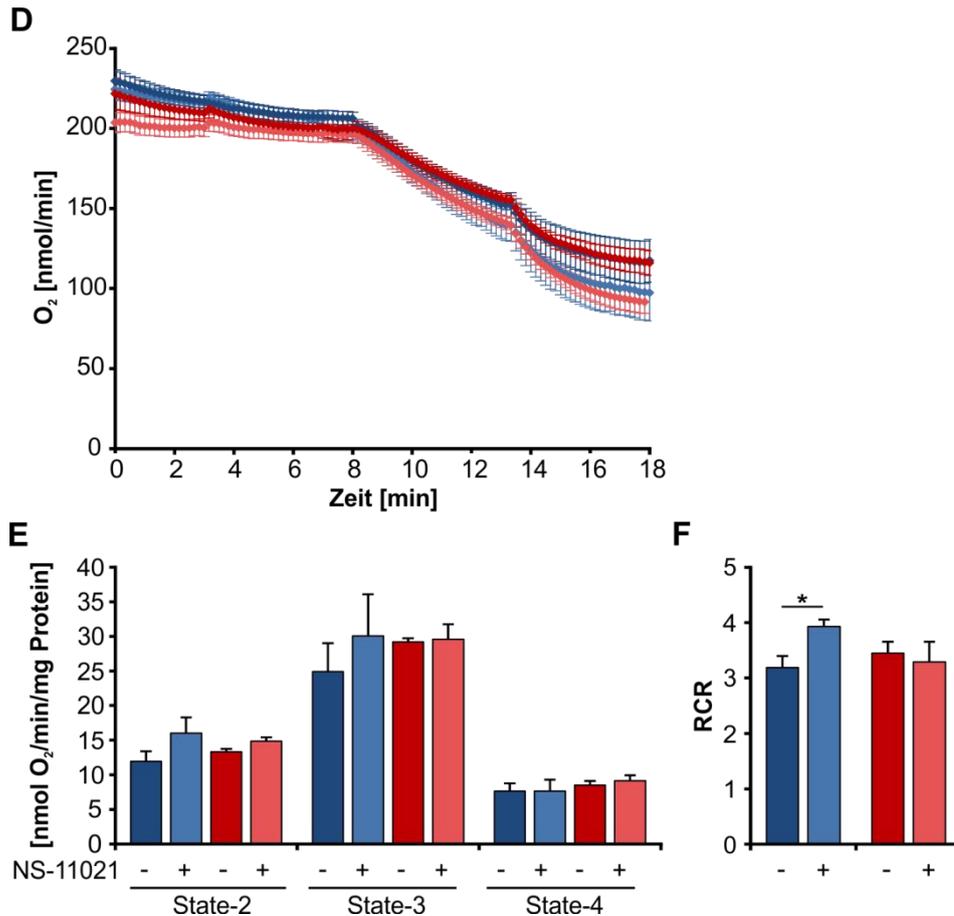
BK-WT (BK<sup>+/+</sup>) mit je n=5 ± 8-Br-cGMP. Rauten und Balken repräsentieren Mittelwerte ± SEM.

#### 4.5.2 Auswirkungen einer pharmakologischen BK-Kanal-Öffnung mit NS11021 auf die mitochondriale Respiration

Die Stimulation der CMM aus BK-WT Herzen mit 8-Br-cGMP zeigte keinen Einfluss auf die Respiration der Mitochondrien (siehe Abschnitt 4.5.1, Abbildung 4.9). Um zu untersuchen, ob eine direkte Öffnung des BK-Kanals einen Einfluss auf die Respiration der Mitochondrien hat, wurden BK-KO und CMBK-KO CMM sowie CMM aus entsprechenden Wurfgeschwisterkontrolltieren (BK-WT bzw. CMBK-CTR) mit dem BK-Kanalöffner NS11021 stimuliert. In der Literatur ist bisher nur sehr wenig über den Einsatz von NS11021 auf isolierte Mitochondrien *in vitro* bekannt. Die Substanz wurde, orientiert an den unveröffentlichten Daten des Herstellers sowie veröffentlichten Arbeiten die NS11021 *ex vivo* verwendet haben eingesetzt<sup>289,318</sup>. Als Erstes wurde eine Konzentration von 3 µM gewählt (siehe Anhang Abbildung 7.4). Dies führte jedoch zu einer erheblichen Reduktion des Sauerstoffverbrauchs in beiden Genotypen. Unter Zugabe von NS11021 in dieser hohen Konzentration war eine Steigerung des Sauerstoffverbrauchs nach Zugabe von exogenen Substraten wie Glutamat und Malat bzw. Succinat und ADP nicht mehr möglich (Anhang Abbildung 7.4B). Weder in BK-KO noch in BK-WT CMM konnte ein gesteigerter Sauerstoffverbrauch beobachtet werden. Dass diese Effekte nicht auf das Lösungsmittel DMSO zurückzuführen waren, zeigten Kontrollmessungen bei denen 0,1% DMSO ohne NS11021 verwendet wurde. Diese Messungen waren vergleichbar mit den basalen respiratorischen CMM-Messungen (vgl. Abbildung 4.8A – C). Um die toxischen Effekte von NS11021 zu minimieren, wurde die Konzentration daher auf 300 nM reduziert. Die Ergebnisse dieser CMM-Messungen von BK-WT und BK-KO sind in Abbildung 4.10 dargestellt. Bei den

Kontrollmessungen wurde ebenfalls entsprechend verdünntes DMSO (0,01%) verwendet. Diese Vorversuche der CMM, bei denen die Kardiomyozyten mit Collagenase II isoliert wurden (Abbildung 4.10A – C), waren durchaus vielversprechend. NS11021 hatte keinen signifikanten Einfluss auf den Sauerstoffverbrauch der BK-KO CMM. In den BK-WT CMM hingegen war die Succinat-stimulierte State-2 Atmung mit NS11021 signifikant höher als die der entsprechenden BK-WT Kontrolle (NS11021:  $48,77 \pm 4,29$  nmol O<sub>2</sub>/min/mg Protein; Kontrolle:  $40,30 \pm 7,64$  O<sub>2</sub>/min/mg Protein). Auch die ADP-stimulierte Atmung der BK-WT CMM zeigte mit NS11021 einen tendenziell gesteigerten Sauerstoffverbrauch im Vergleich zu den BK-WT Kontrollmessungen (Abbildung 4.10B State-3 und State-4). Gleichzeitig war jedoch eine leicht höhere State-4 Atmung der mit NS11021 stimulierten BK-KO CMM zu beobachten, wodurch sich signifikante Unterschiede im RCR ergaben (Abbildung 4.10C). Da diese CMM-Messungen  $\pm$  NS11021 auf einer Isolationen der Kardiomyozyten mit Collagenase II beruhten wurden diese Messungen zu einem späteren Zeitpunkt mit Liberase DH als Isolationsenzym wiederholt. Die Ergebnisse dieser CMM-Messungen sind in Abbildung 4.10D – F dargestellt. NS11021 hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Respiration der BK-KO CMM. Interessanterweise war die Respiration der BK-WT CMM mit NS11021 in der Succinat-stimulierten State-2 und der ADP-stimulierten State-3 Atmung tendenziell erhöht im Vergleich zu den entsprechenden BK-WT Kontrollmessungen (Abbildung 4.10E). Diese Befunde bestätigten die vorrangegangenen Messungen  $\pm$  NS11021 (Abbildung 4.10B). Durch den tendenziell erhöhten Sauerstoffverbrauch der BK-WT CMM-Messungen mit NS11021 ergab sich somit ein genotypspezifischer signifikanter Unterschiede im RCR (Abbildung 4.10F). Die jeweiligen Mittelwerte der mitochondrialen Atmung und des RCR sind im Anhang (Tabelle 7.5) zu finden.





**Abbildung 4.10 Einfluss einer BK-Kanal-Öffnung mit 300 nM NS11021 auf die Respiration von BK-WT und BK-KO CMM**

(A) Sauerstoffverbrauch von BK-WT und BK-KO CMM  $\pm$  300 nM NS11021. Die Kardiomyozyten wurden mit Collagenase II isoliert. BK-WT (BK<sup>+/+</sup>): NS11021 n=6 und Kontrolle n=5; BK-KO (BK<sup>L1/L1</sup>): NS11021 n=5 und Kontrolle n=4. (B) Es zeigte sich ein signifikant höherer Sauerstoffverbrauch der Succinat-stimulierten State-2 Atmung sowie ein tendenziell erhöhter Sauerstoffverbrauch in der ADP-stimulierten Atmung in den BK-WT CMM-Messungen mit NS11021 im Vergleich zu den BK-WT Kontrollmessungen. (C) Der respiratorische Kontrollindex (RCR) zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den BK-WT und BK-KO CMM mit NS11021 und zwischen den BK-KO CMM  $\pm$  NS11021. BK-WT (BK<sup>+/+</sup>): NS11021 n=6 und Kontrolle n=6; BK-KO (BK<sup>L1/L1</sup>): NS11021 n=6 und Kontrolle n=5. (D) Der Sauerstoffverbrauch von CMM  $\pm$  NS11021 nach Isolation der Kardiomyozyten mit Liberase DH. BK-WT (BK<sup>+/+</sup>): NS11021 n=6 und Kontrolle n=4; BK-KO (BK<sup>L1/L1</sup>): NS11021 n=4 und Kontrolle n=5. (E) Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der mitochondrialen Atmung. Die BK-WT Messungen mit NS11021 wiesen eine Tendenz zu höherem Sauerstoffverbrauch in der State-2 und State-3 Atmung auf. (F) Der RCR der BK-WT Messungen mit NS11021 war signifikant erhöht im Vergleich zu den BK-WT Kontrollmessungen. BK-WT (BK<sup>+/+</sup>): NS11021 n=5 und Kontrolle n=9; BK-KO (BK<sup>L1/L1</sup>): NS11021 n=5 und Kontrolle n=4. Als Kontrolle diente jeweils 0,01% DMSO. Rauten und Balken repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM; \*p<0,05; \*\*p<0,01.

Mit einer NS11021 Konzentration von 300 nM wurden auch CMM aus CMBK-defizienten Tieren vermessen (siehe Anhang Abbildung 7.5). Da die Messungen zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit durchgeführt wurden erfolgte die Isolation der Kardiomyozyten mit Liberase DH. Wie bereits bei den basalen respiratorischen CMM-Messungen der CMBK Mutanten (siehe Anhang Abbildung 7.3) zeigte sich auch hier ein signifikant bzw. tendenziell erhöhter Sauerstoffverbrauch in der ADP-stimulierten State-3 Atmung  $\pm$  NS11021 der CMBK-KO CMMs im Vergleich zur CMBK-CTR.

Genotypspezifische Unterschiede zwischen den CMM-Messungen mit NS11021 und den Kontrollmessungen ergaben sich keine.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden CMM aus BK-WT und BK-KO Tieren mit einer NS11021 Konzentration von 150 nM vermessen (siehe Anhang Abbildung 7.6). Diese respiratorischen Messungen bestätigten zum Großteil die Befunde der CMM-Messungen  $\pm$  300 nM NS11021 aus BK-WT und BK-KO Tieren. Die Isolation der Kardiomyozyten erfolgte hier mit Liberase DH. Allerdings war der Sauerstoffverbrauch aller Messungen recht gering, was die Auswertung erschwerte. Interessanterweise war in BK-KO CMM im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollmessungen die Succinat-stimulierte State-2 Atmung mit NS11021 tendenziell erniedrigt, während die ADP-stimulierte State-3 Atmung mit NS11021 tendenziell erhöht war (Abbildung 7.6B). In den BK-WT CMM hingegen war die Succinat-stimulierte State-2 sowie die ADP-stimulierte State-3 Atmung mit NS11021 tendenziell höher als die der entsprechende BK-WT Kontrolle, was die bisherigen Befunde (siehe Abbildung 4.10B und E) bestätigt. Es ergab sich somit ein tendenzieller, jedoch nicht signifikanter genotypspezifischer Unterschied im RCR der BK-WT CMM (Abbildung 7.6C).

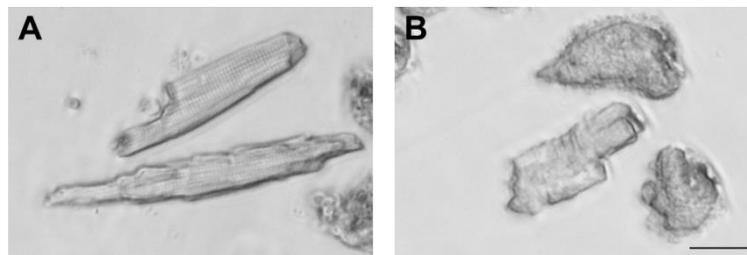
Ein Öffnen des BK-Kanals mit NS11021 in einer nanomolaren Konzentration scheint demzufolge einen leichten Einfluss auf die Succinat-stimulierte State-2 sowie ADP-stimulierte State-3 Atmung von CMM aus BK-WT Tieren zu haben, während die ADP-stimulierte State-4 Atmung unbeeinflusst bleibt. Hohe NS11021 Konzentration im mikromolaren Bereich (3  $\mu$ M) sind hingegen toxisch für die Mitochondrien.

## 4.6 Zellüberleben der Kardiomyozyten bei Hypoxie-Reoxygenierung

Um den Einfluss des BK-Kanals auf das Überleben isolierter adulter Kardiomyozyten zu untersuchen wurden *in vitro* Hypoxie-Reoxygenierungs-Experimente mit isolierten Kardiomyozyten von BK-defizienten Tieren und entsprechenden Wurfgeschwisterkontrollen (BK-WT) durchgeführt. Eigene Vorversuche (siehe auch Abschnitt 3.4) zeigten, dass sich die Kardiomyozyten bei längerer normoxischer Kultivierung von den Laminin-beschichteten Platten ablösen. Dies wurde auch schon in anderen Arbeiten mit isolierten Kardiomyozyten berichtet<sup>360</sup>. Schon nach 3 Stunden Inkubation unter normoxischen Bedingungen führte ein Mediumwechsel zu einer erheblichen Reduktion der Zellzahl, während das Gesamtüberleben der Zellen unverändert war (siehe Anhang Abbildung 7.8). Die Zellen gingen daher beim Mediumwechsel und für den weiteren Versuch verloren, was eine wiederholte Visualisierung der einzelnen Zellen nicht ermöglichte. Der Kardiomyozyt selbst konnte daher nicht als eigene Kontrolle verwendet werden. Somit fanden alle Versuche unter Hypoxie-Reoxygenierung, ähnlich des Prinzips des „*ischemic pelleting*“<sup>333</sup>, in Eppendorf-Reaktionsgefäßen statt (Durchführung siehe Abschnitt 3.4). Zur Bestimmung des Überlebens der Kardiomyozyten und des Einflusses des BK-Kanals *in vitro* bei Hypoxie-Reoxygenierung wurden die isolierten Kardiomyozyten für 90 min Hypoxie bei 0% O<sub>2</sub> bzw. 90 min Normoxie bei 21% O<sub>2</sub>  $\pm$  120 min Reoxygenierung bei 21% O<sub>2</sub> inkubiert (Durchführung siehe Abschnitt 3.4). Das Ausmaß des nekrotischen Zelltods wurde anschließend mittels LDH-Aktivität im Überstand des Zellmediums bestimmt (Durchführung siehe Abschnitt 3.4.1). Ob apoptotische Prozesse bei der Zellzerstörung eine Rolle spielen, wurde anhand der Caspase-3-Aktivität ermittelt (Durchführung siehe Abschnitt 3.4.2). Die Bestimmung der LDH-

Aktivität im Überstand ist eine weit verbreitete und anerkannte Methode zur Bestimmung des nekrotischen Zelltods und die Messung der Caspase-3-Aktivität gilt als charakteristischer Apoptosemarker<sup>334,336</sup>. Zur Isolation der Kardiomyozyten wurden BK-WT und BK-KO Mäuse beider Geschlechter im Alter von 8 bis 10 Wochen herangezogen.

Die Morphologie der Kardiomyozyten änderte sich bei Inkubation unter hypoxischen Bedingungen und längerer normoxischer Inkubation. Repräsentative Bilder der morphologischen Veränderungen der Zellen sind in Abbildung 4.11 dargestellt. Während der Inkubation ließ sich eine fortschreitende Hyperkontraktion der Kardiomyozyten beobachten. Diese führte schließlich zur Zerstörung der membranären Strukturen und zum Zelltod. Abbildung 4.11A zeigt lebende Kardiomyozyten nach 90 min Normoxie, die anhand ihres stabförmigen Aussehens und der gut sichtbaren Querstreifung zu erkennen waren. In Abbildung 4.11B sind hingegen Kardiomyozyten nach 90 min Inkubation unter Hypoxie dargestellt.



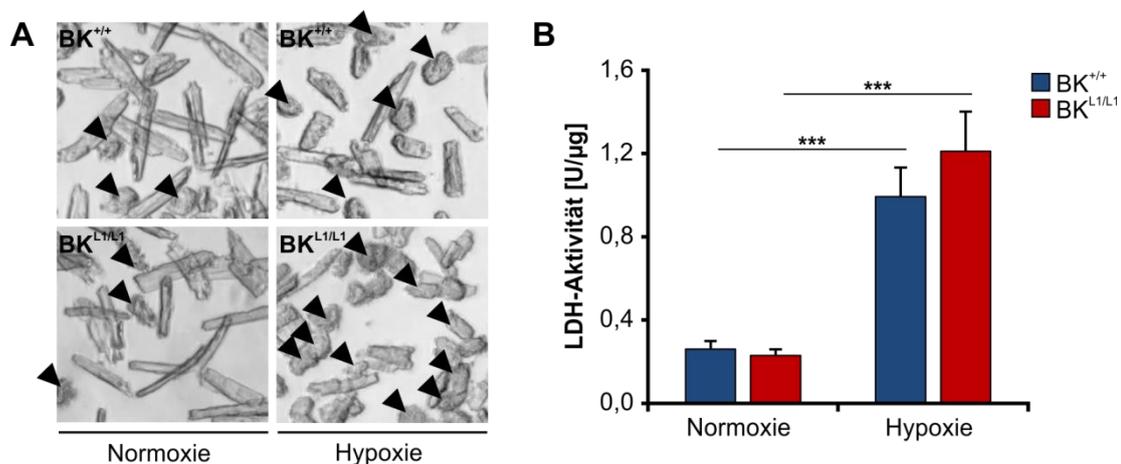
### Abbildung 4.11 Morphologische Veränderungen während Hypoxie

(A) Stabförmige lebende Kardiomyozyten nach 90 min Normoxie. (B) Durch Inkubation unter hypoxischen Bedingungen (90 min) ändern die Kardiomyozyten ihre Form. Die membranären Strukturen wurden zerstört. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m

#### 4.6.1 Ausmaß des nekrotischen Zelltods nach Hypoxie

Zuerst wurde der Zelltod nach 90 min Normoxie bzw. 90 min Hypoxie untersucht. In Abbildung 4.12A sind makroskopische Aufnahmen nach Normoxie bzw. Hypoxie dargestellt. Die schwarzen Pfeile markieren eindeutig tote Kardiomyozyten. Nach 90 min Normoxie waren keine Unterschiede zwischen den Genotypen erkennbar (Abbildung 4.12A links). Nach 90 min Hypoxie nahm sowohl in BK-WT als auch in BK-KO Kardiomyozytenkulturen die Zahl der toten Zellen zu (Abbildung 4.12A rechts). Dabei scheinen die BK-defizienten Kardiomyozyten den makroskopischen Befunden nach zu urteilen nach 90 min Hypoxie mehr tote Zellen aufzuweisen als die BK-WT Kardiomyozyten. Auch in der LDH-Aktivität ergab sich nach Inkubation der Kardiomyozyten unter normoxischen Bedingungen kein Unterschied zwischen den Genotypen (Abbildung 4.12B). Im Vergleich dazu führte die Inkubation unter hypoxischen Bedingungen sowohl in den BK-WT als auch in den BK-KO Kardiomyozyten zu signifikant mehr Zelltod (BK-WT:  $0,99 \pm 0,14$  U/ $\mu$ g für Hypoxie vs.  $0,26 \pm 0,04$  U/ $\mu$ g für Normoxie; BK-KO:  $1,21 \pm 0,19$  U/ $\mu$ g für Hypoxie vs.  $0,23 \pm 0,03$  U/ $\mu$ g für Normoxie). Die BK-KO Kardiomyozyten zeigten im Vergleich zu den BK-WT Kardiomyozyten, analog den makroskopischen Befunden, eine tendenziell höhere LDH-Aktivität nach 90 min Hypoxie, die das

Signifikanzniveau jedoch nicht erreichte. Die Befunde deuten auf einen erhöhten nekrotischen Zelltod der BK-defizienten Kardiomyozyten nach 90 min Hypoxie hin.



#### Abbildung 4.12 Einfluss des BK-Kanals auf das Überleben bei Hypoxie

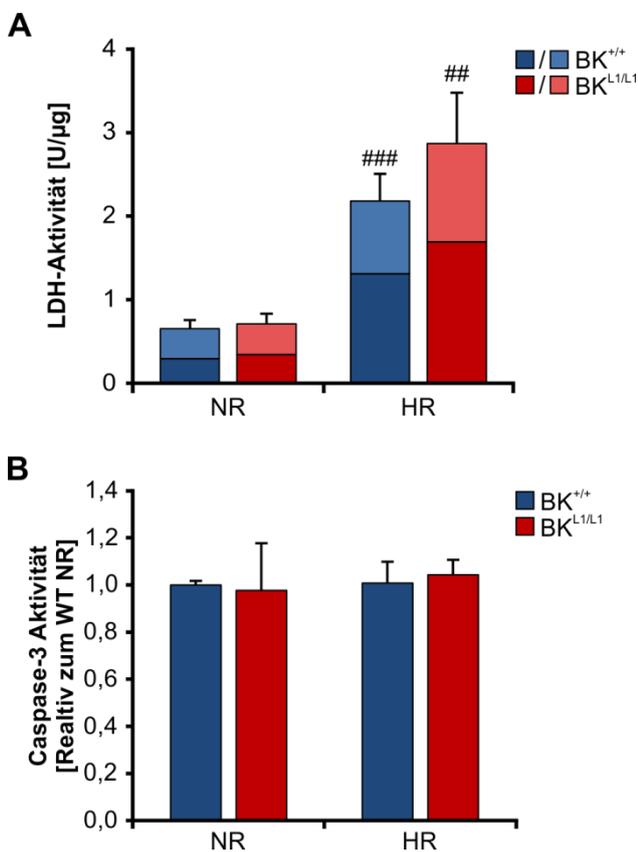
(A) Nach 90 min Hypoxie waren in beiden Genotypen makroskopisch mehr tote Kardiomyozyten als nach 90 min Normoxie zu erkennen. Dabei ließ sich eine Tendenz zu mehr Zelltod in hypoxieexprimierten BK-KO Kardiomyozyten feststellen. (B) Nach 90 min Hypoxie zeigte sich sowohl in BK-WT als auch in BK-KO Kardiomyozyten eine signifikant höhere LDH-Aktivität im Vergleich zu 90 min Normoxie. Erneut zeigte sich nach 90 min Hypoxie im BK-KO eine Tendenz zur höheren LDH-Aktivität im Vergleich zum BK-WT. BK-WT (BK<sup>+/+</sup>): Normoxie n=19 und Hypoxie n=17; BK-KO (BK<sup>L1/L1</sup>): Normoxie n=16 und Hypoxie n=17. Balken repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM; \*\*\*p<0,001.

#### 4.6.2 Ausmaß des nekrotischen und apoptotischen Zelltods nach Hypoxie-Reoxygenierung

Da die Reoxygenierung erheblich zum Zelltod beiträgt, wurde das Ausmaß des nekrotischen und apoptotischen Zelltods einerseits durch die LDH-Aktivität im Zellüberstand und andererseits durch die Caspase-3-Aktivität nach 90 min Normoxie und 120 min Reoxygenierung (NR) bzw. 90 min Hypoxie und 120 min Reoxygenierung (HR) bestimmt (Durchführung und Auswertung siehe Abschnitt 3.4.1 und 3.4.2). Die LDH-Aktivität nach NR bzw. HR setzt sich dabei aus der LDH-Aktivität nach Normoxie bzw. Hypoxie (Abbildung 4.13A dunkle Farben) und der LDH-Aktivität nach anschließender Reoxygenierung (Abbildung 4.13A helle Farben) zusammen (siehe auch Abschnitt 3.4.1).

Nach NR wies die LDH-Aktivität keine Unterschiede zwischen BK-WT und BK-KO Kardiomyozyten auf (Abbildung 4.13A). Nach HR war die LDH-Aktivität in beiden Genotypen jeweils signifikant höher als nach NR (BK-WT:  $2,18 \pm 0,33$  U/μg für HR vs.  $0,66 \pm 0,10$  U/μg für NR; BK-KO:  $2,87 \pm 0,61$  U/μg für HR vs.  $0,71 \pm 0,12$  U/μg für NR). Die BK-defizienten Kardiomyozyten zeigten dabei eine tendenziell höhere LDH-Aktivität nach HR im Vergleich zu den BK-WT Kardiomyozyten. Dieser Unterschied erreichte jedoch nicht das Signifikanzniveau. Betrachtet man die isolierte LDH-Aktivität nach Normoxie bzw. Hypoxie wurden die initial erhobenen Befunde (siehe Abschnitt 4.6.1, Abbildung 4.12B) bestätigt. Nach 90 min Normoxie zeigten sich keine Unterschiede zwischen den

Genotypen. Nach 90 min Hypoxie war sowohl in BK-WT als auch in BK-KO Kardiomyozyten die LDH-Aktivität signifikant höher als in der entsprechenden Normoxiegruppe (BK-WT:  $1,31 \pm 0,24$  U/ $\mu$ g für Hypoxie vs.  $0,29 \pm 0,07$  U/ $\mu$ g für Normoxie; BK-KO:  $1,69 \pm 0,51$  U/ $\mu$ g für Hypoxie vs.  $0,34 \pm 0,08$  U/ $\mu$ g für Normoxie). Der BK-KO zeigte auch hier eine tendenziell höhere LDH-Aktivität nach 90 min Hypoxie im Vergleich zum BK-WT. Es ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen. Auch die isolierte Betrachtung der LDH-Aktivität nach Reoxygenierung, die sich der Normoxie anschloss ( $R_N$ ), ergab keinen Unterschied zwischen den BK-WT und BK-KO Kardiomyozyten (BK-WT:  $0,36 \pm 0,05$  U/ $\mu$ g; BK-KO:  $0,37 \pm 0,07$  U/ $\mu$ g). Die isolierte LDH-Aktivität der Reoxygenierung am Anschluss an 90 min Hypoxie ( $R_H$ ) war hingegen sowohl im BK-WT mit  $0,87 \pm 0,13$  U/ $\mu$ g als auch im BK-KO mit  $1,18 \pm 0,19$  U/ $\mu$ g signifikant höher im Vergleich zur entsprechenden LDH-Aktivität nach  $R_N$ . Die LDH-Aktivität nach  $R_H$  der BK-KO Kardiomyozyten hatte auch hier eine Tendenz zu höheren Aktivitätswerten, es wurde jedoch kein signifikanter Unterschied zu BK-WT Kardiomyozyten erreicht.



**Abbildung 4.13 Einfluss des BK-Kanals auf nekrotischen und apoptotischen Zelltod bei Hypoxie-Reoxygenierung**

(A) Nach 90 min Hypoxie und 120 min Reoxygenierung (HR) zeigte sich im Vergleich zu 90 min Normoxie und anschließender Reoxygenierung von 120 min (NR) sowohl in BK-WT als auch in BK-KO Kardiomyozyten eine signifikant höhere LDH-Aktivität. BK-WT (BK<sup>+/+</sup>): NR n=8 und HR n=8; BK-KO (BK<sup>L1/L1</sup>): NR n=8 und HR n=9. (B) Die Caspase-3-Aktivität ergab weder zwischen den Versuchsbedingungen NR und HR noch zwischen den Genotypen Unterschiede. BK-WT (BK<sup>+/+</sup>) n=8; BK-KO (BK<sup>L1/L1</sup>) n=6. Balken repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM. ##p<0,01; ###p<0,001 im Vergleich zu NR des entsprechenden Genotyps.

Die Messung der Caspase-3-Aktivität ergab ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Genotypen und den Bedingungen Normoxie-Reoxygenierung bzw. Hypoxie-Reoxygenierung (Abbildung 4.13B). Der apoptotische Zelltod war weder nach HR noch nach NR in BK-WT und BK-KO Kardiomyozyten verändert. Die vorliegenden Ergebnissen implizieren somit, dass *in vitro* Hypoxie und Reoxygenierung primär zu nekrotischem Zelltod führen.

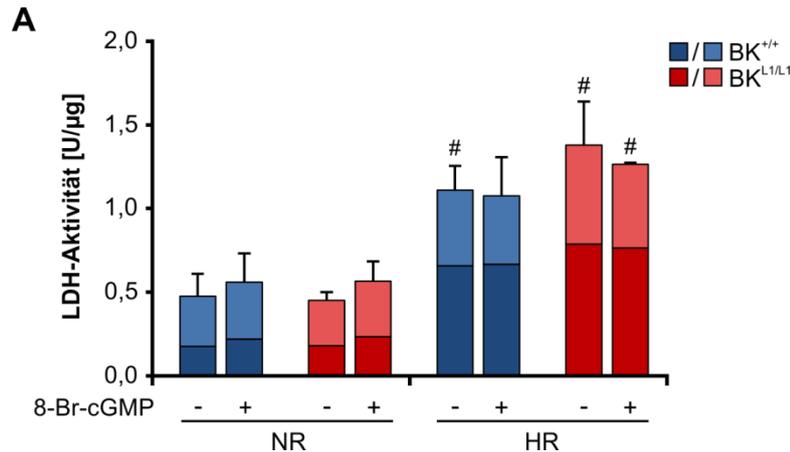
## 4.7 Einfluss einer pharmakologischen Modulation des BK-Kanals auf das Zellüberleben von Kardiomyozyten bei *in vitro* Hypoxie-Reoxygenierung

Aufgrund der vielen Hinweise, dass der cGMP/cGKI-Signalweg und eine mitoBK-Öffnung an der Zellprotektion beteiligt sind (siehe Abschnitt 1.7.4), wurden im Folgenden Pharmaka untersucht, die diesen Signalweg modulieren bzw. den BK-Kanal öffnen. Eine Stimulation der Kardiomyozyten erfolgte dabei über die gesamte Versuchszeit, d.h. sowohl während der Normoxie bzw. Hypoxie als auch während der Reoxygenierung (Durchführung siehe Abschnitt 3.4). Das Ausmaß des nekrotischen Zelltods wurde erneut über die LDH-Aktivität im Überstand des Zellkulturmediums bestimmt (siehe Abschnitt 3.4.1).

### 4.7.1 Auswirkungen einer Stimulation des cGMP/cGKI-Signalweges auf den nekrotischen Zelltod bei *in vitro* Hypoxie-Reoxygenierung

Um zu untersuchen ob eine Stimulation des cGMP/cGKI-Signalwegs zum mitoBK-vermittelten Zellüberleben der Kardiomyozyten führt, wurde zum einen mit dem membrangängigen cGMP-Analogen 8-Br-cGMP stimuliert und zum anderen wurde die sGC, die eine der beiden cGMP-generierenden Guanylatzyklasen darstellt, mit Cinaciguat aktiviert.

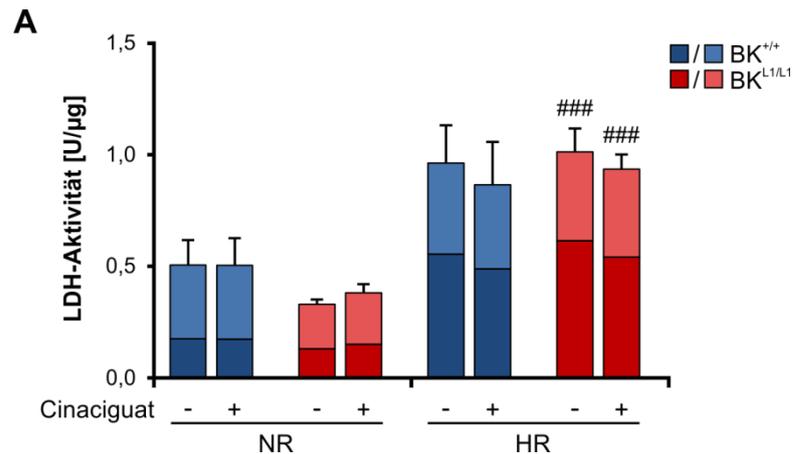
Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine 8-Br-cGMP-Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  gewählt<sup>221,222,241</sup>. Es konnte *in vitro* durch Zugabe von 8-Br-cGMP kein Einfluss auf den nekrotischen Zelltod der Kardiomyozyten gezeigt werden (Abbildung 4.14). Nach NR waren zwischen den Genotypen keine Unterschiede erkennbar (BK-WT:  $0,48 \pm 0,13 \text{ U}/\mu\text{g}$ ; BK-KO:  $0,45 \pm 0,05 \text{ U}/\mu\text{g}$ ). Auch die Stimulation der Kardiomyozyten mit 8-Br-cGMP hatte keinen Einfluss auf die LDH-Aktivität bei NR (BK-WT:  $0,63 \pm 0,17 \text{ U}/\mu\text{g}$ ; BK-KO:  $0,57 \pm 0,12 \text{ U}/\mu\text{g}$ ). Dies steht in Einklang mit den initialen Ergebnissen zur basalen LDH-Aktivität nach NR in BK-WT und BK-KO Kardiomyozyten (siehe Abschnitt 4.6.2). Nach HR  $\pm$  8-Br-cGMP zeigten sich sowohl in BK-WT als auch in BK-KO Kardiomyozyten höhere LDH-Aktivitäten als in den entsprechenden NR-Gruppen, was die initialen Ergebnissen zur basalen LDH-Aktivität nach HR ebenfalls bestätigt (siehe Abschnitt 4.6.2). Sowohl die unbehandelten BK-WT Kardiomyozyten mit  $1,11 \pm 0,14 \text{ U}/\mu\text{g}$  als auch die unbehandelten BK-KO Kardiomyozyten mit  $1,38 \pm 0,26 \text{ U}/\mu\text{g}$  zeigten dementsprechend eine signifikant höhere LDH-Aktivität nach HR als nach entsprechend unbehandelter NR. Die LDH-Aktivität nach HR der mit 8-Br-cGMP stimulierten BK-KO Kardiomyozyten mit  $1,26 \pm 0,01 \text{ U}/\mu\text{g}$  zeigte im Vergleich zur entsprechenden NR mit 8-Br-cGMP ebenfalls einen signifikanten Anstieg, wohingegen die LDH-Aktivität nach HR der mit 8-Br-cGMP stimulierten BK-WT Kardiomyozyten mit  $1,08 \pm 0,23 \text{ U}/\mu\text{g}$  im Vergleich zur entsprechenden NR deutlich, jedoch nicht signifikant, erhöht war. Ein Unterschied zwischen den Genotypen in der der LDH-Aktivität nach HR  $\pm$  8-Br-cGMP konnte nicht beobachtet werden. Die einzelnen Werte der LDH-Aktivitäten  $\pm$  8-Br-cGMP sind im Anhang (siehe Tabelle 7.6) zu finden.



#### Abbildung 4.14 Einfluss von 8-Br-cGMP auf den nekrotischen Zelltod bei Hypoxie-Reoxygenierung

Eine Stimulation mit 8-Br-cGMP (100 µM) während Hypoxie-Reoxygenierung hatte keinen Einfluss auf den nekrotischen Zelltod der Kardiomyozyten. Entsprechend waren weder im BK-WT noch im BK-KO Unterschiede im Zellüberleben der mit 8-Br-cGMP stimulierten Kardiomyozyten im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen zu beobachten. BK-WT (BK<sup>+/+</sup>); BK-KO (BK<sup>L1/L1</sup>) mit je n=4. Balken repräsentieren Mittelwerte ± SEM. #p<0,05 im Vergleich zur entsprechenden NR des Genotyps.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde überprüft, inwiefern die Aktivierung der sGC mit Cinaciguat (25 nM) einen Einfluss auf den nekrotischen Zelltod bei NR bzw. HR hat. Vorrangigegangene *in vitro* Arbeiten haben gezeigt, dass Cinaciguat in einer Konzentration von 25 nM und 50 nM zu einer deutlichen Reduktion der Apoptose bei Hypoxie-Reoxygenierung in isolierten murinen Kardiomyozyten führt<sup>229</sup>. Nach NR waren weder Unterschiede zwischen den Genotypen ± Cinaciguat noch innerhalb der geotypspezifischen Versuchsgruppen ± Cinaciguat erkennbar (Abbildung 4.15). Nach HR ± Cinaciguat zeigten sich in beiden Genotypen höhere LDH-Aktivitäten als nach NR ± Cinaciguat, was die vorherigen Beobachtungen und die Reproduzierbarkeit der Methode generell bestätigt (siehe weiter oben im Abschnitt und Abschnitt 4.6.2). Dabei ergab sich nach HR ± Cinaciguat sowohl in BK-WT als auch in BK-KO Kardiomyozyten eine höhere LDH-Aktivität als nach entsprechender NR. Dieser Unterschied stellte sich jedoch nur in BK-KO Kardiomyozyten ± Cinaciguat signifikant dar (BK-WT Kontrolle: 0,96 ± 0,17 U/µg für HR vs. 0,51 ± 0,11 U/µg für NR; BK-WT Cinaciguat: 0,87 ± 0,19 U/µg für HR vs. 0,47 ± 0,12 U/µg für NR; BK-KO Kontrolle: 1,01 ± 0,11 U/µg für HR vs. 0,33 ± 0,02 U/µg für NR; BK-KO Cinaciguat: 0,93 ± 0,07 U/µg für HR vs. 0,38 ± 0,04 U/µg für NR). Ein Unterschied zwischen den Genotypen in der der LDH-Aktivität nach HR ± Cinaciguat konnte nicht beobachtet werden. Die einzelnen Werte der LDH-Aktivitäten sind im Anhang (Tabelle 7.7) zu finden.



#### Abbildung 4.15 Einfluss der sGC-Aktivierung mit Cinaciguat auf den nekrotischen Zelltod bei Hypoxie-Reoxygenierung

Eine Stimulation mit Cinaciguat während Hypoxie-Reoxygenierung in einer Konzentration von 25 nM hatte keinen Einfluss auf den nekrotischen Zelltod der Kardiomyozyten. Weder im BK-WT noch im BK-KO waren Unterschiede im Zellüberleben der mit Cinaciguat stimulierten Kardiomyozyten im Vergleich zu den Kontrollen zu beobachten. BK-WT (BK<sup>+/+</sup>); BK-KO (BK<sup>L1/L1</sup>) mit je n=5. Balken repräsentieren Mittelwerte ± SEM. ###p<0,001 im Vergleich zur entsprechenden NR des Genotyps.

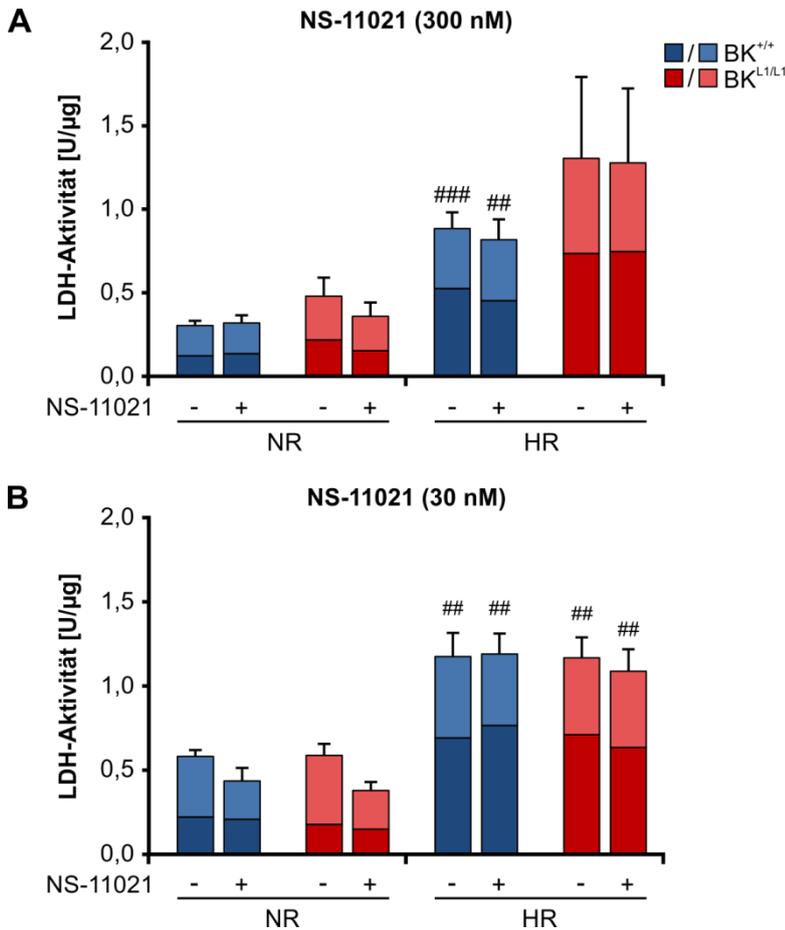
Zusammenfassend zeigten die LDH-Aktivitätsmessungen bei *in vitro* Hypoxie-Reoxygenierung weder für das cGMP-Analogon 8-Br-cGMP noch für eine cGMP-Erhöhung, durch Aktivierung der sGC mit Cinaciguat, einen zellprotektiven Effekt. Diese Befunde implizieren, dass in isolierten adulten Kardiomyozyten cGMP-Signalwege über funktionale mitoBK-Kanäle nicht vor Schädigungsmechanismen der Hypoxie-Reoxygenierung schützen.

#### 4.7.2 Auswirkungen einer BK-Kanal-Öffnung mittels NS11021 auf den nekrotischen Zelltod bei *in vitro* Hypoxie-Reoxygenierung

Da weder durch eine direkte Stimulation der cGKI mit 8-Br-cGMP noch durch eine Aktivierung der sGC mit Cinaciguat eine Zellprotektion bei *in vitro* Hypoxie-Reoxygenierung gezeigt werden konnte, wurde als nächstes der Einfluss einer direkten BK-Kanal-Öffnung auf das Zellüberleben der Kardiomyozyten untersucht. Auf Grund der Ergebnisse der respiratorischen Messungen mit NS11021 (siehe Abschnitt 4.5.1), die zeigten, dass NS11021 in einer mikromolaren Konzentration toxisch auf die isolierten Mitochondrien wirkte und angelehnt an andere *in vitro* Untersuchungen<sup>294,318,361</sup> wurde eine NS11021 Konzentration im nanomolaren Bereich von 300 nM und 30 nM (Abbildung 4.16) für die *in vitro* Hypoxie-Reoxygenierungsexperimente eingesetzt. Die einzelnen Werte der LDH-Aktivität ± 300 nM und 30 nM NS11021 sind im Anhang (Tabelle 7.8) zu finden.

Für beide NS11021-Konzentrationen waren nach NR in der LDH-Aktivitäten weder Unterschiede zwischen den Genotypen ± NS11021 noch innerhalb der geotypspezifischen Versuchsgruppen ± NS11021 erkennbar (Abbildung 4.16A 300 nM und B 30 nM). Nach HR ± NS11021 waren in beiden Genotypen höhere LDH-Aktivitäten zu beobachten als nach entsprechender NR ± NS11021, was die bisherigen Befunde bestätigt (vgl. Abschnitt 4.6.2 und 4.7.1). Während für die BK-WT

Kardiomyozyten die LDH-Aktivitäten nach HR  $\pm$  300 nM und 30 nM NS11021 jeweils signifikant erhöht waren zeigte sich in BK-KO Kardiomyozyten nur für die LDH-Aktivitäten nach HR  $\pm$  30 nM NS11021 ein signifikanter Unterschied. Ein genotypspezifischer Unterschied in der der LDH-Aktivität nach HR  $\pm$  NS11021 konnte nicht beobachtet werden. Interessanterweise war nach HR jedoch nur in BK-KO Kardiomyozyten  $\pm$  300 nM NS11021 ein tendenziell erhöhter nekrotischer Zelltod im Vergleich zu BK-WT Kardiomyozyten zu beobachten.



**Abbildung 4.16 Einfluss des BK-Kanalöffners NS11021 auf den nekrotischen Zelltod bei Hypoxie-Reoxygenierung**

NS11021 in einer Konzentration von (A) 300 nM und (B) 30 nM hatte keinen Einfluss auf den nekrotischen Zelltod der Kardiomyozyten. Weder im BK-WT noch im BK-KO waren Unterschiede im Zellüberleben nach NR bzw. HR der mit NS11021 stimulierten Kardiomyozyten im Vergleich zu den Kontrollen zu beobachten. (A) BK-WT (BK<sup>+/+</sup>) mit je n=5; BK-KO (BK<sup>L1/L1</sup>) mit je n=4 (B) BK-WT und BK-KO mit je n=4. Balken repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM. ##p<0,01; ###p<0,001 im Vergleich zur entsprechenden NR des Genotyps.

Die Versuche zeigten, dass NS11021 in einer Konzentration von 300 nM (Abbildung 4.16A) und 30 nM (Abbildung 4.16B) bei *in vitro* Hypoxie-Reoxygenierung keinen Einfluss auf den nekrotischen Zelltod der Kardiomyozyten hat. Weder im BK-WT noch im BK-KO waren Unterschiede im Zellüberleben nach NR bzw. HR der mit NS11021 stimulierten Kardiomyozyten im Vergleich zu den Kontrollen zu beobachten. Zusammenfassend scheint NS11021 bei *in vitro* Hypoxie-Reoxygenierung keine zellprotektiven Eigenschaften zu besitzen.

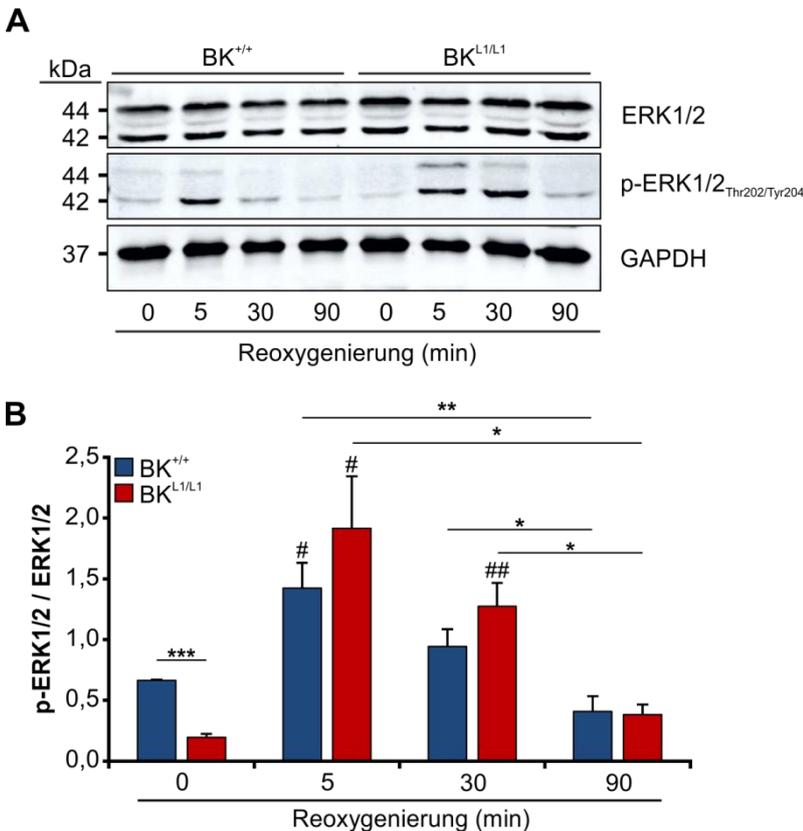
## 4.8 Einfluss des kardiomyozytären BK-Kanals auf antiapoptotische Signalwege bei Hypoxie-Reoxygenierung

Die bisherigen Untersuchungen haben keinen signifikanten Unterschied im nekrotischen und apoptotischen Zelltod zwischen BK-WT und BK-KO Kardiomyozyten bei Hypoxie-Reoxygenierung gezeigt (siehe Abschnitt 4.6.2). Auch eine pharmakologische Modulation des cGMP/cGKI-Signalweges (Abschnitt 4.7.1) oder des BK-Kanals (Abschnitt 4.7.2) hat das Zellüberleben der Kardiomyozyten bei *in vitro* Hypoxie Reoxygenierung nicht verbessert. Da die Aktivierung des RISK (*reperfusion injury salvage kinase*)-Signalweges für die Protektion bei Hypoxie-Reoxygenierung eine wichtige Rolle spielt (siehe Abschnitt 1.5.1) und es vor allem in den ersten Minuten der Reoxygenierung zu einem Anstieg in der Phosphorylierung von ERK1/2 und Akt kommt, wurde die Aktivierung dieser Kinasen sowie den putativen Signalmolekülen GSK-3 $\beta$  und PKC $\epsilon$  im Folgenden untersucht. Zudem wurde die Aktivierung der Caspase-3 als wichtige Effektorcaspase der Apoptose analysiert. Hierfür wurden isolierte Kardiomyozyten von globalen BK-defizienten Tieren und ihren Wurfgeschwisterkontrollen (BK-WT) einer 90 min Hypoxie mit anschließender Reoxygenierungszeit von entweder 0, 5, 30 oder 90 min unterzogen. Anschließend wurden Western-Blot-Analysen (siehe Abschnitt 3.7.5) durchgeführt und die gesamten Proteinmengen der untersuchten Kinasen sowie die Phosphorylierung mit Hilfe von spezifischen Phospho-/Antikörpern nachgewiesen (siehe 2.3.8). Zur Quantifizierung der Gesamtproteinmengen und der phospho-Banden wurden diese jeweils zuerst auf die Ladungskontrolle GAPDH, die auf derselben Membran co-detektiert wurde, bezogen, um eventuelle Unterschiede in der geladenen Proteinmenge auszugleichen. Zur Ermittlung des Phosphorylierungsstatus, wurde anschließend der Quotient aus phosphoryliertem Protein zu Gesamtprotein gebildet. Die Mittelwerte der jeweiligen Quantifizierung sind im Anhang (Tabelle 7.9) zu finden.

### 4.8.1 Phosphorylierungsmuster und Aktivierung von ERK1/2 und Akt als Hauptmediatoren des RISK-Signalweges

Die Phosphorylierung der ERK1/2-Kinasen (p-ERK1/2) erfolgt durch übergeordnete MEK1/2-Kinasen, die ERK1/2 an Thr202 und Tyr204 phosphorylieren (siehe auch Abschnitt 1.5.1). Die gesamte ERK1/2-Proteinmenge und die des phosphorylierten ERK1/2 (p-ERK1/2<sub>Thr202/Tyr204</sub>) wurde mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Abbildung 4.17A zeigt das Phosphorylierungsmuster von ERK1/2. In Abbildung 4.17B ist das Verhältnis von p-ERK1/2 zur gesamten ERK1/2-Proteinmenge dargestellt. Insgesamt war zu beobachten, dass die Aktivierungen der beiden Kinasen ERK1 und ERK2 im jeweiligen Genotyp ähnlich verliefen (*Daten nicht gezeigt*). Nach 90 min Hypoxie ohne Reoxygenierung zeigte sich bereits eine Aktivierung der ERK1/2. Dabei war die Aktivierung der ERK1/2 Kinasen in BK-WT Kardiomyozyten nach 90 min Hypoxie signifikant höher als in BK-KO Kardiomyozyten (Abbildung 4.17B). Wie erwartet stieg die Phosphorylierung sowohl in den BK-WT als auch in den BK-KO Kardiomyozyten in den ersten Minuten der Reperfusion signifikant an. Die Aktivierung von ERK1/2 war jedoch nur temporär. So ließ sich in beiden Genotypen im Laufe der 90 min Reoxygenierung eine Abnahme der p-ERK1/2-Level beobachten. In den BK-KO Kardiomyozyten war nach 30 min Reoxygenierung noch eine signifikant höhere Phosphorylierung im

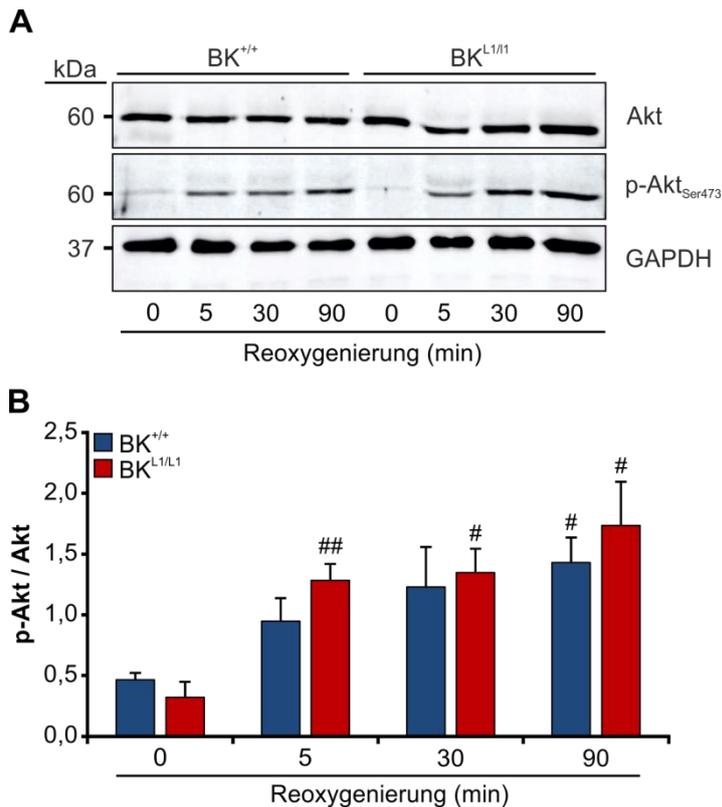
Vergleich zur Hypoxie zu beobachten, während sich in den BK-WT Kardiomyozyten die Werte schon normalisiert hatten (Abbildung 4.17A und B).



#### Abbildung 4.17 Phosphorylierung von ERK1/2 bei Reoxygenierung

(A) Repräsentative Proteinbanden der gesamten ERK1/2-Proteinmenge und der an Thr202 und Tyr204 phosphorylierten ERK1/2 (p-ERK1/2<sub>Thr202/Tyr204</sub>) nach 90 min Hypoxie und zu unterschiedlichen Reoxygenierungszeiten. (B) Die Phosphorylierung von ERK1/2 stieg sowohl in den BK-WT als auch in den BK-KO Kardiomyozyten initial in den ersten 5 min der Reoxygenierung stark an und nahm dann im Laufe der Reoxygenierung wieder ab. BK-WT (BK<sup>+/+</sup>) n=4; BK-KO (BK<sup>L1/L1</sup>) n=3 unabhängige Experimente; Balken repräsentieren Mittelwerte ± SEM; \*p<0,05; \*\*\*p<0,001. #p<0,05; ##p<0,01 zur Hypoxie des entsprechenden Genotyps.

Neben ERK1/2 zählt die Proteinkinase Akt zu den Hauptmediatoren des RISK-Signalweges (siehe Abschnitt 1.5.1). Akt wird über den PI3K-Signalweg durch Phosphorylierung an Ser473 aktiviert. Um die Aktivierung von Akt zu untersuchen, wurde die Gesamt-Akt-Proteinmenge sowie die des phosphorylierten Akts (p-Akt<sub>Ser473</sub>) mittels Western-Blot-Analyse bestimmt. Abbildung 4.18 zeigt das Phosphorylierungsmuster von Akt sowie das Verhältnis von p-Akt zu Akt. Bereits nach 90 min Hypoxie erfolgte eine Aktivierung der Akt, die im Laufe der Reoxygenierung kontinuierlich zunahm. Diese Zunahme war sowohl in BK-WT als auch in BK-KO Kardiomyozyten zu beobachten (Abbildung 4.18A und B) und verlief in beiden Genotypen synchron. Nur in den BK-defizienten Kardiomyozyten erreichte das Ausmaß der Phosphorylierung bereits nach 5 min signifikant höhere Werte als nach Hypoxie. In den BK-WT Kardiomyozyten hingegen war die signifikante Zunahme des Phosphorylierungsstatus im Vergleich zur Hypoxie erst nach 90 min Reoxygenierung feststellbar.



**Abbildung 4.18 Phosphorylierung von Akt bei Reoxygenierung**

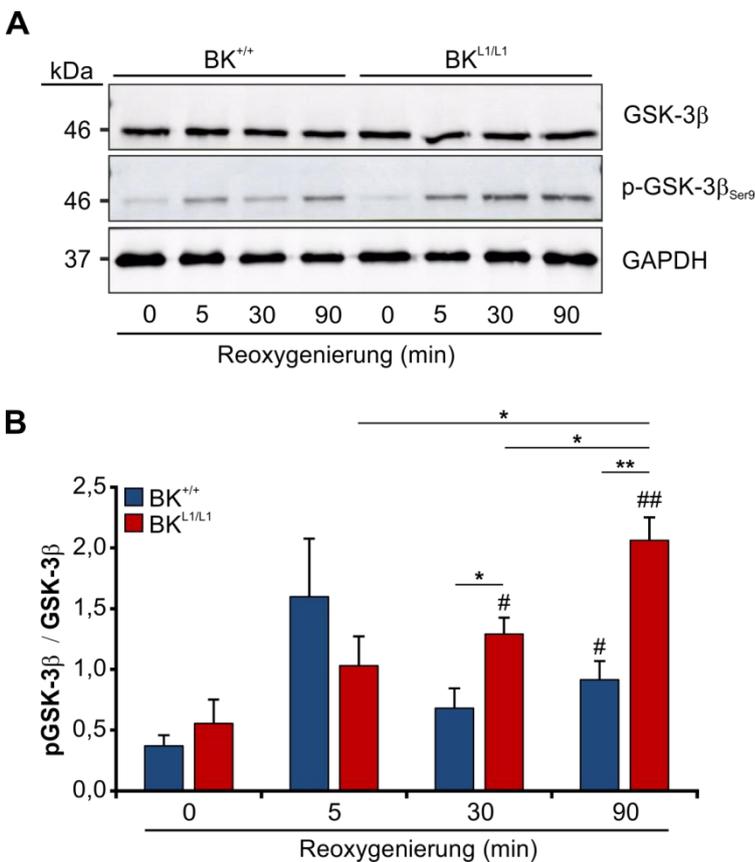
(A) Repräsentative Proteinbanden der gesamten Akt-Proteinmenge und der an Ser473 phosphorylierten Akt (p-Akt<sub>Ser473</sub>) nach 90 min Hypoxie und zu unterschiedlichen Reoxygenierungszeiten. (B) Die Phosphorylierung von Akt stieg sowohl in BK-WT als auch in BK-KO Kardiomyozyten im Laufe der Reoxygenierung kontinuierlich an. BK-WT (BK<sup>+/+</sup>) n=4; BK-KO (BK<sup>L1/L1</sup>) n=3; Balken repräsentieren Mittelwerte ± SEM; #p<0,05; ##p<0,01 zur Hypoxie des entsprechenden Genotyps.

Diese Ergebnisse bestätigten die These, dass die Signalmoleküle ERK1/2 und Akt während der Reoxygenierung phosphoryliert werden. Dabei waren die Kinetik und das Ausmaß der Phosphorylierung in BK-WT und BK-defizienten Kardiomyozyten vergleichbar. Es konnte nur zwischen BK-WT und BK-KO Kardiomyozyten ein signifikanter Unterschied in der ERK1/2-Aktivierung nach 90 min Hypoxie gezeigt werden (Abbildung 4.17B). Es zeigt sich außerdem, dass ERK1/2 und Akt während der 90 min Reoxygenierung nicht synchron reguliert werden. Die Phosphorylierung von ERK1/2 war dabei zu Beginn der Reperfusion (nach 5 min) am höchsten und nahm dann wieder stetig ab, während die Phosphorylierung von Akt hingegen eine kontinuierliche Zunahme zeigte.

#### 4.8.2 Phosphorylierungsmuster von GSK-3 $\beta$ als Indikator für die mPTP-Öffnungswahrscheinlichkeit

ERK1/2 und Akt haben zum einen direkte aber auch indirekte Effekte auf den Apoptosesignalweg. Das zelluläre Überleben wird auf die Phosphorylierung und Inaktivierung einer Vielzahl von proapoptotischen Proteinen zurückgeführt (siehe Abschnitt 1.5.1 und Abbildung 1.6). Ein Hauptziel ist dabei die Hemmung der mPTP-Öffnung. Die GSK-3 $\beta$  gilt als wichtiger Trigger der mPTP-Öffnung und kann sowohl indirekt von ERK1/2 und Akt über die p70S6-Kinase als auch direkt von Akt an Ser9 phosphoryliert werden, was eine Inaktivierung der GSK-3 $\beta$  zur Folge hat (siehe Abschnitt 1.5.1). In ihrem phosphorylierten inaktiven Zustand gilt sie als wichtiger Inhibitor der mPTP-Öffnung und daher wurde im Folgenden die zeitabhängige Phosphorylierung der GSK-3 $\beta$  bei Reoxygenierung nach 90 min Hypoxie untersucht. Das Phosphorylierungsmuster der GSK-3 $\beta$  sowie das Verhältnis von

p-GSK-3 $\beta$  zu GSK-3 $\beta$  ist in Abbildung 4.19 dargestellt. Nach 90 min Hypoxie war bereits in beiden Genotypen eine Phosphorylierung der GSK-3 $\beta$  erfolgt. In BK-defizienten Kardiomyozyten nahm die GSK-3 $\beta$ -Phosphorylierung kontinuierlich zu und nach 30 min war ein signifikanter Unterschied zur Hypoxie erreicht (Abbildung 4.19A und B). In BK-WT Kardiomyozyten zeigte sich, ähnlich der ERK1/2-Aktivierung (vgl. Abbildung 4.17), bereits zu Beginn der Reoxygenierung d.h. nach 5 min ein deutlicher Anstieg der Phosphorylierung, die im weiteren Verlauf der 90 min Reoxygenierung wieder abnahm. Durch die unterschiedliche Kinetik in der GSK-3 $\beta$  Phosphorylierung in den BK-WT und BK-KO Kardiomyozyten ergab sich im BK-KO ein signifikant höherer Phosphorylierungsstatus der GSK-3 $\beta$  nach 30 min und 90 min Reoxygenierung im Vergleich zum BK-WT.



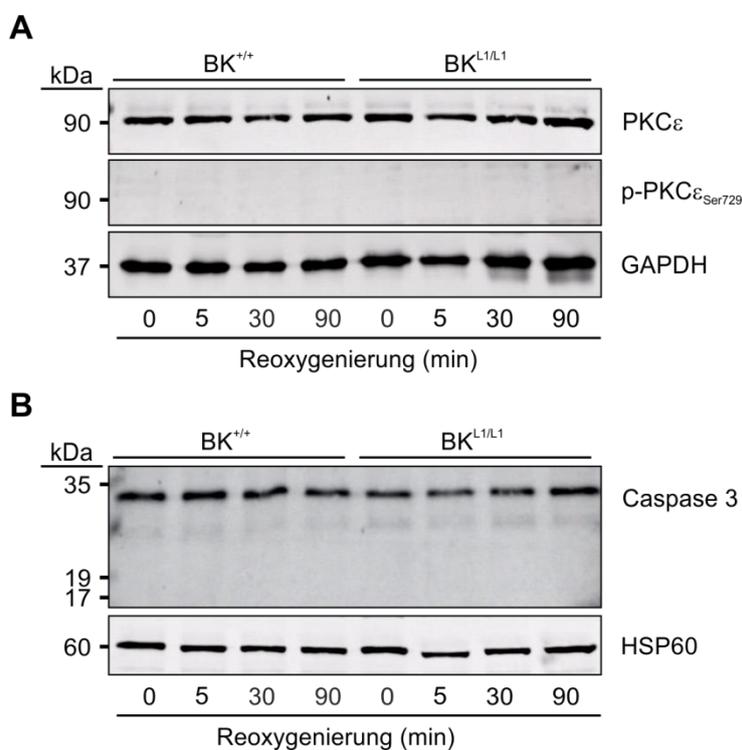
#### Abbildung 4.19 Phosphorylierung von GSK-3 $\beta$ bei Reoxygenierung

(A) Repräsentative Proteinbanden der gesamten GSK-3 $\beta$ -Proteinmenge und der an Ser9 phosphorylierten GSK-3 $\beta$  (p-GSK-3 $\beta$ <sub>Ser9</sub>) nach 90 min Hypoxie und zu unterschiedlichen Reoxygenierungszeiten. (B) Die Phosphorylierung von GSK-3 $\beta$  stieg in BK-WT Kardiomyozyten initial in den ersten 5 min der Reoxygenierung stark an und nahm dann im Laufe der Reoxygenierung wieder ab. In BK-KO Kardiomyozyten hingegen stieg die Phosphorylierung von GSK-3 $\beta$  im Laufe der Reoxygenierung kontinuierlich an. BK-WT (BK<sup>+/+</sup>); BK-KO (BK<sup>L1/L1</sup>) mit je n=3 unabhängige Experimente; Balken repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM; \*p<0,05; \*\*p<0,01. #p<0,05; ##p<0,01 zur Hypoxie des entsprechenden Genotyps.

### 4.8.3 Phosphorylierung von PKC $\epsilon$ und Aktivierung der Effektorcaspase-3

Neben der GSK-3 $\beta$  als wichtiger Trigger der mPTP-Öffnung wurde die Phosphorylierung und Aktivierung der PKC $\epsilon$  sowie die Aktivierung der Caspase-3 untersucht. Die PKC $\epsilon$  gilt als wichtige pro-survival-Kinase in Zusammenhang mit mitoK<sub>ATP</sub>- und mitoBK-Kanälen, die mutmaßlich sowohl über den PI3K/Akt-Signalweg als auch durch die cGKI direkt phosphoryliert werden kann und somit zur Kardioprotektion beiträgt. Es wird postuliert, dass cGKI die PKC $\epsilon$  in der inneren Mitochondrienmembran phosphoryliert und über den in der inneren Mitochondrienmembran sitzenden K<sub>ATP</sub>-Kanal zu einer Hemmung der mPTP-Öffnung führt<sup>115,218,219</sup> (siehe Abschnitt 1.6.5). Außerdem wird eine Beteiligung des mitoBKs an diesem Signalweg diskutiert. Es wird postuliert, dass es bei Hypoxie-Reoxygenierung über mitoBK zu einer erhöhten K<sup>+</sup>-Konzentration in der Matrix und zur

Depolarisation der Mitochondrien kommt. Dies wirkt dem Protonenstrom entgegen und könnte somit zu einer leichten Entkopplung der ETC und limitierter ROS-Produktion führen<sup>292,293</sup>. Dies scheint die PKC $\epsilon$ -Aktivierung zu begünstigen und somit die mPTP-Öffnung zu verhindern<sup>116</sup> (siehe Abschnitt 1.6.5 und 1.7.4). Daher wurde im Folgenden der Phosphorylierungsstatus und die Aktivierung der PKC $\epsilon$  bei Reoxygenierung nach 90 min Hypoxie untersucht. Abbildung 4.20A zeigt repräsentative Proteinbanden der gesamten PKC $\epsilon$ -Proteinmenge und der phosphorylierten PKC $\epsilon$  (p-PKC $\epsilon_{\text{Ser729}}$ ) von BK-WT und BK-defizienten Kardiomyozyten. Es konnte mittels der verwendeten Antikörper weder nach 90 min Hypoxie noch zu unterschiedlichen Reoxygenierungszeiten eine Phosphorylierung der PKC $\epsilon$  nachgewiesen werden. Die gesamte Proteinmenge der PKC $\epsilon$  war während der 90 min Reoxygenierung in BK-WT und in BK-KO Kardiomyozyten unverändert.



**Abbildung 4.20 Aktivierung von PKC $\epsilon$  und Caspase-3 bei Reoxygenierung**

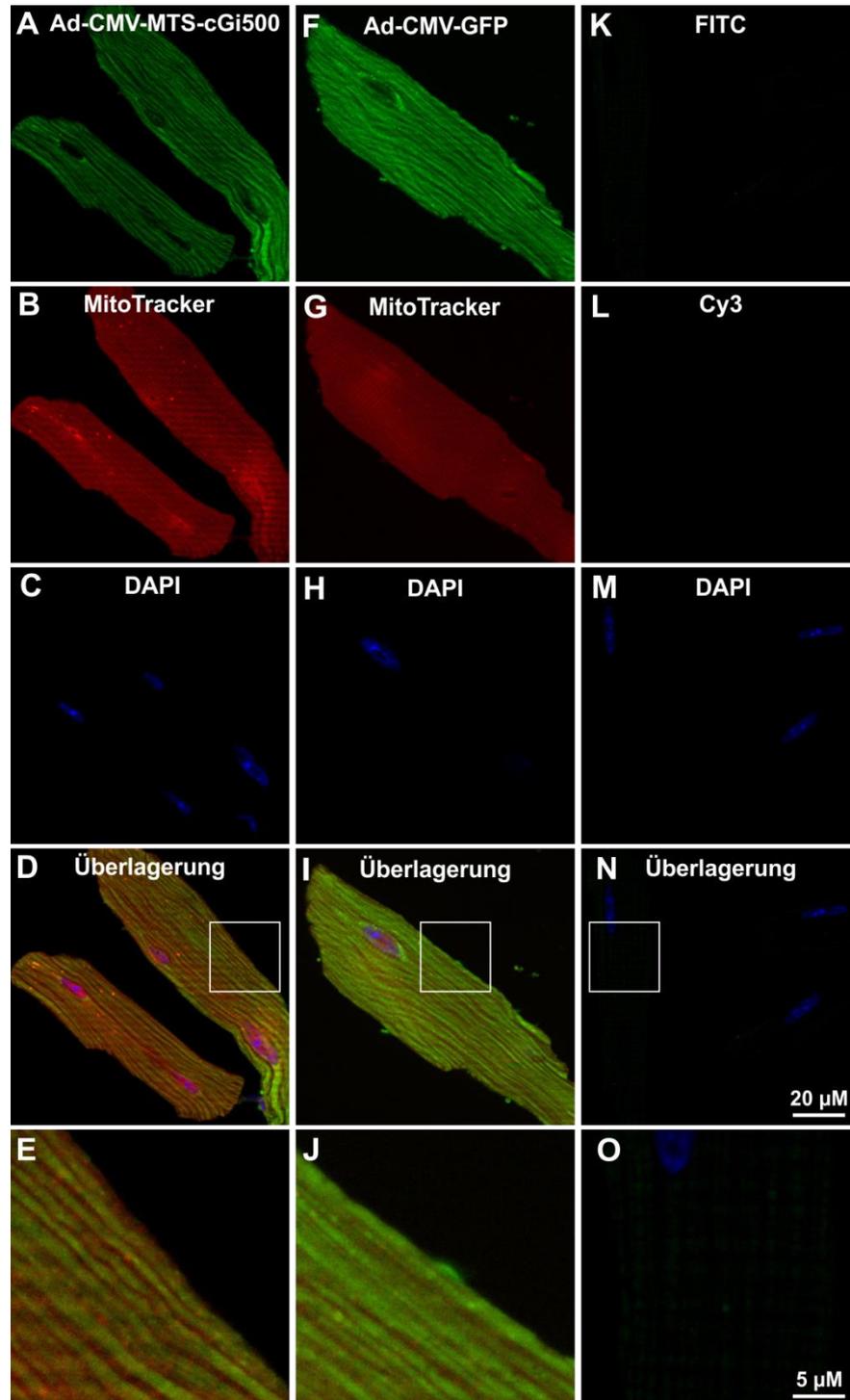
(A) Repräsentative Proteinbanden der gesamten PKC $\epsilon$ -Proteinmenge. Eine Phosphorylierung der PKC $\epsilon$  an Ser729 (p-PKC $\epsilon_{\text{Ser729}}$ ) während der Reoxygenierung war mit dem hier verwendeten Antikörper nicht möglich. GAPDH als Ladungskontrolle bestätigte eine gleichmäßige Beladung der Proben. (B) Repräsentative Proteinbanden der inaktiven Caspase-3 (Procaspase-3). Eine proteolytische Aktivierung der Caspase-3 während der Reoxygenierung war nicht nachweisbar. HSP60 als Ladungskontrolle bestätigte eine gleichmäßige Beladung der Proben. BK-WT (BK $^{+/+}$ ); BK-KO (BK $^{L1/L1}$ ) mit je n=3 unabhängige Experimente.

Die Caspase-3 gilt als wichtige Effektorcaspase des Apoptosesignalweges und als zentrale Komponente der Caspase-Kaskade, die sowohl durch den intrinsischen als auch den extrinsischen Signalweg aktiviert werden kann (siehe Abschnitt 1.4 und Abbildung 1.5). Durch proteolytische Spaltung der Procaspase-3 (35 kDa) entstehen ein größeres (17/19 kDa) und ein kleineres (12 kDa) Fragment, die sich zu einem aktiven Heterodimer zusammen lagern. Durch die Aktivierung der Caspase werden nachfolgende strukturelle Proteine degradiert sowie DNA fragmentiert, was zum Zelltod führt. Der verwendete Antikörper (siehe 2.3.8) detektiert die inaktive Caspase-3 (Procaspase-3; 35 kDa) und ein aktives Proteinfragment (17/19 kDa), das durch die proteolytische Spaltung der Procaspase-3 entsteht. Eine Aktivierung der Caspase-3 war weder nach 90 min Hypoxie noch zu unterschiedlichen Reoxygenierungszeiten nachweisbar (Abbildung 4.20B).

## 4.9 Adenovirale Transduktion adulter Kardiomyozyten

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Arbeit widmete sich der Etablierung und Charakterisierung der adenoviralen Transduktion isolierter adulter Kardiomyozyten, um die Verwendung von modifizierten Adenoviren als Vektoren für die Übertragung von Proteinen ins Mitochondrium zu untersuchen. Hierfür wurde von Prof. Ulrike Naumann (Zentrum für Neurologie; Hertie-Institut für klinische Hirnforschung Tübingen) ein mitochondrialer Adenovirus, der den cGi500-Sensor codiert (Ad-CMV-MTS-cGi500), hergestellt. Dieser mitochondriale Vektor ist an die Cytochrom-C-Oxidase, die ein Enzym der Atmungskette darstellt, getagged, was nach erfolgreicher Transduktion zur Expression des cGi500 Sensors in Mitochondrien führen sollte. Es ist daher möglich, bei erfolgreicher Transduktion mit dem MTS-cGi500 Sensor Änderungen der cGMP-Konzentration in Mitochondrien von einzelnen Kardiomyozyten zu messen. Zusätzlich stand ein Adenovirus, der ein ungetaggtetes GFP codiert (Ad-CMV-GFP) als Kontrollevektor für die Transduktion zur Verfügung.

Zur Untersuchung der erfolgreichen Transduktion des cGi500-Sensors ins Mitochondrium wurden die isolierten adulten Kardiomyozyten zum einen mit dem Ad-CMV-MTS-cGi500 und zum anderen mit dem Ad-CMV-GFP Kontrollevektor mit jeweils 30 MOI transfiziert (Durchführung siehe Abschnitt 3.8). Anschließend wurden die Mitochondrien zur Visualisierung mit MitoTracker angefärbt (Durchführung siehe Abschnitt 3.9). Als Negativkontrolle wurden nicht transfizierte und nicht mit MitoTracker gefärbte Kardiomyozyten verwendet. Parallel wurde eine Kernfärbung mit DAPI durchgeführt. Die Mitochondrien unterteilen sich in verschiedene Subpopulationen. Die sogenannten subsarkolemmalen Mitochondrien (SSM) sind direkt unter der Plasmamembran angeordnet, während die sogenannten interfibrillären Mitochondrien (IFM) in parallelen longitudinalen Reihen zwischen den Myofibrillen lokalisiert sind<sup>362</sup>. Diese Anordnung und die longitudinalen Reihen der Mitochondrien waren durch die MitoTracker Färbung (Abbildung 4.21B und G) deutlich zu erkennen. Die Negativkontrolle (Abbildung 4.21K) zeigte hingegen keine Fluoreszenz. Die mit Ad-CMV-MTS-cGi500 transfizierten Kardiomyozyten (Abbildung 4.21A) zeigten ein Längsverteilungsmuster des cGi500 an, das weitgehend mit der MitoTracker-Färbung übereinstimmte (Abbildung 4.21D). In den mit Ad-CMV-GFP transfizierten Kardiomyozyten (Abbildung 4.21F) zeigte sich eine sehr starke grüne Fluoreszenz des GFP-Sensors, die nicht nur mit der MitoTracker Färbung übereinstimmte und somit auf eine cytosolische Lokalisation hindeutet (Abbildung 4.21I). Mit der gleichen Wellenlänge und Intensität angeregte Negativkontrollzellen (Abbildung 4.21K) zeigten nur eine schwache grüne Autofluoreszenz.



**Abbildung 4.21 Lokalisation des mitochondrialen cGi500-Sensors in Kardiomyozyten**

Repräsentative Bilder der (A) Transduktion mit Ad-CMV-MTS-cGi500, (F) Transduktion mit Ad-CMV-GFP und (K) Negativkontrolle ohne Transduktion. (B und G) MitoTracker-Färbung. (L) Negativkontrolle ohne MitoTracker-Färbung. (C, H und M) Parallel durchgeführte Kernfärbung. (D, I und N) Überlagerung von A, B und C; G, I. (O) Vergrößerung des Ausschnittes in N. (A – E) Die Transduktion mit Ad-CMV-MTS-cGi500 zeigte ein Längsverteilungsmuster, das weitgehend mit der MitoTracker-Färbung übereinstimmte. (F – J) Die Transduktion mit Ad-CMV-GFP zeigte eine starke grüne Fluoreszenz, die auf eine cytosolische Expression von GFP hindeutet. (K – O) Die Negativkontrolle zeigte nur eine schwache grüne Autofluoreszenz.



## 5 Diskussion

Ischämische Herzkrankheiten stehen seit Jahren an erster Stelle der Liste aller Todesursachen weltweit<sup>1</sup>. Durch die Unterversorgung des Herzens mit Sauerstoff und Nährstoffen während eines akuten Myokardinfarkts kommt es, trotz schneller Revaskularisierung der verschlossenen Koronararterie z.B. durch Stentimplantation oder Lysetherapie, immer wieder zu irreversiblen Schädigungen des kardialen Gewebes. Diese Gewebeschädigung kann zu einer irreversiblen Beeinträchtigung der Herzfunktion bis hin zum Tod der Patienten führen. Nach dem heutigen Stand der Wissenschaft ist mittlerweile bekannt, dass nicht nur eine langanhaltende Hypoxie, sondern auch die Reoxygenierung maßgeblich am nekrotischen und apoptotischen Zelluntergang beteiligt ist<sup>325,363</sup>. Obwohl einige grundlegende Signalwege, die an den Mechanismen des akuten Myokardinfarkts beteiligt sind, bereits identifiziert wurden, gibt es noch keinen klinischen Therapieansatz zur Reduktion der irreversiblen Gewebeschädigung. Daher ist es von großem wissenschaftlichem und klinischem Interesse neue Behandlungsstrategien zu finden sowie die grundlegenden beteiligten Moleküle und Signalwege bei Hypoxie und Reoxygenierung zu erforschen.

### 5.1 Kardialer Phänotyp und Expression des mitoBK-Kanals

#### 5.1.1 Kardialer Phänotyp globaler und Kardiomyozyten-spezifischer BK-defizienter Mäuse

Die Charakterisierung der globalen BK-defizienten Tiere bestätigte einen erheblichen Einfluss des mitoBKs auf den Phänotyp der Mäuse. Der makroskopisch auffällige Phänotyp der Tiere konnte auch durch die einzelnen Parameter bestätigt werden (Abbildung 4.1A – E). Die BK-KO Tiere wiesen sowohl ein signifikant verringertes Herz- als auch Körpergewicht und eine signifikant kürzere Tibia auf, was sich auch im Verhältnis des Herzgewichts zur Tibialänge widerspiegelte. Diese Effekte waren sowohl bei den Männchen als auch bei den Weibchen zu beobachten und bestätigten bisherige Befunde, die zahlreiche Defizite der BK-KO Tiere wie ein verringertes Körpergewicht, einen Tremor und eine eingeschränkte motorische Koordination zeigten<sup>279,364</sup>.

Die Charakterisierung der Kardiomyozyten-spezifischen BK-defizienten Tiere zeigte eine selektive und effiziente Myh6-Cre-vermittelte Deletion des BK-Kanalgens in den Kardiomyozyten (Abbildung 4.3). Diese PCR-basierte Untersuchung zur Effizienz des verwendeten Cre/loxP-Systems wird durch die Verpaarung der Myh6-Cre-transgenen Mäuse mit Reportertieren (doppel-fluoreszente ROSA26-Reportermäuse) bestätigt<sup>355</sup>. Ein auffälliger Phänotyp der CMBK-KO und -CTR Tiere war makroskopisch nicht zu erkennen. Dennoch zeigten die CMBK-KO Tiere ein gering aber statistisch signifikant erhöhtes Herzgewicht und auch das HG/TL-Verhältnis war signifikant erhöht im Vergleich zu den CMBK-CTR Tieren (Abbildung 4.2A – D). Dieser signifikante Unterschied im HG/TL-Verhältnis zeigte sich nur bei der zusammengefassten Kohorte beider Geschlechter und bei den Männchen (siehe Anhang Tabelle 7.1). Interessanterweise war dieser Unterschied bei der ursprünglichen Charakterisierung der Tiere nicht zu beobachten<sup>355</sup>. Hier zeigten sich in beiden Genotypen weder zwischen den Männchen (CMBK-CTR n=7; CMBK-KO n=9) noch den Weibchen

(CMBK-CTR n=6; CMBK-KO n=6) signifikante Unterschiede im Herzgewicht und HG/TL-Verhältnis. Die Gründe für die im Rahmen dieser Arbeit vorhandenen jedoch zuvor nicht nachweisbaren Herzgewichtsunterschiede zwischen den Genotypen sind derzeit unklar. Das Alter der Mäuse in beiden Versuchsstudien ist vergleichbar. So wurden in der vorrausgegangenen Arbeit Mäuse im Alter von 11 bis 13 Wochen herangezogen und im Rahmen dieser Arbeit wurden Mäuse im Alter von durchschnittlich 12 Wochen untersucht. Es wurden in der aktuellen Versuchsstudie jedoch deutlich mehr Mäuse analysiert (n=23 je Genotyp) und es herrschte ein kleines Geschlechterungleichgewicht (siehe Anhang Tabelle 7.1). Da mit größerem Stichprobenumfang auch die Wahrscheinlichkeit steigt mit der sich ein signifikanter Effekt aufdecken lässt, könnte der signifikante Unterschied im Vergleich zur vorherigen Studie zustande gekommen sein.

### 5.1.2 BK-Kanal Expression in kardialen Mitochondrien

Die mitochondriale Expression von kardialen BK-Kanälen ist bisher noch immer umstritten vermutlich wegen des niedrigen Expressionsniveaus. Auch war lange Zeit nicht bekannt, in welchen myozytären Zellkompartimenten der zumeist membranständige BK-Kanal exprimiert wird. Neue Erkenntnisse deuten auf eine Lokalisation des kardiomyozytären BK-Kanals in der inneren Mitochondrienmembran hin. Zum einen wurden BK-ähnliche Ströme in Mitochondrien aus Meerschweinchenherzen beschrieben<sup>275</sup> und eine weitere unabhängige Untersuchung bestätigte kürzlich Paxilline- und NS11021-sensitive BK-Ströme in Mitoplasten aus murinen Kardiomyozyten<sup>271</sup>. Darüber hinaus haben Singh und Mitarbeiter vor kurzem gezeigt, dass kardiomyozytäre BK-Kanäle eine neuartige C-terminale Spleißvariante mit 50 Aminosäuren (mit dem Namen DEC) enthalten<sup>272</sup>. Diese Spleißvariante wird bevorzugt in Mitochondrien adulter Kardiomyozyten exprimiert. Außerdem wurden sowohl in isolierten Kardiomyozyten als auch in isolierten kardialen Mitochondrien spezifische Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt, die eine mitochondriale Lokalisation des BK-Kanals bestätigten (siehe auch Abschnitt 1.7.2). Im Rahmen der Arbeit von Singh und seinen Mitarbeitern konnte zudem der BK-Kanal mittels Western-Blot-Analyse in Mitochondrienlysaten des BK-WT nachgewiesen werden. Die Befunde der vorliegenden Arbeit bestätigen die mitochondriale Lokalisation des BK-Kanals (Abbildung 4.1F und Abbildung 4.2F und G). Das Molekulargewicht der immundetektierten Banden weist darauf hin, dass der mitoBK annähernd dieselbe molekulare Größe wie der plasmamembranäre BK-Kanal in anderen Zellstrukturen aufweist. Es zeigten sich in BK-WT VM zwei spezifische Banden bei ca. 130 kDa (siehe Abbildung 4.1F). Die Feststellung, dass die primäre Untereinheit des mitoBKs eine Größe von ca. 130 kDa hat, steht in Einklang mit der Studie von Singh und seinen Mitarbeitern<sup>272</sup>. Diese detektierten ebenfalls zwei spezifische Banden, eine bei ca. 140 kDa und eine kleinere bei ca. 100 kDa. In dieser Studie wurde das Protein in mitochondrialen Lysaten aus isolierten Kardiomyozyten nachgewiesen, während in der vorliegenden Arbeit mitochondriale Lysate aus Ventrikel untersucht wurden. Die kürzere Bande in beiden Studien entspricht wahrscheinlich einem proteolytischen Fragment. Diese Annahme wird durch die Tatsache gestützt, dass der BK-Kanal bekanntermaßen während der enzymatischen Isolation eine C-terminale Spaltung erfährt und Fragmente ähnlicher Größe erzeugt<sup>365</sup>. In beiden Studien (Singh und der vorliegenden Arbeit) wurden die mitochondrialen Lysate mit demselben polyklonalen Antikörper (von Alomone Labs, siehe 2.3.8),

der gegen eine bestimmte C-terminale Sequenz der plasmamembranären  $\alpha$ -Untereinheit des BK-Kanals gerichtet ist, untersucht.

In den hier verwendeten Kardiomyozyten-spezifischen BK-Mutanten konnte der Kanal ebenfalls mittels Western-Blot-Analyse in mitochondrialen Lysaten aus isolierten Kardiomyozyten nachgewiesen werden (Abbildung 4.2F und G). Es zeigte sich sowohl mit einem polyklonalen (Eigenherstellung, siehe 2.3.8) als auch mit einem monoklonalen Antikörper (NeuroMab clone L6/60, siehe 2.3.8) eine Proteinbande bei ca. 150 kDa im Mitochondrienlysat der CMBK-CTR, während die entsprechenden CMBK-KO Proben BK-negativ blieben. Die unterschiedliche Größe der Bande zu den vorherigen Studien kommt eventuell durch die unterschiedlich verwendeten Antikörper oder leicht veränderten Laufgeschwindigkeiten der Proteine zustande. Auch die gesamte Proteinmenge des BK-Kanals könnte in den VM- und CMM-Proben variieren. Zudem könnten kleine Unterschiede der enzymatischen Isolation (vgl. Abschnitt 3.5.1 und 3.5.2) posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierung, Phosphorylierung oder proteolytische Spaltungen des Kanals beeinflussen, was eine leicht veränderte Laufgeschwindigkeit und somit das unterschiedliche Molekulargewicht erklären würde. In Einklang mit vorrausgegangenen Studien<sup>271,272,275</sup> und gestützt durch die wiederholte Bestätigung der Reinheit der isolierten Mitochondrien (Anhang Abbildung 7.1) konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eindeutig die mitochondriale Lokalisation des BK-Kanals bestätigt werden.

## 5.2 Die cGKI ist an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert

Es wurde bereits gezeigt, dass der BK-Kanal in anderen Zelltypen (z.B. Glattmuskelzellen und Nierenzellen) direkt durch die cGKI phosphoryliert werden kann<sup>192</sup> und es ist hinreichend bekannt, dass cGMP/cGKI die BK-Kanal-Aktivität in verschiedenen Zelltypen direkt moduliert<sup>366,367</sup>. Darüber hinaus wird postuliert, dass der kardioprotektive Stimulus des mitoK<sub>ATP</sub>- und/oder mitoBK-Kanals über den cGMP/cGKI-Signalweg vermittelt wird (siehe auch Abschnitt 1.6.4 und 1.7.3). Der genaue Mechanismus, wie das protektive Signal der cytosolischen cGKI über die OMM zu den mitochondrialen K<sup>+</sup>-Kanälen, in der IMM transferiert wird, ist noch unklar. Dass diese Signaltransduktion stattfindet konnte bereits für den mitoK<sub>ATP</sub>-Kanal gezeigt werden<sup>218</sup>. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal eine Assoziation zwischen der cGKI und kardialen Mitochondrien gezeigt (Abbildung 4.4 und Anhang Abbildung 7.2). Durch Western-Blot-Analysen von mitochondrialen Proteinlysaten kann eine Assoziation zwischen der cGKI und Mitochondrien postuliert werden. In den untersuchten VM-, CMM- und HL-Proben konnte wiederholt eine eindeutige Proteinbande bei ca. 75 kDa mit verschiedenen spezifischen cGKI-Antikörpern detektiert werden (Abbildung 4.4A und B, Abbildung 7.2A – D). Die starke Proteinbande der cGKI in den CMM-Proben im Vergleich zu der schwächeren Bande in den VM-Proben deutet auf eine direkte Assoziation zwischen der cGKI und den Mitochondrien in Kardiomyozyten hin. Außerdem konnte mit Hilfe des Proteinase K *Protection Assays* die Lokalisation der cGKI in den Mitochondrien weiter eingegrenzt werden (Abbildung 4.4C) und es kann somit eine cGKI-Lokalisation an der OMM postuliert werden. Nach Verdau mit Proteinase K war nur noch eine sehr schwache cGKI-Bande detektierbar und auch das in der OMM lokalisierte TOM20 war in den Proteinase K behandelten Proben kaum nachweisbar, was auf einen unvollständigen Verdau mit Proteinase K hindeutet. Um die Lokalisation der cGKI an der OMM endgültig zu bestätigen sollten daher weitere Versuche mit unterschiedlichen

Konzentrationen und Inkubationszeiten der Proteinase K in Betracht gezogen werden. Darüber hinaus ist noch nicht geklärt, wie das protektive Signal der cGKI letztendlich an  $K^+$ -Kanäle in der IMM weitergeleitet wird. Die Befunde der vorliegenden Arbeit lassen darauf schließen, dass die cGKI ein bisher unbekanntes zwischengeschaltetes Protein phosphoryliert, das das kardioprotektive Signal an mitochondriale  $K^+$ -Kanäle an der IMM weiterleitet. Jedoch wurden die Versuche nur unter Basalbedingungen durchgeführt. Daher sollte darüber hinaus die Lokalisation und Dynamik der cGKI bei Hypoxie und Reoxygenierung sowie Erhöhung der cGMP-Konzentration untersucht werden. Auch die Orientierung des mitoBKs in der IMM ist bisher noch nicht geklärt. Auf Grund neuester Patch-Clamp-Analysen mit den BK-Kanalblockern Iberiotoxin und Charybotoxin wird eine Ausrichtung des Kanals mit dem C-Terminus in Richtung der Mitochondrienmatrix postuliert<sup>368</sup>. Eine weitere unabhängige Studie konnte darüber hinaus in IMM-Patch-Clamp-Analysen von BK-WT Mitoplasten NS11021- und Paxillin-sensitive BK-Ströme zeigen, die durch die Zugabe von 8-Br-cGMP und cGKI moduliert werden konnten<sup>355</sup>. Die Autoren schlossen daher auf eine cGMP/cGKI-vermittelte Phosphorylierung und somit Aktivierung des mitoBKs. Es konnte somit in dieser Studie unter Basalbedingungen ein Zusammenhang zwischen cGMP/cGKI und der BK-Kanalfunktion gezeigt werden. Zum genauen Verständnis des Signalweges ist es jedoch unerlässlich die Frage zu klären wie und ob die cGKI bei Hypoxie-Reoxygenierung ins Mitochondrium transferiert wird und somit die Öffnungswahrscheinlichkeit des mitoBKs erhöht. Co-Immunpräzipitationen mittels spezifischer cGKI-Antikörper und eine unterstützende Proteomanalyse könnten hier erste Anhaltspunkte von mitochondrialen Proteinpartnern sowie einer möglichen Interaktion der mitochondrial assoziierten cGKI liefern.

### 5.3 Assoziation zwischen mitoBK und der Elektronentransportkette

Der mitoBK muss zuerst in die Mitochondrien transportiert werden, um seine Funktion ausüben zu können und wahrscheinlich mit Partnerproteinen assoziieren, wie es in anderen Regionen der Zelle der Fall ist<sup>276</sup>. In der Cochlea- und in Hirnpräparaten wurden bereits erfolgreich BK-Kanalpartner identifiziert<sup>369,370</sup>. Dass der mitoBK aus kardialen Mitochondrien vergleichbare physiologische und pharmakologische Eigenschaften wie der plasmamembranständige BK-Kanal hat, implizieren diese (siehe Abschnitt 5.1.2) und zahlreiche weitere Arbeiten<sup>272,275</sup>. Neueste Proteinpartner des mitoBKs konnten mittels Proteomansatz, der durch Co-Immunpräzipitation mit BK-Antikörpern und *Pull-Down* mit rekombinanter DEC-Sequenz unterstützt wurde, identifiziert werden<sup>277</sup>. Hierzu zählen TOM22, ein OMM-Protein das für den mitochondrialen Import mitverantwortlich ist und die Adeninnukleotid-Translokase (ANT), die mit der oxidativen Phosphorylierung und der Regulation der mPTP assoziiert ist (siehe auch Abschnitt 1.3.3) sowie weitere Proteine der mitochondrialen Elektronentransportkette. Darüber hinaus wurde mit einem Zwei-Hybrid-Systemansatz eine direkte Verbindung zwischen der regulatorischen  $\beta_1$ -Untereinheit von BK-Kanälen mit der mitochondrialen Cytochrom-C-Oxidase-Untereinheit I gezeigt<sup>278</sup>. Da der mitochondriale Sauerstoffverbrauch unter anderem von den Expressionlevel der Proteine der Atmungskette in der IMM abhängt und in vorherigen Studien impliziert wurde, dass eine Reduktion der OXPHOS im BK-KO mit einer reduzierten COX-Aktivität zusammenhängt<sup>271</sup>, wurde die Expression ausgewählter Proteine der Atmungskette mittels Western-Blot-Analyse untersucht (Abbildung 4.5 und Abbildung 4.6). Der mitochondriale Proteingehalt zeigte

in keinem der untersuchten Komplexe (Abbildung 4.5 NDUF51-Untereinheit von Komplex I; Abbildung 4.6 COX IV und CytC) Unterschiede zwischen den Genotypen auf. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass eventuelle Unterschiede in der mitochondrialen Respiration zwischen den Genotypen nicht durch eine unterschiedliche Expression der untersuchten Komplexe und des Cytochrom C zustande kommen. Allerdings wurden im Rahmen dieser Arbeit nur drei Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe untersucht. Da von etwa 100 Proteinuntereinheiten ausgegangen werden muss, wäre eine mitochondriale Proteomanalyse eine sinnvolle Ergänzung, da diese eine vollständige Analyse der Atmungskettenkomplexe ermöglicht. Es ließe sich so überprüfen inwiefern Unterschiede in der mitochondrialen Respiration von (Kardiomyozyten-spezifischen) BK-defizienten Tieren und ihren Wurfgeschwisterkontrolltieren auf eine unterschiedliche Expression der Atmungskettenkomplexe zurückzuführen sind.

### **5.3.1 Die basale Respiration der Mitochondrien wird durch die Deletion des BK-Kanals nicht beeinflusst**

Um eine Assoziation zwischen mitoBK und der ETC zu untersuchen wurden respiratorische Sauerstoffmessungen mittels Clark-polarographischem Sensor durchgeführt (siehe Abschnitt 3.6). Um die Atmungsaktivität der Mitochondrien zu stimulieren wurden unterschiedliche Substrate verwendet. Dabei wurden die Mitochondrien zum einen gleichzeitig mit Glutamat und Malat und zum anderen mit Succinat stimuliert und schließlich durch Zugabe von ADP zu maximaler Atmung angeregt (siehe Abschnitt 4.4). Eine Hemmung des Komplex I mit Rotenon, während einer Stimulation mit Succinat, fand nicht statt. Glutamat und Malat müssen dabei zuerst in der Matrix der Mitochondrien durch den TCA metabolisiert werden. Erst dann können die Elektronen mittels NADH auf Komplex I übertragen werden (siehe Abbildung 1.1B). Succinat hingegen kann direkt, durch Oxidation zu Fumarat, Elektronen auf Komplex II übertragen. Komplex II ist darüber hinaus ein Teil des TCA, und somit werden bei einer Stimulation mit Succinat, ohne Hemmung des Komplex I, auch dieser zu einem geringen Teil zur Elektronenübertragung angeregt. Im Rahmen der respiratorischen Messungen dieser Arbeit fand somit keine isolierte Betrachtung der nur durch Komplex II stimulierten Atmung statt. Die Konzentration der einzelnen Substrate sowie das Messprotokoll orientierten sich am Protokoll von Frezza et al.<sup>338</sup>. Der polarographische Sensor, d.h. die Clark-Sauerstoffelektrode, wurde zu Beginn der Arbeit ausreichend validiert. Es konnte nach erfolgtem Bespannen und Kalibrieren der Elektrode eine stabile Sauerstoffgrundlinie gezeigt werden, die sich über die Zeit nicht änderte (*Daten nicht gezeigt*). Zudem konnte durch Zugabe der verwendeten Substrate und ADP ein deutlicher Anstieg der Atmungsaktivität verzeichnet werden, was auf ein validiertes System und intakte isolierte Mitochondrien hindeutet. Da die Clark-Sauerstoffelektrode ein sehr sensitives System darstellt und auf keinen Fall längere Zeit unbenutzt bespannt sein sollte, wurde sie zu Beginn jedes Messtags neu bespannt und kalibriert (siehe Abschnitt 3.6). Außerdem wurden Messungen, die ungewöhnliche Sauerstoffausschläge zeigten, von der Auswertung ausgenommen. Daher kann von reproduzierbaren Ergebnissen ausgegangen werden.

Die basalen respiratorischen VM-Messungen zeigten in der Auswertung der Atmungsaktivität keine signifikanten Unterschiede zwischen BK-WT und BK-KO (Abbildung 4.7A und B). In den BK-WT VM war zumindest ein tendenziell erhöhter Sauerstoffverbrauch in der ADP-stimulierten State-3 Atmung und ein tendenziell niedrigerer Sauerstoffverbrauch in der State-4 Atmung zu beobachten, wodurch sich signifikante Unterschiede im RCR zwischen BK-WT und BK-KO ergaben (Abbildung 4.7C). Diese basalen Atmungsmessungen sowie die signifikante Reduktion des RCR erlaubt die Schlussfolgerung, dass der BK-Kanal möglicherweise mit der ETC assoziiert ist. Dabei deuten die Änderungen in der ADP-stimulierten Atmung auf eine gesteigerte Effizienz der mitochondrialen Respiration hin. Die Ergebnisse stehen in Einklang mit vorausgegangen Studien. So zeigte die Gruppe um Soltysinska an permeabilisierten ventrikulären Muskelfasern, dass eine BK-Deletion die OXPHOS signifikant abschwächt<sup>271</sup>. Die OXPHOS wurde in dieser Studie, bei einer Stimulation des Komplex I mit Glutamat und Malat, als State-3 Atmung der Mitochondrien definiert. Die im Rahmen dieser Arbeit vorliegenden Befunde der VM-Messungen zeigten ebenfalls eine tendenziell reduzierte OXPHOS im State-3 in den BK-KO mit Glutamat und Malat (Abbildung 4.7B). Die basalen respiratorischen CMM-Messungen (Abbildung 4.8) konnten diese Beobachtungen jedoch nicht bestätigen. Die CMM-Messungen mit Glutamat und Malat sowie die CMM-Messungen mit Succinat zeigten keinen Unterschied im Sauerstoffverbrauch zwischen BK-WT und BK-KO (Abbildung 4.8A – C). Die neueren CMM-Messungen (nach Isolation der Kardiomyozyten mit Liberase DH) zeigten ebenfalls keine Unterschiede (Abbildung 4.8D – F) und bestätigten die vorausgegangen CMM-Messungen, bei denen die Isolation der Kardiomyozyten mit Collagenase II erfolgte. Offensichtlich ist der mitoBK in CMM unter diesen basalen Bedingungen in einem inaktiven Zustand und hat somit keinen Einfluss auf die ETC. Unter Berücksichtigung dieser Befunde wäre der in den VM-Messungen beobachtete Effekt nicht auf mitoBK-Kanäle der Kardiomyozyten zurückzuführen. In der Tat lässt sich nicht ausschließen, dass zu diesen respiratorischen Messungen neben kardiomyozytären Mitochondrien auch Mitochondrien aus anderen kardialen ventrikulären Strukturen wie Fibroblasten und Endothelzellen beigetragen haben. Die respiratorischen Mitochondrienmessungen, wie sie im Falle der vorherigen Studie von Soltysinska und Mitarbeitern<sup>271</sup> an permeabilisierten Fasern durchgeführt wurden, stellen *in situ* Repirationsmessungen dar und erlauben Interaktionen der Mitochondrien mit anderen Zellorganellen wie beispielsweise Komponenten des Cytoskeletts. Im Gegensatz hierzu wurden die respiratorischen Messungen im Rahmen dieser Arbeit mit isolierten Mitochondrien durchgeführt, was möglicherweise eine funktional bedeutende Interaktion der mitochondrialen BK-Kanäle sowie der ETC mit weiteren zellulären oder kardialen Komponenten ausschließt (siehe auch Abschnitt 5.5).

### **5.3.2 Die pharmakologische Stimulation des BK-Kanals hat keinen erheblichen Einfluss auf die mitochondriale Respiration**

Die respiratorischen CMM-Messungen gaben keinen Hinweis auf einen Einfluss des mitoBKs auf die Funktion der ETC (siehe Abschnitt 5.3.1). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass sich der Kanal unter den basalen *in vitro* Bedingungen in einem inaktiven Zustand befindet. Daher wurden die respiratorischen Messungen in Gegenwart pharmakologischer Substanzen durchgeführt, die letztendlich zu einer Stimulation des BK-Kanals führen sollten. Durch Zugabe des membrangängigen

cGMP-Analogs 8-Br-cGMP sollte die mit den Mitochondrien assoziiert cGKI an der OMM stimuliert werden. Wie bereits ausgeführt ist der BK-Kanal ein direktes Phosphorylierungstarget des cGMP/cGKI-Signalwegs<sup>192,366,367</sup> (siehe auch Abschnitt 1.7.4). Zudem postulieren verschiedene Studien, dass cGMP-abhängige Mechanismen wichtige Komponenten des Zellüberlebens bei Hypoxie-Reoxygenierung sind. Über eine cGMP/cGKI-vermittelte Aktivierung des BK-Kanals wird durch den nachfolgenden K<sup>+</sup>-Einstrom eine Entkopplung der ETC und ROS-Bildung postuliert<sup>292</sup>. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit, unter basalen Respirationsbedingungen und einer Stimulation mit 8-Br-cGMP, jedoch keine Änderung der OXPHOS und damit kein Einfluss des mitoBKs auf die ETC in BK-WT CMM beobachtet werden (Abbildung 4.9). Dies lässt die Vermutung zu, dass cGMP den mitoBK unter den hier getesteten basalen Bedingungen nicht aktiviert. Zumindest im zellfreien System kommt es nicht zur Interaktion des cGMP/cGKI-Signalweges und dem mitoBK. Da das Ausmaß der Phosphorylierungsaktivität der cGKI auch von Cofaktoren wie ATP anhängt<sup>218</sup>, ist jedoch unklar ob es in den hier analysierten Mitochondrien nach Zugabe von 8-Br-cGMP (ohne Zugabe von Mg<sup>2+</sup>-ATP) tatsächlich zur Stimulation der cGKI gekommen ist. Da mittels 8-Br-cGMP kein mitoBK-abhängiger Einfluss auf die mitochondriale Respiration ersichtlich war, wurde die Öffnungswahrscheinlichkeit des BK-Kanals durch direkte Zugabe des BK-Kanalöffners NS11021 erhöht. Die Ergebnisse dieser Experimente sind weniger eindeutig. Eine Stimulation isolierter Mitochondrien mit unterschiedlichen NS-Derivaten zeigt in der Literatur ebenfalls keine eindeutigen Befunde. So konnte in verschiedenen Studien isolierter Mitochondrien bei einer BK-Kanal-Öffnung mit NS1619 ein geänderter substratabhängiger Sauerstoffverbrauch und inhibitorische Effekte auf die Respiration beobachtet werden<sup>295,316,371,372</sup>. Die Gruppe von Heinen zeigte zuletzt, dass die Glutamat/Malat bzw. Succinat ± Rotenon-stimulierte State-2 und ADP-stimulierte State-4 Atmung durch Stimulation mit NS1619 erhöht war. Während die ADP-stimulierte State-3 Atmung unter NS1619 bei einer Stimulation des Komplex I unbeeinflusst blieb, war interessanterweise die ADP-stimulierte State-3 Atmung unter NS1619 bei einer Stimulation des Komplex II ± Rotenon niedriger<sup>293,295</sup>. Die gleichzeitige Hemmung des BK-Kanals mit Paxillin hob die atmungshemmende Wirkung von NS1619 jedoch nicht bzw. nicht komplett auf, was auf mitoBK-unabhängige Effekte schließen lässt. Auch Chancerini hatte einen inhibitorischen Effekt von NS1619 auf die mitochondriale Respiration berichtet<sup>316</sup>. In der entsprechenden Studie war durch Stimulation mit NS1619 der Sauerstoffverbrauch in der State-4 Atmung erhöht und in der State-3 Atmung gehemmt, woraus letztlich eine Reduktion des RCR resultierte. Diese Effekte wurden auch zuvor von Debska und Mitarbeitern in Mitochondrien aus Gliomazellen beobachtet<sup>372</sup>. Die Selektivität und die Effekte des NS1619 bleiben daher umstritten. Inzwischen wird häufig das selektivere potentere NS11021 verwendet, das konzentrationsabhängige Effekte zeigt. Entsprechend konnte in nanomolaren Konzentrationen Paxillin-sensitive Effekte von NS11021 gezeigt werden. NS11021 führte dabei durch verringerten Sauerstoffverbrauch in der State-4 Atmung zu einer Verbesserung des RCR. Im mikromolaren Bereich (1 µM) war hingegen eine Depolarisation der Mitochondrienmembran sowie ein erhöhter Sauerstoffverbrauch im State-4 und eine Reduktion des RCR zu beobachten<sup>289</sup>. Die mikromolaren Effekte von NS11021 waren weder Kalium-abhängig noch Paxillin-sensitiv. Die Autoren schlossen daher auf mitoBK-unabhängige Mechanismen sowie unspezifische Effekte des NS11021 die letztlich zur Bildung eines unspezifischen Protonenlecks führten. Diese konzentrationsabhängigen Effekte von NS11021 auf die Atmung isolierter Mitochondrien konnten auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden. So war in Gegenwart von 3 µM NS11021 (Abbildung 7.4) keine Steigerung des Sauerstoffverbrauchs durch

Substrat- und ADP-Zugabe mehr möglich. Es liegt daher nahe, dass NS11021 in diesem mikromolaren Konzentrationsbereich toxisch oder unselektiv wirkt. Durch unselektive Stimulation und Öffnung von mitochondrialen Ionenkanälen (wie Beispielsweise  $K_v1.3$  oder  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}^{13}$ ) oder Carrierproteinen könnte es zu einem unspezifischen Protonenleck kommen, was zu einer enormen ROS-Bildung und Schädigung der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe führt<sup>373</sup>. Dadurch wäre eine Steigerung des Sauerstoffverbrauchs durch Stimulation mit Substraten und ADP nicht mehr möglich. In einer nanomolaren Konzentration (Abbildung 4.10 300 nM und Abbildung 7.6 150 nM) konnten mit NS11021 hingegen Effekte auf die Atmungsaktivität beobachtet werden. Dies hatte zuletzt in BK-WT CMM einen erhöhten RCR unter NS11021-Stimulation zur Folge (Abbildung 4.10F), was auf eine Erhöhung der OXPHOS durch Öffnung des  $\text{mitoBKs}$  hindeutet. Jedoch zeigten sich in BK-KO CMM unter NS11021-Stimulation kontroverse paradoxe Effekte (vgl. Abbildung 4.10A – C und Abbildung 4.10D – F). Daher kann nicht sicher davon ausgegangen werden, dass der beobachtete Effekt in den isolierten Mitochondrien aus BK-WT Kardiomyozyten durch den  $\text{mitoBK}$  vermittelt wird. Eventuell ist die eingesetzte Konzentration von NS11021 noch immer zu hoch und sollte für eindeutige  $\text{mitoBK}$ -vermittelte Effekte noch niedriger dosiert werden. Offenbar hat NS11021 eine sehr enge nicht-toxische Wirkkonzentration. Eventuell hat der BK-Kanalöffner in einer zu hohen Konzentration biphasische divergente Wirkungen (siehe auch Abschnitt 5.5). Um die Spezifität des NS11021 weiter zu überprüfen, sollte daher auch im Rahmen der durchgeführten Versuche die Paxillin-Sensitivität getestet werden.

### **5.3.3 Paradoxe Beobachtung bei der respiratorischen Messungen von CMBK-defizienten kardiomyozytären Mitochondrien**

Bei den respiratorischen Messungen der isolierten CMM aus den CMBK-Mutanten wurden keine Unterschiede zu den CMM-Messungen aus globalen BK-Mutanten erwartet. Jedoch zeigten die CMM-Messungen der CMBK-KO einen ungewöhnlich hohen und sogar signifikant höheren Sauerstoffverbrauch in der ADP-stimulierten State-3 und State-4 Atmung im Vergleich zu CMBK-CTR CMM. Dieser gesteigerte Sauerstoffverbrauch war sowohl unter unstimulierten Basalmessungen (Abbildung 7.3) als auch in Gegenwart von NS11021 (300 nM; Abbildung 7.5) zu beobachten. Insgesamt waren diese Befunde unerwartet und teilweise im klaren Widerspruch zu den respiratorischen CMM-Messungen des globalen BK-KO. Letztlich lässt sich die Ursache für die im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Atmungsunterschiede zwischen den CMBK-CTR und CMBK-KO *versus* BK-WT und BK-KO Mitochondrien nicht abschließend aufklären. Um interexperimentelle Streuungen auszuschließen sollten zukünftig Schlüsselexperimente zur Respiration der Mitochondrien im direkten Vergleich der vier Genotypen durchgeführt werden. Mit diesem Ansatz würden sich die störanfälligen Atmungsmessungen letztlich besser kontrollieren lassen. Beispielsweise fallen Änderungen in den Pufferzusammensetzungen und Schwankungen in der Umgebungstemperatur bei gleichzeitiger Analyse geringer aus.

## 5.4 Einfluss des BK-Kanals auf das Überleben isolierter Kardiomyozyten bei Hypoxie-Reoxygenierung

### 5.4.1 Der Zelltod *in vitro* wird durch nekrotische Vorgänge bestimmt

ATP-Mangel, oxidativer Stress, Hypoxie und Reoxygenierung führen zu intrazellulärer Schädigung. Es kommt zum einen durch den Kollaps der zellulären Homöostase, dem ATP-Verlust sowie der Aktivierung von Proteasen und der durch den erhöhten Ionengehalt osmotischen Schwellung der Zelle zu Nekrose. Zum anderen werden durch die Freisetzung von Cytochrom C, als Folge des Zusammenbruchs des Membranpotentials der Mitochondrien, ROS-Bildung und durch die Öffnung der mPTP apoptotische Signalwege ausgelöst (siehe Abschnitt 1.4). In welchem Ausmaß bei Hypoxie und Reoxygenierung Nekrose und Apoptose zum Zelluntergang beitragen ist bisher unklar. Mitochondrialen BK-Kanäle wird eine zellprotektive Wirkung zugeschrieben. Sie sollen das Herz vor einem hypoxieinduziertem Schaden schützen<sup>271,272,275</sup>. Einer der vorgeschlagenen Mechanismen, durch den die mitoBK-Aktivierung das Überleben nach einer Ischämie begünstigt, ist eine verbesserte mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Toleranz und Regulation der mPTP-Öffnung<sup>272,290,292</sup>. Die Arbeitsgruppe um Detlef Siemen hat in Patch-Clamp-Analysen gezeigt, dass das Bcl-X<sub>L</sub>-Protein direkt mit der mPTP interagiert und diese hemmt<sup>374</sup>. Das proapoptische Bax-Protein hingegen transloziert ins Mitochondrium und induziert über eine Inhibition des mitoBKs die Öffnung der mPTP<sup>374,375</sup>. Darüber hinaus konnte in anderen Zelltypen wie beispielsweise den Haarsinneszellen der Cochlea oder humanen Glioblastomzellen bereits ein Zusammenhang zwischen dem BK-Kanal und apoptotischen Vorgängen gezeigt werden<sup>376,377</sup>. Auch *in vivo* konnte ein Zusammenhang zwischen der Deletion des mitoBKs und einer erhöhten Apoptoserate nach 30 min Ischämie und 120 min post-ischämischer Reperfusion (I/R) in CMBK-Mutanten gezeigt werden<sup>355</sup>. Hier wurde über DNA-Fragmentierung die Apoptoserate in Herzmuskelschnitten nach I/R bestimmt. In der vorliegenden Arbeit konnten *in vitro* Untersuchungen von BK-KO Kardiomyozyten diese erhöhte Apoptoserate nach 90 min Hypoxie und anschließender Reoxygenierung von 120 min nicht bestätigt werden. Das Ausmaß der Apoptose wurde über die Aktivität der zentralen Caspase-3 ermittelt (siehe 3.4.1). Die Messdaten der vorliegenden Arbeit zeigten eindeutig, dass *in vitro* bei HR isolierter Kardiomyozyten ausschließlich Nekrose stattfindet. Ein Anstieg der Caspase-3-Aktivität nach HR im Vergleich zu NR konnte in keinem der beiden Genotypen gezeigt werden (Abbildung 4.13B). Darüber hinaus konnte auch mittels Western-Blot-Analyse keine Aktivierung der Caspase-3 (Abbildung 4.20) während der 120-minütigen Reoxygenierung nach 90 min Hypoxie gezeigt werden. Das Ausmaß der nekrotischen Zellzerstörung wurde über die Aktivität der freigesetzten LDH im Zellmedium (siehe 3.4.2) erfasst. Im LDH-Assay war ein deutlicher Anstieg des nekrotischen Zelltods nach Hypoxie bzw. HR im Vergleich zur Normoxie bzw. NR erkennbar (Abbildung 4.12B und Abbildung 4.13A). Tendenziell zeichnete sich dabei in BK-KO Kardiomyozyten ein erhöhter nekrotischer Zelltod nach Hypoxie bzw. HR im Vergleich zu BK-WT Kardiomyozyten ab. Dieser Unterschied bestätigte die lichtmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 4.12A) erreichte jedoch nicht das statistische Signifikanzniveau. Um die Zelltodmechanismen genauer zu spezifizieren, ist es daher erstrebenswert weitere Untersuchungen zu apoptotischen und nekrotischen Signalwegen zu tätigen. Die Apoptose wird über komplexe Signalkaskaden reguliert und es gibt viele Möglichkeiten die Aktivität der beteiligten Proteine und das Ausmaß der Apoptose zu bestimmen. Nicht zuletzt unterschied sich die Detektion apoptotischer

Zellen *in vivo*<sup>355</sup> und die der vorliegenden *in vitro* Untersuchung. Während die DNA-Fragmentierung zu einer späteren Phase der Apoptose auftritt<sup>378</sup>, wird die Caspase-3 eher zu Beginn der Apoptose aktiviert<sup>336</sup>. Auch die Kinetik des Zelltods ist in jedem Modellsystem unterschiedlich. Einige Proteine, darunter auch Caspasen, werden nur vorübergehend aktiviert<sup>379-381</sup>. Kultivierte Zellen, die *in vitro* apoptotischen Vorgängen unterliegen werden schließlich nekrotischen Vorgängen unterzogen, was das Ergebnis des apoptotischen Zelltods verfälschen kann<sup>382,383</sup>. In diesem Zusammenhang scheinen auch Zeitverläufe des durch Hypoxie- und Reoxygenierung-induzierten apoptotischen und nekrotischen Zelltods sinnvoll. Alternative Methoden zur sensitiven Darstellung der Apoptose nutzt die Durchflusszytometrie. Hier kann die DNA-Fragmentierung mittels TUNEL-Methode oder per Detektion von Annexin-V zusammen mit einer Propidiumjodid-Färbung erfolgen, um Auswirkungen der *in vitro* Hypoxie-Reoxygenierung möglicherweise besser darzustellen.

### 5.4.2 Eine pharmakologische Aktivierung des BK-Kanals bei *in vitro* Hypoxie-Reoxygenierung hat keinen Vorteil für das Überleben isolierter Kardiomyozyten

In der Vergangenheit wurde primär der mitoK<sub>ATP</sub> für die protektiven Eigenschaften bei Hypoxie-Reoxygenierung und den K<sup>+</sup>-Einstrom in die Mitochondrien verantwortlich gemacht<sup>116,384-386</sup>. Allerdings ist der K<sub>ATP</sub>-Kanal auch im Sarkolemm der Kardiomyozyten lokalisiert<sup>387</sup> und daher wird die spezifische Modulation des mitoK<sub>ATP</sub> Kanals sowie dessen protektive Rolle bei I/R immer wieder kontrovers diskutiert<sup>388,389</sup>. Die Beteiligung des mitoBKs konnte kürzlich *in vivo* in einem akuten Myokardinfarktmodell bestätigt werden<sup>355</sup>. Bereits nach 30 min Ischämie, gefolgt von 120 min Reperfusion konnte sowohl in globalen BK-defizienten als auch in CMBK-defizienten Mäusen im Vergleich zu den entsprechenden Wurfgeschwisterkontrolltieren eine signifikant erhöhte Infarktgröße gezeigt werden. In Langendorff-perfundierten Herzen war hingegen erst nach pharmakologischer Aktivierung des BK-Kanals mittels NS1619 oder nach ischämischer Präkonditionierung eine BK-Kanal-vermittelte Kardioprotektion zu beobachten<sup>271,272</sup>. So wirkten NS1619 und NS11021, die die Öffnungswahrscheinlichkeit des BK-Kanal erhöhen, sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* im Langendorff-perfundierten Herzen kardioprotektiv<sup>275,318</sup> und auch im *in situ* Myokardinfarktmodell konnte mit NS11021 eine Kardioprotektion in CMBK-Mutanten gezeigt werden<sup>355</sup>. Neben diesen protektiven Eigenschaften der NS-Derivate berichteten jedoch andere Autoren unspezifische Effekte, wie das Öffnen anderer Ionenkanäle<sup>313,314,390</sup> und Hemmung der mitochondrialen Funktion<sup>294,316,371,372,391</sup>. Das Ausmaß der nekrotischen Zellzerstörung wurde im Rahmen dieser Arbeit über die Aktivität der freigesetzten LDH im Zellkulturmedium erfasst. Im Gegensatz zu den *in vivo* Befunden im akuten Myokardinfarktmodell<sup>355</sup> konnte *in vitro* kein signifikanter Zelltodunterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden (Abbildung 4.12 und Abbildung 4.13A). Auch eine pharmakologische Stimulation des BK-Kanals durch cGMP-Erhöhung (mittels 8-Br-cGMP oder Cinaciguat; Abbildung 4.14 und Abbildung 4.15) oder BK-Kanal Öffnung mittels NS11021 (Abbildung 4.16) zeigte in dem hier untersuchten *in vitro* Hypoxie-Reoxygenierungsmodell keine Herzzellprotektiven Effekte. Eine Limitation dieser Versuche ist, dass die durch 8-Br-cGMP bzw. Cinaciguat-vermittelte Stimulation der cGKI nicht direkt überprüft wurde. Es bleibt damit unklar ob der Signalweg unter den hier gewählten Hypoxie-Reoxygenierungsbedingungen intakt ist und ob ausreichend Co-Substrate für die Stimulation der cGKI (z.B. ATP) vorhanden waren. Insgesamt wird verdeutlicht, dass eine Übertragbarkeit der

*im vivo* generierten Ergebnisse auf primäre Zellkultursysteme nicht einfach zu realisieren ist. Vermutlich kommt die *in vivo* Kardioprotektion in Kardiomyozyten durch ein Zusammenspiel der Kardiomyozyten im kontrahierenden Verband sowie mit anderen (nicht)kardialen Zelltypen zustande. Diese Vermutung wird gestützt von einer aktuellen Arbeit von Wojtovich und Mitarbeitern, die BK-Kanal-unabhängige kardioprotektive Effekte gezeigt hat<sup>392</sup>. Die Autoren postulieren, dass nicht der mitoBK, sondern der BK-Kanal in intrinsischen kardialen Neuronen für die Kardioprotektion verantwortlich ist. Sie zeigten zum einen, eine sowohl durch NS1619 als auch durch NS11021-vermittelte Kardioprotektion im *ex vivo* perfundierten Langendorffherzen, wobei NS11021 10-fach wirksamer war als NS1619. Dieser kardioprotektive Effekt war jedoch von einer pharmakologischen Blockade der synaptischen Transmission durch Hexamethonium, einem Antagonisten am nikotinischen Acetylcholinrezeptor, abhängig. Zum andern konnte *in vitro* in isolierten adulten Kardiomyozyten und Mitochondrien von BK-WT und BK-defizienten Mäusen eine NS-vermittelte Kardioprotektion beobachtet werden, was die Autoren zu der Schlussfolgerung führte, dass diese kardioprotektiven Effekte in den Kardiomyozyten BK-Kanal unabhängig und auf *Off-Target*-Effekte der NS-Derivate zurückzuführen sind. Sie postulierten daher, dass der NS-vermittelte Schutz des Myokards vor einem I/R-Schaden über BK-Kanäle in Herzneuronen erfolgt.

Basierend auf den eigenen Erkenntnissen und der Arbeit von Wojtovich sowie weiteren Hinweisen aus der Literatur deutet alles darauf hin, dass die mitoBK-vermittelte Kardioprotektion von mehreren Faktoren abhängt. Eine leichte Tendenz der BK-defizienten Kardiomyozyten zu erhöhtem Zelltod nach Hypoxie bzw. HR konnte in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden (Abbildung 4.12 und Abbildung 4.13). Eine Protektion durch Stimulation des BK-Kanals, konnte *in vitro* jedoch in keinem der beiden Genotypen gezeigt werden, was auf einen mitoBK-unabhängigen Mechanismus des Zellüberlebens hindeutet. Weitere Untersuchungen zur Analyse einer mitoBK-(un)abhängig vermittelten Protektion der Kardiomyozyten sind daher unerlässlich. Es sollte zum einen die Hypoxie und Reoxygenierungszeit variiert werden sowie die Konzentration und die zeitliche Exposition der zugesetzten pharmakologischen Substanzen (siehe auch Abschnitt 5.5). Die vorliegenden *in vitro* Untersuchungen deuten darauf hin, dass neben dem mitoBK auch nicht-kardiomyozytäre und möglicherweise nicht-mitochondriale K<sup>+</sup>-Kanäle wichtig für die kardioprotektiven Stimuli bei HR sind. Darüber hinaus ist der BK-Kanal nicht nur in kardiomyozytären Mitochondrien, sondern auch in koronaren Glattmuskelzellen<sup>269</sup>, kardialen Fibroblasten<sup>270</sup> und Endothelzellen<sup>393,394</sup> lokalisiert. Um den Beitrag des BK-Kanals aus Fibroblasten oder Endothelzellen zu untersuchen, sollten ergänzende *in vivo* sowie *in vitro* Untersuchungen mit Fibroblasten- oder Endothelzellen-spezifischen BK-defizienten Mäusen in Betracht gezogen werden. Eine Tamoxifen-induzierbare Cre-transgene Maus unter der Kontrolle des *Postn*-Promotors<sup>395</sup> wäre geeignet um eine Fibroblasten-spezifische BK-KO Maus zu generieren. Ein endothelial-spezifischer Promotor wäre hingegen Tie2, mit dem eine endothelial-spezifische BK-KO Maus generiert werden könnte<sup>396,397</sup>.

## 5.5 Limitationen der *in vitro* Untersuchungen an isolierten Mitochondrien und isolierten adulten Kardiomyozyten

Die Betrachtung eines einzelnen Kompartiments einer Zelle, wie den Mitochondrien, stellt eine gewisse Limitation dar und bringt einige Nachteile mit sich. Kardiale Mitochondrien werden in zwei funktionell unterschiedliche Subpopulationen unterteilt. Die subsarkolemmalen Mitochondrien (SMM) befinden sich direkt unterhalb der Plasmamembran, während die interfibrillären Mitochondrien (IFM) in longitudinalen Reihen entlang des kontraktiven Apparats angeordnet sind<sup>362,398</sup>. Diese wurden erstmalig von Stenger und Spiro<sup>362</sup> elektronenmikroskopisch beschrieben und einige Jahre später gelang es June W. Palmer<sup>398</sup> zum ersten Mal diese Subpopulationen getrennt voneinander zu isolieren. Die mitochondrialen Subpopulationen wurden in vielen nachfolgenden Studien unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen untersucht, wobei sich biochemische und morphologische Unterschiede zeigten<sup>399,400</sup>. Es ist ausreichend in der Literatur beschrieben, dass die ADP-stimulierte Atmung und somit der Sauerstoffverbrauch im State-3, analog zur ATP-Produktion, in den IFM deutlich höher ist als in den SSM<sup>398</sup>. Im Rahmen der respiratorischen Messungen dieser Arbeit wurde keine getrennte Isolation vorgenommen. Durch die hier verwendete Isolationsmethode wird die funktionelle Lokalisation der Mitochondrien aufgelöst. Des Weiteren befinden sich die isolierten Mitochondrien nicht mehr in der zellphysiologischen Umgebung. Es findet jedoch immer ein *Crosstalk* zwischen den einzelnen Kompartimenten einer Zelle statt, nicht zuletzt da ATP durch die ANT ins Cytosol der Zelle gelangt und hier für den zellulären Energiebedarf verbraucht und somit dem System entzogen wird. Diese Energieabgabe von ATP führt primär zur Bildung von ADP und P<sub>i</sub>, was ein Absinken im ATP zu ADP-Verhältnis zur Folge hat und die ATP-Produktion weiter antreibt. Darüber hinaus herrschen während der respiratorischen Messungen keine zellphysiologischen Bedingungen. Die State-2 und State-4 Atmung werden jeweils durch den Mangel an ADP limitiert und die State-3 Atmung hingegen durch einen Überschuss an ADP bedingt. Diese Bedingungen treten niemals *in vivo* auf. Die respiratorischen Messungen der vorliegenden Arbeit wurden außerdem alle unter basalen Bedingungen, d.h. bei Normoxie durchgeführt. Eventuell ist die Öffnungswahrscheinlichkeit des BK-Kanals nur unter anfänglichem Zellstress wie Hypoxie-Reoxygenierung gegeben, wenn die Mitochondrien sich in einem reduzierten Zustand befinden. Letztlich bleibt unklar, inwiefern ETC und ATP-Produktion bei hypoxischen Bedingungen oder nach Reoxygenierung durch den mitoBK moduliert werden. Die respiratorischen Messungen unter Hypoxie-Reoxygenierung führten im Rahmen dieser Arbeit zu technischen nicht überwindbaren Schwierigkeiten. Verschiedene in der Literatur etablierte Hypoxie-Reoxygenierungsprotokolle<sup>401,402</sup> wurden zur Untersuchung der isolierten Mitochondrien herangezogen. So war weder nach einer 45 min normoxischen Inkubation bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 21% O<sub>2</sub> noch nach einer hypoxischen Inkubation von 30 min bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 0% O<sub>2</sub> mit anschließender Reoxygenierung von 15 min bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 21% O<sub>2</sub> ein erhöhter Sauerstoffverbrauch im State-3 durch Stimulation mit ADP möglich (siehe Anhang Abbildung 7.7A und B). Dies deutete auf einen irreversiblen temperaturbedingten Schaden der Mitochondrien bei erhöhten CO<sub>2</sub>-Werten hin. Dies konnte auch durch parallele respiratorische Messungen von Mitochondrien die bei 4°C oder 37°C inkubiert wurden bestätigt werden (Abbildung 7.7C). Ein weiteres Protokoll<sup>403,404</sup>, bei dem die Hypoxie durch komplette Respiration des im Respiromedien enthaltenen Sauerstoffs erreicht wird (*Daten nicht gezeigt*) und anschließende anoxische Inkubation unter diesen Bedingungen, konnte ebenfalls nicht reproduziert werden.

Ein weiterer Aspekt ist, dass im Rahmen dieser Arbeit keine ROS- und Membranpotential-Messungen vorgenommen wurden. Daher sollte in zukünftigen Versuchen unbedingt das Membranpotential beispielsweise fluorimetrisch und die Auswirkungen einer Stimulation mit pharmakologischen Substanzen untersucht werden. Außerdem sollte die Entstehung von ROS beispielsweise mit ROS-sensitiven Farbstoffen<sup>271,405</sup> genauer untersucht werden. Darüber hinaus wäre es von Vorteil die mitochondriale Respiration in isolierten Kardiomyozyten zu untersuchen, da eventuell zusätzliche zelluläre Kompartimente für eine mitoBK-vermittelte Beeinflussung der ETC notwendig sind. Dies könnte mit einem Seahorse XFp Analyzer erfolgen, der es erlaubt die mitochondriale Respiration von ganzen Zellen – auch isolierten Kardiomyozyten – zu untersuchen<sup>406,407</sup>. Dieser XFp Analyzer wurde speziell für respiratorische Messungen in intakten Zellen entwickelt und gibt die grundlegenden Parameter der mitochondrialen Funktion an: Basale Atmung, ATP-Umsatz, Protonenleck, maximale Atmung und nicht-mitochondriale Atmung.

Auch die Betrachtung isolierten Kardiomyozyten bringt Vor- und Nachteile mit sich. Der Vorteil der Analyse isolierter Kardiomyozyten im Vergleich zum gesamten Herzen ist die Beseitigung anderer Zelltypen, insbesondere Endothelzellen und Fibroblasten. Hierdurch werden jedoch möglicherweise wichtige Interaktionen zwischen den Kardiomyozyten und anderen Zelltypen zerstört. Die *in vivo* im Myokardinfarktmodell postulierten Effekte, einer mitoBK-vermittelten Kardioprotektion bei I/R<sup>355</sup>, ließen sich *in vitro* nicht bzw. nicht vollständig bestätigen. Es scheint, dass weitere Faktoren und/oder Zelltypen für die mitoBK-vermittelte Kardioprotektion *in vivo* nötig sind. Der Einfluss der Hämodynamik, der Scherstress sowie die neuronale und humorale Signaltransduktion werden im isoliert betrachteten System nicht berücksichtigt. Durch die Trennung der Kardiomyozyten von den Blutgefäßen und der umgebenden extrazellulären Matrix gehen wichtige Aspekte der Pathophysiologie des myokardialen I/R-Schadens verloren. Gerade die Zirkulation und Dynamik essentieller Substrate wie Fettsäuren, Aminosäuren und anderer Metabolite spielen, insbesondere bei der Reperfusion, eine essentielle, nicht vernachlässigbare Rolle<sup>408,409</sup>. Der Metabolismus isolierter Zellen verhält sich meist anders als *in vivo*. So sind beispielsweise isolierte Kardiomyozyten nicht in der Lage die Mechanik der Hyperkontraktur des Herzens bei der Reperfusion zu reproduzieren<sup>4,410</sup>. Darüber hinaus könnte der Zellisoliationsprozess einen signifikanten zellulären Stress und die Erzeugung von oxidativen Spezies hervorrufen, die möglicherweise die Funktion von GCs, cGKI, PDEs und des BK-Kanals beeinflussen. Dies könnte zu Vorschädigungen der Kardiomyozyten führen, was die Herausarbeitung eventueller mitoBK-abhängiger Unterschiede erschwert. Außerdem ist die Übertragung der I/R-Stimulation auf die *in vivo* Zellkultur sehr schwierig. Da sich die Zellen nicht mehr in einem physiologischen Umfeld befinden, können kleine Variationen im pH-Wert, den Nährstoffzugaben sowie der Dauer der zellulären Hypoxie bzw. der Reoxygenierung große Einflüsse haben. Die Mikroskopie spielt hierbei eine wichtige Rolle. Um einzelne Zellen zu beobachten erfordert dies jedoch, dass die Kardiomyozyten adhären sind. Dies war allerdings unter Hypoxie sowie unter längerer normoxischer Inkubation nicht der Fall (siehe Abschnitt 4.6 sowie Abbildung 4.11 und Abbildung 7.8), da sich die Zellen ablösten. Eine wiederholte Visualisierung der jeweiligen Zellen war nicht möglich. Um die Zellen während HR besser visualisieren und beobachten zu können, würde die Neuetablierung von neonatalen Kardiomyozyten eine gute Alternative darstellen. Diese haben mehrere Vorteile gegenüber adulten Kardiomyozyten und werden häufig eingesetzt um die Auswirkungen von Hypoxie-Reoxygenierung zu untersuchen<sup>411</sup>. Sie sind leicht und vor allem über einen längeren

Zeitraum kultivierbar. Darüber hinaus sind neonatale Kardiomyozyten nicht so anfällig gegenüber exogenen Stimuli im Vergleich zu isolierten adulten Kardiomyozyten, die nur auf den Laminin-beschichteten Platten locker anhaften. Die Isolation neonataler Kardiomyozyten ist zudem simpler und technisch einfacher<sup>412</sup>. Neonatale Kardiomyozyten sind darüber hinaus weit weniger empfindlich gegenüber der Calcium-Reinduktion nach der Vereinzelnung der Zellen und die Zellausbeute ist stark erhöht im Vergleich zu adulten Kardiomyozyten. Ein weiterer großer Vorteil ist, dass im Gegensatz zu adulten Kardiomyozyten die neonatalen Kardiomyozyten länger in Kultur gehalten werden können, was unter anderem die Untersuchung der Genexpression erleichtert. Kultivierte neonatale Kardiomyozyten sind inzwischen für die Untersuchungen von morphologischen, elektrophysiologischen, biochemischen, zellbiologischen und biomechanischen Parametern zu einem der vielseitigsten Systeme für die Untersuchung von Herzzellfunktionen *in vitro* geworden. Es ist daher empfehlenswert für weitere Hypoxie-Reoxygenierungs-Untersuchungen die Verwendung neonataler BK-WT und BK-KO Kardiomyozyten in Betracht zu ziehen.

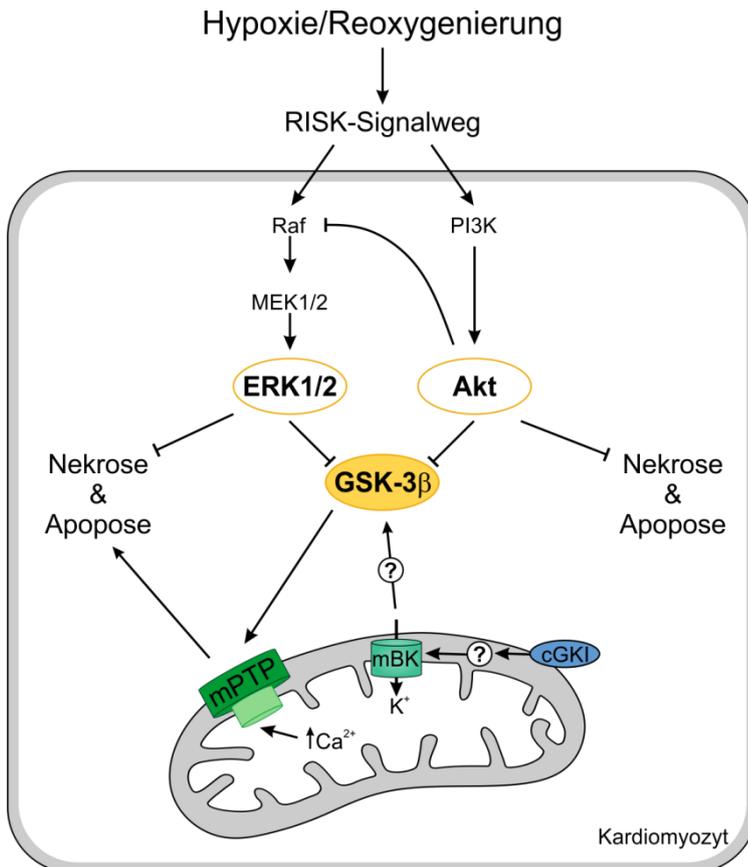
### 5.6 Aktivierung wichtiger *pro-survival* Kinasen des RISK-Signalweges

Obwohl die Kardiomyozyten dem Hypoxie-Reoxygenierungsprotokoll ausgesetzt waren, wurden sie effektiv vor weiterer Apoptose- und Nekrose-Induktion geschützt, da visuell in beiden Genotypen noch lebende Myozyten zu erkennen waren. Darüber hinaus war kein signifikant verbessertes Überleben der BK-WT Kardiomyozyten gegenüber den BK-defizienten Kardiomyozyten zu beobachten. Es müssen somit in den Zellen Schutzmechanismus während Hypoxie-Reoxygenierung aktiviert werden, die diese Zellschädigungen verhindern. Eventuell werden diese in den BK-defizienten Kardiomyozyten kompensatorisch verstärkt, weshalb etwaige signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen nicht herausgearbeitet werden konnten. Bei Hypoxie und zu Beginn der Reoxygenierung werden im Sinne einer Limitation nekrotischer und apoptotischer Vorgänge wichtige intrazelluläre Signalwege aktiviert und insbesondere Kinasen hoch reguliert (siehe Abschnitt 1.5.1 und Abbildung 1.6). Nach heutigem Kenntnisstand beinhaltet dies die Aktivierung des RISK-Signalweges, mit der Phosphorylierung der zentralen Effektorinasen ERK1/2 und Akt. Daher kann die Manipulation und Regulation des RISK-Signalweges während der frühen Reperfusionphase, ein möglicher Ansatz zur Begrenzung des reperfusionsinduzierten Zelltods darstellen. Es wurde bereits sowohl *in vivo* als auch *in vitro* gezeigt, dass ERK1/2 und Akt durch I/R bzw. HR aktiviert werden<sup>95-97</sup>. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass zu Beginn der Reperfusion die ERK1/2- sowie Akt-Phosphorylierung ansteigt und mit der Zeit wieder abnimmt<sup>413</sup>. Um die Aktivierung dieser *pro-survival* Kinasen sowie das maximale Ansprechen, die Signaldauer und das Signalende zu erfassen, wurde die Kinetik der Phosphorylierung verschiedener *pro-survival* und proapoptotischer Kinasen bei *in vitro* Hypoxie-Reoxygenierung untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die protektiven Kinasen ERK1/2 und Akt während der post-hypoxischen Reoxygenierung massiv phosphoryliert werden und dadurch die Zellprotektion fördern. Betrachtet man das Phosphorylierungsmuster von ERK1/2 und Akt nach 90 min Hypoxie und zu unterschiedlichen Zeiten der Reoxygenierung wird deutlich, dass die Aktivierung der Kinasen nicht synchron verläuft. Zu Beginn der Reoxygenierung trat in beiden Genotypen eine starke ERK1/2-Phosphorylierung auf (Abbildung 4.17), die im weiteren Verlauf der Reoxygenierung wieder abnahm,

während die Phosphorylierung von Akt (Abbildung 4.18) kontinuierlich zunahm. Die Dephosphorylierung und somit Inaktivierung von ERK1/2 kann sogar indirekt durch Akt initiiert werden, da diese eine übergeordnete Raf-Kinase phosphoryliert und somit die Signalweiterleitung zur Aktivierung von ERK1/2 hemmt<sup>414</sup> (siehe Abbildung 5.1). Jedoch zeigten sich sowohl nach Hypoxie als auch während der gesamten Reoxygenierungszeit leichte Unterschiede im p-ERK1/2 und p-Akt-Level zwischen BK-WT und BK-KO Kardiomyozyten (Abbildung 4.17 und Abbildung 4.18). Dies deutet auf kompensatorische Mechanismen der isolierten BK-defizienten Kardiomyozyten hin. Es scheint als würden ERK1/2 und Akt während der Reoxygenierung in den BK-KO Kardiomyozyten verstärkt aktiviert werden, um letztendlich den Verlust des BK-Kanals auszugleichen. Dieser scheinbar kompensatorische Mechanismus *in vitro* würde auch erklären, warum etwaige Unterschiede im nekrotischen Zelltod nicht detektiert werden können.

Die protektiven Mechanismen von ERK1/2 und Akt werden zum einen direkt vermittelt und zum anderen indirekt durch die Expression zellprotektiver Gene. Beide Kinasen phosphorylieren die proapoptotischen Bcl-2 Proteine Bad und Bax sowie direkt und indirekt GSK-3 $\beta$ , was die mPTP-Öffnung verhindert, zur Blockade der Caspase-Kaskade führt und Apoptose inhibiert (siehe hierzu auch Abschnitt 1.5.1). Um den Signalweg mechanistisch detaillierter aufzuklären, wurden neben ERK1/2 und Akt die Kinetik der GSK-3 $\beta$ - und PKC $\epsilon$ -Phosphorylierung sowie die Aktivierung der Caspase-3 untersucht (Abbildung 4.19 und Abbildung 4.20). Die Rolle der GSK-3 $\beta$  in der Apoptose erlangte erst in den vergangenen Jahren mehr und mehr an Bedeutung. Die Gruppe um Murphy zeigte als erstes, dass eine erhöhte Phosphorylierung von GSK-3 $\beta$  und die Verabreichung von GSK-3 $\beta$ -Inhibitoren die Nekrose reduziert und Kardioprotektion vermittelt wird<sup>415</sup>. Weitere Studien mit isolierten Kardiomyozyten haben gezeigt, dass eine Phosphorylierung der GSK-3 $\beta$  die Apoptose durch Hemmung der mPTP-Öffnung reduziert<sup>126</sup>, und dass die Verabreichung (zu unterschiedlichen Zeiten) von GSK-3 $\beta$ -Inhibitoren kardioprotektiv wirkt<sup>132,416-418</sup>. Der Mechanismus, wie eine Hemmung der GSK-3 $\beta$ -Aktivität Nekrose und Apoptose reduziert ist komplex und noch nicht im Detail geklärt. Außerdem ist die Regulation der GSK-3 $\beta$  kompliziert, da ihre Aktivität durch Phosphorylierung, Protein-Protein-Wechselwirkungen und intrazelluläre Lokalisation kontrolliert wird<sup>419</sup>. Im Gegensatz zu den vielfältigen Signalwegen, die die GSK-3 $\beta$ -Aktivität hemmen, ist nur wenig über die Mechanismen der GSK-3 $\beta$ -Dephosphorylierung bekannt. Die Regulation der Ser9-Dephosphorylierung wird hauptsächlich der Proteinphosphatase-1 (PP1) zugeschrieben<sup>420,421</sup>. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigte sich in den BK-defizienten Kardiomyozyten und den Wurfgeschwisterkontrollen eine unterschiedliche Dynamik der Phosphorylierung und somit Inaktivierung von GSK-3 $\beta$  (Abbildung 4.19). Es scheint als würde der mitoBK nach Beginn der Reoxygenierung zur Hemmung der GSK-3 $\beta$ -Phosphorylierung bzw. zur Dephosphorylierung der GSK-3 $\beta$  beitragen. Die protektive Signaltransduktion über GSK-3 $\beta$  scheint in BK-WT Kardiomyozyten bereits nach kurzer Reoxygenierung abgeschlossen zu sein. In BK-KO Kardiomyozyten hingegen erfolgte ein kontinuierlicher Anstieg der GSK-3 $\beta$ -Phosphorylierung. Eine mitoBK-Ablation scheint demnach zu einer erhöhten und längeren Phosphorylierung der GSK-3 $\beta$  zu führen, was dem Zelltod bei Hypoxie und HR in den Kardiomyozyten entgegenwirkte. Der Mechanismus und insbesondere die Verbindung zwischen mitoBK einerseits und ERK1/2 bzw. Akt und GSK-3 $\beta$  andererseits bleibt jedoch unklar. Es ist ebenfalls unklar, ob die GSK-3 $\beta$  in den

Kardiomyozyten auch in Mitochondrien exprimiert wird. Es wurde bereits gezeigt, dass unter normalen unstimulierten Bedingungen die GSK-3 $\beta$  sowohl im Cytosol als auch im Zellkern von Kardiomyozyten lokalisiert ist<sup>422</sup>. Interessanterweise wurde im Gehirn gezeigt, dass die GSK-3 $\beta$  neben dem Zellkern auch in den Mitochondrien exprimiert wird und hier durch Apoptosestimuli verstärkt aktiviert wird, im Vergleich zur cytosolischen GSK-3 $\beta$ <sup>122</sup>. Es sollte daher unbedingt überprüft werden, ob die GSK-3 $\beta$  in Kardiomyozyten auch in den Mitochondrien exprimiert ist oder durch Hypoxie-Reoxygenierung eine Translokation in Mitochondrien erfährt.



**Abbildung 5.1**

**Hypothesenmodell zum Einfluss des mitoBKs auf protektive Signalwege bei *in vitro* Hypoxie-Reoxygenierung**

Während Hypoxie und zu Beginn der Reoxygenierung kommt es zur Aktivierung des RISK-Signalweges und somit zur Phosphorylierung von ERK1/2, Akt und GSK-3 $\beta$ . Während die Aktivierung von Akt während der Reoxygenierung stetig ansteigt, nimmt die initiale Phosphorylierung von ERK1/2 im Verlauf der Reoxygenierung wieder ab. Eventuell wird die weitere Aktivierung von ERK1/2 indirekt durch Akt gehemmt. Im weiteren Verlauf der Reoxygenierung kommt es bei mitoBK-Expression zur Abnahme der GSK-3 $\beta$ -Phosphorylierung. Dies lässt auf eine mitoBK-abhängige Regulation der GSK-3 $\beta$  schließen, die über bisher unbekannte Phosphatasen oder Kinasen verlaufen könnte.

Eine Aktivierung der PKC $\epsilon$  hingegen konnte nach 90 min Hypoxie und zu unterschiedlichen Reoxygenierungszeiten nicht gezeigt werden (Abbildung 4.20A). Auch eine Aktivierung der Caspase-3 konnte unter diesen Bedingungen nicht beobachtet werden (Abbildung 4.20B). Möglicherweise werden PKC $\epsilon$  und Caspase-3 erst zu einem späteren Zeitpunkt aktiviert, was in künftigen Studien durch verlängerte Reoxygenierungszeiten überprüft werden sollte. Zur detaillierten Entschlüsselung des Signalweges ist es unerlässlich weitere pro- und antiapoptotische Proteine zu untersuchen, die mit dem RISK-Signalweg assoziiert werden oder Effektoren von Akt und ERK1/2 sowie GSK-3 $\beta$  darstellen. Darunter wäre die Analyse von Proteinen der Bcl-2-Familie wie proapoptotisches Bad und Bax sowie antiapoptotisches Bcl-X<sub>L</sub> in Betracht zu ziehen. Auch die Analyse der Genexpression verschiedener antiapoptotischer Proteine wie beispielsweise NF $\kappa$ -B, die durch ERK1/2, Akt und GSK-3 $\beta$  initiiert werden, könnte weitere detaillierte Einblicke in die Signaltransduktion liefern.

Neben dem RISK-Signalweg zählt der JAK-STAT3-Signalweg (*JAK: Januskinase, STAT: signal transducers and activators of transcription*) zu einem der wichtigsten pro-survival Signalwege während I/R. Die Rolle des JNK-STAT3-Signalsweges bei Ischämie und Reperfusion ist bisher unklar, es konnte jedoch *in vivo* und *in vitro* eine Aktivierung bei Reperfusion gezeigt werden<sup>423-425</sup>. Mäuseherzen mit einer spezifischen Deletion von STAT3 zeigten signifikant erhöhte Infarktgrößen sowie einen Anstieg apoptotischer Signalwege und eine gesteigerte Mortalität<sup>426</sup>. Neueste Studien zeigen darüber hinaus eine direkte Assoziation von STAT3 mit dem Komplex I der Elektronentransportkette der Mitochondrien sowie dessen Einfluss auf die Respiration, Inhibierung der mPTP-Öffnung und der Apoptoseregulation<sup>427,428</sup>. Ob eine Aktivierung des JAK-STAT3-Signalweges in Verbindung mit dem mitoBK steht wurde bislang noch nicht untersucht und könnte in diesem Kontext interessante Erkenntnisse liefern.

## 5.7 Charakterisierung der adenoviralen Transduktion

Genetisch codierte Biosensoren, die Fluoreszenz-Resonanz-Energieübertragung (FRET) nutzen, sind wichtige *Tools* für die Untersuchung der kompartimentierten Signalübertragung von zyklischen Nukleotiden wie cGMP und cAMP in lebenden Zellen und Organen. Die Verwendung von FRET-basierten genetisch codierten Biosensoren ermöglicht eine Echtzeitmessung und detaillierte kinetische Analyse von cGMP auf verschiedene pharmakologische GC-Liganden und PDE-Inhibitoren bei gesunden und kranken adulten Kardiomyozyten. In den letzten zehn Jahren wurden mehrere optische und nichtoptische Methoden zur Messung von cGMP in einzelnen intakten Zellen entwickelt. Mehrere fluoreszierende cGMP-Biosensoren wurden entwickelt, die eine direkte Visualisierung von intrazellulärem cGMP mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung ermöglichen<sup>429</sup>. Die meisten dieser Sensoren basieren auf einem teilweise verkürzten cGMP-abhängigen Proteinkinase-molekül. cGMP-Bindung führt zu einer Konformationsänderung und somit zu einer Veränderung des FRET. In jüngster Zeit wurde ein Biosensor mit geringer Affinität auf Basis einer einzigen regulatorischen cGMP-bindenden Domäne von PDE5 modifiziert, indem Cyan und Gelb mit grünen (T-Sapphire) und roten (Dimer2) fluoreszierenden Proteinen ausgetauscht wurden<sup>349,430</sup>. Der hier verwendete cGi500-Sensor trägt die zwei cGMP-Bindungsstellen der cGKI, eingeschlossen zwischen Cyan (CFP)- und Gelb (YFP)-Fluoreszenz-Proteinen<sup>326,327</sup>. Da cGMP im erwachsenen Herzen in einer kompartimentierten Weise vorliegt<sup>431</sup> ist es wünschenswert, dass FRET-Sensoren neben globalen auch lokale cGMP-Signale erfassen. Die adenovirale Transduktion isolierter adulter Kardiomyozyten stellt hierbei eine geeignete Methode dar. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal isolierte adulte Kardiomyozyten mit einem Adenovirus (Ad-CMV-MTS-cGi500), der den cGi500-Sensor codiert und an die mitochondriale Cytochrom-C-Oxidase getagged ist, transfiziert (siehe Abschnitt 4.9). Der adenovirale Vektor sowie der Kontrollvektor wurde von Frau Prof. Dr. Ulrike Naumann (Molekulare Neuro-Onkologie, Hertie-Institut für klinische Hirnforschung; Tübingen) hergestellt. Mit einem Fluoreszenzmikroskop (AxioImager Z1, Zeiss) angefertigte Bilder zeigten ein Längsverteilungsmuster des cGi500 an, das weitgehend mit der MitoTracker Färbung übereinstimmte, während das Verteilungsmuster der mit dem Kontrollvirus (Ad-CMV-GFP) transfizierten Zellen eine cytosolische Lokalisation des GFP zeigte. Daher kann von einer primär mitochondrialen Lokalisation des cGi500-Sensors ausgegangen werden. Um diese Befunde abzusichern, sollten zusätzliche

Analysen mittels Hochleistungsmikroskopie erfolgen. Geeignet hierfür wäre ein STED-Fluoreszenz-Nanoskop (STED = STimulated Emission Depletion), das eine besondere Form des Lichtmikroskops darstellt. Dieses Mikroskop erlaubt die Visualisierung, Quantifizierung und Verteilung von Mitochondrien-assoziierten Proteinen und erreicht dabei eine Nanometerauflösung. Dieses Mikroskop wurde unter anderem von Singh und seinen Mitarbeitern zur Detektion des mitoBKs<sup>272</sup> und verschiedenen Proteinclustern<sup>432</sup> innerhalb der Mitochondrien sowie für GFP-markierte Proben verwendet<sup>433</sup>. Zukünftig soll nach Validierung der erfolgreichen Transduktion und Expression des cGi500-Sensors in den kardiomyozytären Mitochondrien Änderungen der cGMP-Konzentration in diesem Zellkompartiment gemessen werden. Auch Änderungen der cGMP-Konzentration bei HR sowie die Echtzeitanalyse der cGMP-Dynamik und eine detaillierte kinetische Analyse des putativen cGMP-Pools in Mitochondrien in Gegenwart von pharmakologischen Substanzen sowie GC-Liganden und PDE-Inhibitoren müssten sich mit diesem Ansatz erfassen lassen. Letztendlich werden diese Untersuchungen Aufschluss darüber geben wie sich die cGMP-Konzentration während HR in BK-WT und BK-KO Mitochondrien ändern und ob es zu einer cGMP-vermittelten Aktivierung des mitoBK bei Hypoxie-Reoxygenierung kommt.

## 6 Zusammenfassung

Der Herzinfarkt und die daraus resultierenden irreversiblen Schädigungen des Myokards sowie dessen hohe Inzidenz weltweit zeigen die Bedeutung und Wichtigkeit zur Verbesserung der aktuellen Therapieoptionen. Vor allem die Reduktion des Reperfusionsschadens, der einen Großteil des Gewebeschadens bedingt, steht im Fokus des klinischen Interesses. Ein vielversprechender Ansatz zur Verringerung des Ischämie-Reperfusionsschadens stellt neben der mechanischen Prä- und Postkonditionierung eine pharmakologische Aktivierung des cGMP/cGKI-Signalweges dar. Jedoch sind die zellulären Signalwege und Mechanismen über die der cGMP/cGKI-Signalweg zur Reduktion des Ischämie-Reperfusionsschadens beiträgt teilweise ungeklärt. Zur Verbesserung der Therapieoptionen ist es daher unerlässlich, die an den kardialen Schutzmechanismen beteiligten cGMP-abhängigen Effektoren zu identifizieren. Kardiomyozytäre Mitochondrien sowie mitochondriale  $K^+$ -Kanäle stellen vielversprechende Endeffektoren verschiedener kardioprotektiver Signalkaskaden dar. Der enorme intramitochondriale sowie cytosolische Anstieg von  $Ca^{2+}$  und ROS, vor allem zu Beginn der Reperfusion, gelten als Trigger der mPTP-Öffnung und Initialisierung des Zelltodes (siehe Abschnitt 1.3 und 1.4). Dementsprechend ließen sich nach pharmakologischer Aktivierung mitochondrialer  $K^+$ -Kanäle *ex vivo* Infarktlimitierende Effekte beobachten. Bislang wurde diese Wirkung primär dem mito $K_{ATP}$ -Kanal zugeschrieben<sup>384-386</sup> jedoch rückt der mitoBK immer mehr als zentrale Komponente eines kardioprotektiven Mechanismus in den Fokus<sup>241,245,434</sup>. Durch eine Entkopplung der Elektronentransportkette und einen dadurch limitierenden Anstieg von ROS, wird eine über PKC $\epsilon$ -vermittelte Hemmung der mPTP-Öffnung postuliert<sup>116,311</sup>. Darüber hinaus wird über den mitoBK-Kanal das Überleben nach einer Ischämie durch eine verbesserte mitochondriale  $Ca^{2+}$ -Toleranz und Regulation der mPTP-Öffnung begünstigt<sup>272,290,292</sup>. Die Bedeutung des mitoBK-Kanals für die mechanische sowie cGMP-abhängige Kardioprotektion konnten kürzlich durch eine *in vivo* Studie bestätigt werden<sup>355</sup>. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Western-Blot Analysen bestätigen die Lokalisation des BK-Kanals in den Mitochondrien. Darüber hinaus wurde eine Assoziation zwischen kardiomyozytären Mitochondrien und der cGKI beobachtet. Es bleibt bisher unklar, ob und wie das zellprotektive Signal der cytosolischen cGKI an den BK-Kanal in der IMM gelangt. Die Befunde der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die cGKI unter Basalbedingungen an der OMM lokalisiert ist und implizieren, dass das zellprotektive Signal der cGKI daher über ein bisher unbekanntes zwischengeschaltetes Protein an  $K^+$ -Kanäle in der IMM weitergeleitet wird. Alternativ könnte unter hypoxischen Bedingungen auch eine direkte Interaktion der cGKI mit dem mitoBK erfolgen.

Ein Einfluss des mitoBKs auf die Elektronentransportkette konnte in isolierten Mitochondrien nicht beobachtet werden. Weder unter basalen Bedingungen noch durch eine Zugabe von 8-Br-cGMP, ließ sich eine Beeinflussung der ETC durch den BK-Kanal zeigen. Eine pharmakologische Modulation des BK-Kanals mit dem BK-Kanalöffner NS11021 zeigte in den getesteten Konzentrationen (150 nM und 300 nM) kontroverse Effekte. NS11021 scheint in diesen Konzentrationen in isolierten Mitochondrien BK-unabhängige divergente Wirkungen zu haben. Insbesondere in einer höheren Konzentration ließen sich *Off-Target* Effekten beobachten, was mit der hohen Toxizität der Substanz im *in vivo* I/R-Modell übereinstimmt<sup>355</sup>. Die respiratorischen Messungen und die Effekte des BK-Kanalöffners NS11021

sowie des cGMP-Analogons 8-Br-cGMP auf die mitochondriale Bioenergetik wurden in der vorliegenden Arbeit jedoch nur unter basalen Bedingungen und im isolierten Mitochondrium untersucht. Möglicherweise bedeutende Interaktion zwischen den Zellkompartimenten sowie weiteren kardialen Zelltypen bei Hypoxie und Reoxygenierung wurden hierbei nicht erfasst. Eventuell kommt eine Assoziation zwischen cGMP/mitoBK und der ETC erst bei anfänglichem oxidativem Stress zustande. Weitere Versuche unter hypoxischen Bedingungen und anschließender Reoxygenierung sind erforderlich, um den erst kürzlich *in vivo* festgestellten Zusammenhang zwischen dem cGMP/cGKI-Signalweg und mitoBK<sup>355</sup> sowie der ETC zu entschlüsseln.

Darüber hinaus konnte *in vitro* bei Hypoxie-Reoxygenierung keine signifikante Reduktion des nekrotischen Zelltods in isolierten adulten BK-WT Kardiomyozyten im Vergleich zu BK-defizienten Kardiomyozyten gezeigt werden. In den BK-KO Kardiomyozyten war ein tendenziell erhöhter nekrotischer Zelltod nach HR zu beobachten, jedoch wurde in diesen Versuchsreihen kein Signifikanzniveau erreicht. Auch eine pharmakologische Stimulation der Kardiomyozyten mittels 8-Br-cGMP, dem sGC-Stimulator Cinaciguat sowie NS11021 zeigte kein verbessertes Überleben der BK-WT gegenüber den BK-defizienten Kardiomyozyten. Dies bestätigt die bereits formulierte Schlussfolgerung, dass weitere (nicht)kardiale Zelltypen bzw. Proteine an der mitoBK-abhängigen Vermittlung kardioprotektiver Signale beteiligt sind. Es ist außerdem hinreichend bekannt, dass bei Hypoxie und insbesondere zu Beginn der Reoxygenierung verschiedene *pro-survival* Kinasen hochreguliert werden. Es konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sowohl ERK1/2 als auch Akt und GSK-3 $\beta$  in isolierten Kardiomyozyten bei Hypoxie-Reoxygenierung unterschiedlich und teilweise BK-abhängig reguliert werden. Die Aktivierung von ERK1/2 und Akt wurde in BK-defizienten und BK-WT Kardiomyozyten synchron reguliert. Die GSK-3 $\beta$  hingegen wurde in BK-KO Kardiomyozyten während der hier betrachteten Reoxygenierungszeit von 120 min kontinuierlich phosphoryliert und dadurch inaktiviert, während die Phosphorylierung der GSK-3 $\beta$  in BK-WT einer anderen Kinetik folgte. Die protektive Signaltransduktion über GSK-3 $\beta$  scheint in BK-WT Kardiomyozyten bereits nach kurzer Reoxygenierung abgeschlossen zu sein. Dies lässt auf eine mitoBK-vermittelte Regulation der GSK-3 $\beta$  schließen und könnte durch die Rekrutierung von Phosphatasen oder Kinasen erfolgen. Der genaue Mechanismus und die Verbindung zwischen mitoBK und GSK-3 $\beta$  bleibt zum jetzigen Zeitpunkt jedoch unklar.

Letztlich war es nicht möglich im Rahmen dieser Arbeit im isolierten Mitochondrien- und Zellsystem durch die hier durchgeführten Versuchsreihen die Rolle des mitoBKs als Effektormolekül des NO/cGMP/cGKI-Signalweges bei *in vitro* Hypoxie-Reoxygenierung eindeutig zu bestätigen. Es scheinen weitere (nicht)kardiale Strukturen bzw. Zelltypen, die *in vitro* bei der Analyse isolierter Kardiomyozyten bzw. isolierter kardialer Mitochondrien nicht berücksichtigt wurden für die *in vivo* beobachtete Kardioprotektion von Bedeutung zu sein<sup>355</sup>.

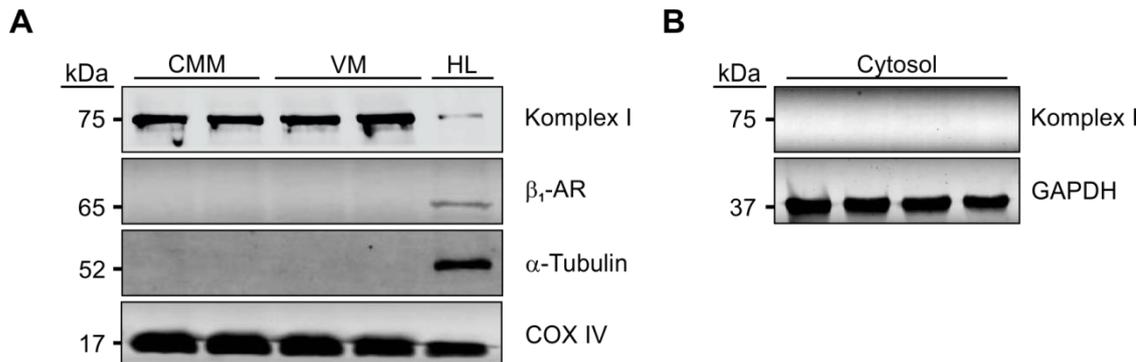
## 7 Anhang

### 7.1 Phäno- und Genotypisierung der Mauslinien

**Tabelle 7.1 Basale Herzgewichte der CMBK-CTR und CMBK-KO**

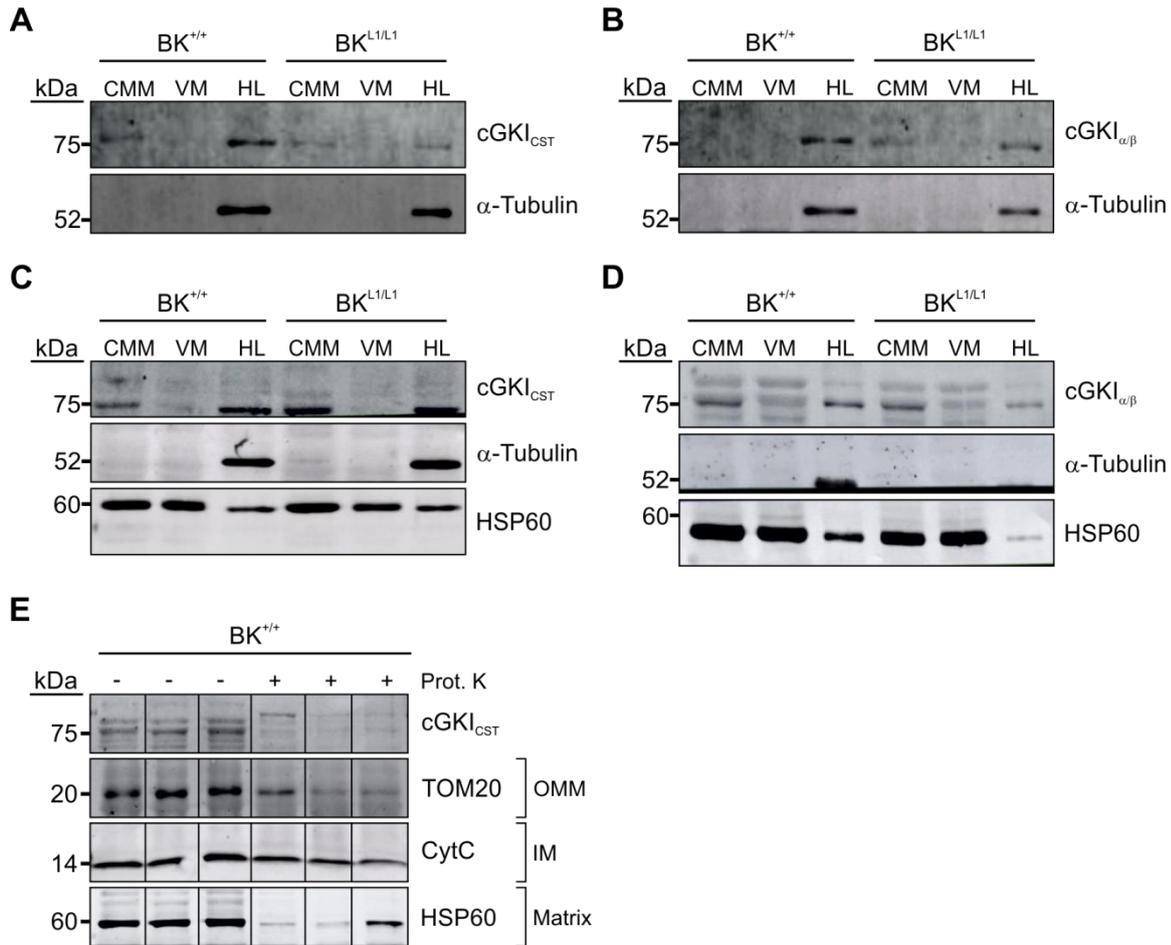
\*p<0,05; \*\*p<0,01 für CMBK<sup>L2/L1</sup> vs. CMBK<sup>L2/+</sup>

		Herzgewicht [mg]	Tibiallänge [mm]	Gewicht [g]	HG/TL [mg/mm]	HG/KG [mg/g]
♂	CMBK <sup>L2/+</sup> (n=7)	129,4 ± 7,11	17,02 ± 0,16	26,0 ± 1,12	7,59 ± 0,36	4,96 ± 0,11
	CMBK <sup>L2/L1</sup> (n=10)	142,2 ± 4,13	16,75 ± 0,17	27,7 ± 0,67	8,49 ± 0,23*	5,14 ± 0,12
♀	CMBK <sup>L2/+</sup> (n=18)	111,8 ± 2,02	16,69 ± 0,09	21,9 ± 0,28	6,70 ± 0,12	5,11 ± 0,07
	CMBK <sup>L2/L1</sup> (n=13)	117,1 ± 3,93	16,41 ± 0,12	21,9 ± 0,53	7,13 ± 0,22	5,53 ± 0,14
♂/♀	CMBK <sup>L2/+</sup> (n=23)	116,7 ± 2,81	16,78 ± 0,08	23,0 ± 0,52	6,95 ± 0,14	5,07 ± 0,06
	CMBK <sup>L2/L1</sup> (n=23)	127,5 ± 3,93*	16,59 ± 0,09	24,4 ± 0,75	7,67 ± 0,21**	5,25 ± 0,09



**Abbildung 7.1 Reinheit isolierter Mitochondrien**

(A) In den mitochondrialen Proteinlysaten konnten keine membranären und cytosolischen Verunreinigungen nachgewiesen werden. Immunreaktive Banden des membranständigen  $\beta_1$ -Adrenorezeptors ( $\beta_1$ -AR) und des  $\alpha$ -Tubulins wurden nur im Herzlysat (HL) nachgewiesen, während mitochondriale Lysate aus Kardiomyozyten (CMM) und Ventrikel (VM) negativ blieben. Komplex I und Cytochrom-C-Oxidase IV (COX IV), als mitochondriale Proteine, zeigten eine deutliche Anreicherung in den mitochondrialen Proteinlysaten. (B) In der cytosolischen Fraktion wurden basierend auf dem Nachweis von Komplex I keine mitochondrialen Verunreinigungen nachgewiesen. Durch die Identifizierung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde eine gleichmäßige Beladung der Proben bestätigt. Ein Protein-Marker wurde verwendet, um die Größen der jeweiligen Proteine (*nicht gezeigt*) zu schätzen.



### Abbildung 7.2 Weitere Western-Blot-Analysen zur cGKI-Lokalisation in Mitochondrien

Immunreaktive Banden der cGKI konnten sowohl im gesamten Herzlysat als auch in mitochondrialen Proteinfraktionen aus Kardiomyozyten (CMM) und Ventrikel (VM) in beiden Genotypen nachgewiesen werden. Dabei wurden spezifische cGKI Antikörpern (A) und (C) von Cell Signaling Technology (CST) und (B) und (D) von Prof. Hofmann, München verwendet (siehe 2.3.8).  $\alpha$ -Tubulin bestätigt die Reinheit der isolierten Mitochondrien. (E) Proteinase K (Prot. K) *Protection Assay* von BK-WT CMM. Das Ausmaß des Verdaus wurde durch den Nachweis wichtiger intra-mitochondrialer Proteine (TOM20, CytC, HSP60) bestimmt und impliziert eine Lokalisation der cGKI an der äußeren Mitochondrienmembran (OMM) an. HSP60: Hitzeschockprotein 60; CytC: Cytochrom C; IM: Intermembranraum; IMM: innere Mitochondrienmembran. Ein Protein-Marker wurde verwendet, um die Größen der jeweiligen Proteine zu schätzen (*nicht gezeigt*).

## 7.2 Charakteristiken der respiratorischen Messungen

**Tabelle 7.2 Proteinlevel von Komplex I, COX IV und Cytochrom C**

	Komplex I VM	Komplex I CMM	COX IV VM	Cytochrom C VM
BK <sup>+/+</sup>	1,02 ± 0,02	0,92 ± 0,01	BK <sup>+/+</sup>	1,15 ± 0,17
BK <sup>L1/L1</sup>	1,07 ± 0,02	0,84 ± 0,001	BK <sup>L1/L1</sup>	1,09 ± 0,16
CMBK <sup>L2/+</sup>	1,06 ± 0,10	1,16 ± 0,07		
CMBK <sup>L2/L1</sup>	1,25 ± 0,20	0,96 ± 0,03		

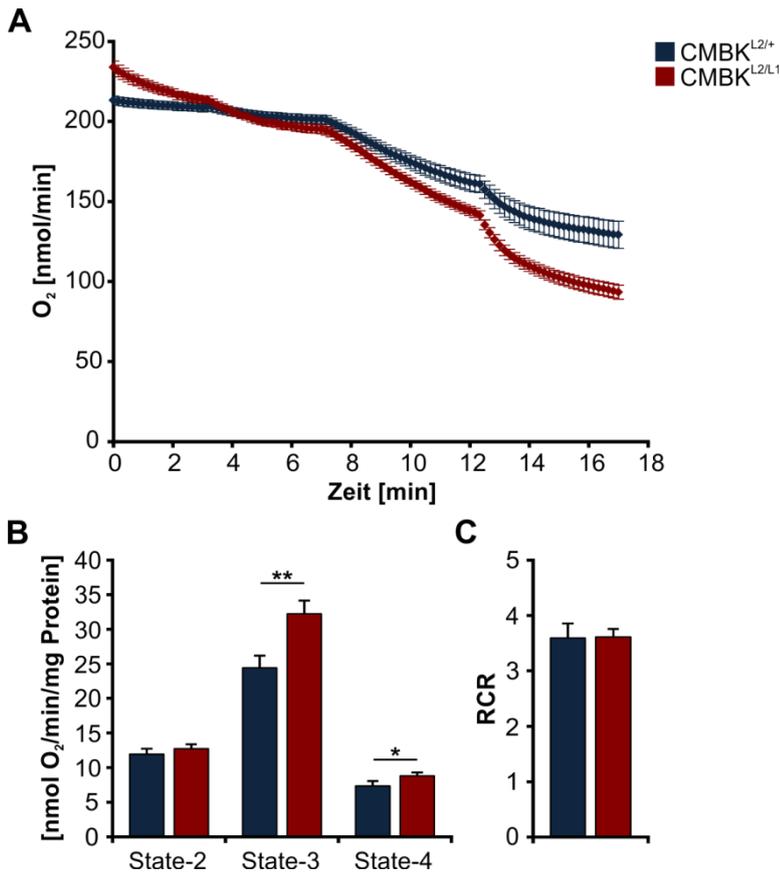
**Tabelle 7.3 Werte der respiratorischen VM-Messungen**

\*\*p<0,01 für BK<sup>L1/L1</sup> vs. BK<sup>+/+</sup>

	O <sub>2</sub> Verbrauch [nmol/min/mg Protein]			
	State-2	State-3	State-4	RCR
<b>Glutamat/Malat</b>				
BK <sup>+/+</sup>	18,48 ± 1,12	39,36 ± 9,15	18,70 ± 2,93	2,11 ± 0,24
BK <sup>L1/L1</sup>	20,85 ± 2,45	29,57 ± 3,92	21,60 ± 2,83	1,37 ± 0,05**
<b>Succinat</b>				
BK <sup>+/+</sup>	57,47 ± 7,51	143,64 ± 14,26	71,47 ± 9,92	2,14 ± 0,13
BK <sup>L1/L1</sup>	61,57 ± 9,13	135,09 ± 17,17	84,31 ± 11,20	1,62 ± 0,06**

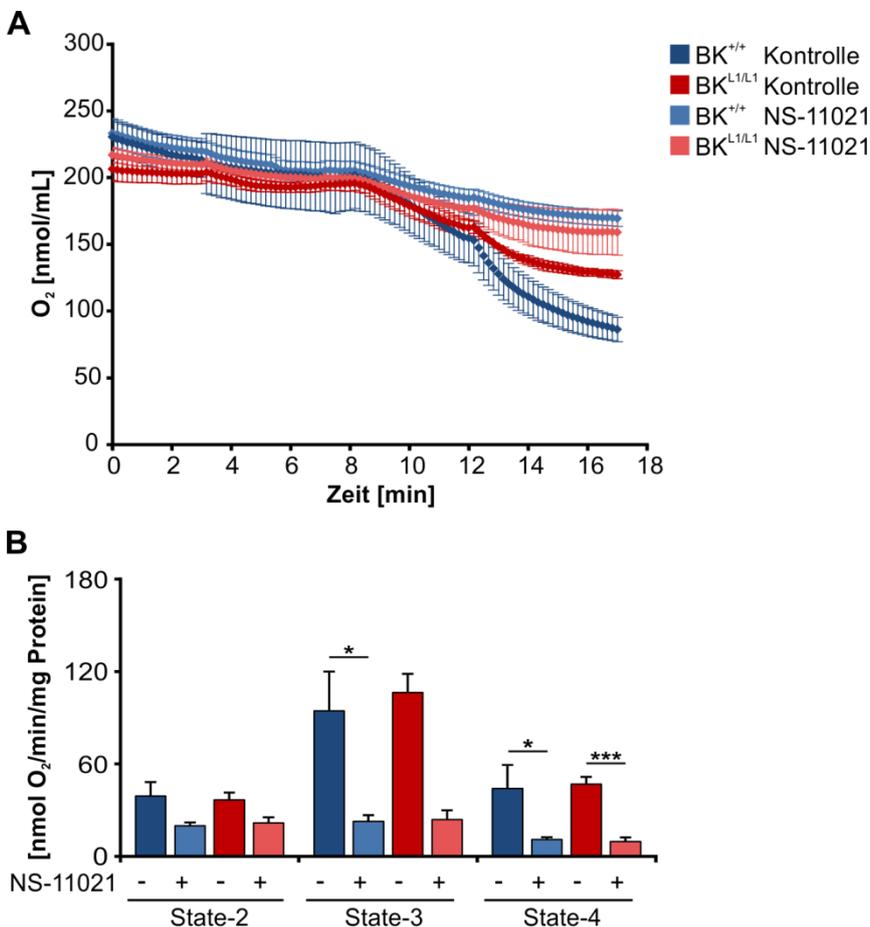
**Tabelle 7.4 Werte der respiratorischen CMM-Messungen**

	O <sub>2</sub> Verbrauch [nmol/min/mg Protein]			
	State-2	State-3	State-4	RCR
<b>Abbildung 4.8B und C (Collagenase II)</b>				
<b>Glutamat/Malat</b>				
BK <sup>+/+</sup>	17,49 ± 1,41	44,17 ± 2,84	23,75 ± 1,94	1,99 ± 0,19
BK <sup>L1/L1</sup>	56,00 ± 4,65	137,81 ± 11,29	64,38 ± 5,32	2,16 ± 0,13
<b>Succinat</b>				
BK <sup>+/+</sup>	18,07 ± 2,03	45,89 ± 4,02	23,54 ± 2,29	2,13 ± 0,29
BK <sup>L1/L1</sup>	58,10 ± 7,34	138,00 ± 14,9	70,93 ± 9,76	2,07 ± 0,23
<b>Abbildung 4.8E und F (Liberase DH)</b>				
<b>Succinat</b>				
BK <sup>+/+</sup>	12,36 ± 1,36	25,02 ± 3,66	7,84 ± 1,00	3,15 ± 0,19
BK <sup>L1/L1</sup>	11,88 ± 0,61	26,40 ± 1,28	8,11 ± 0,65	3,35 ± 0,22



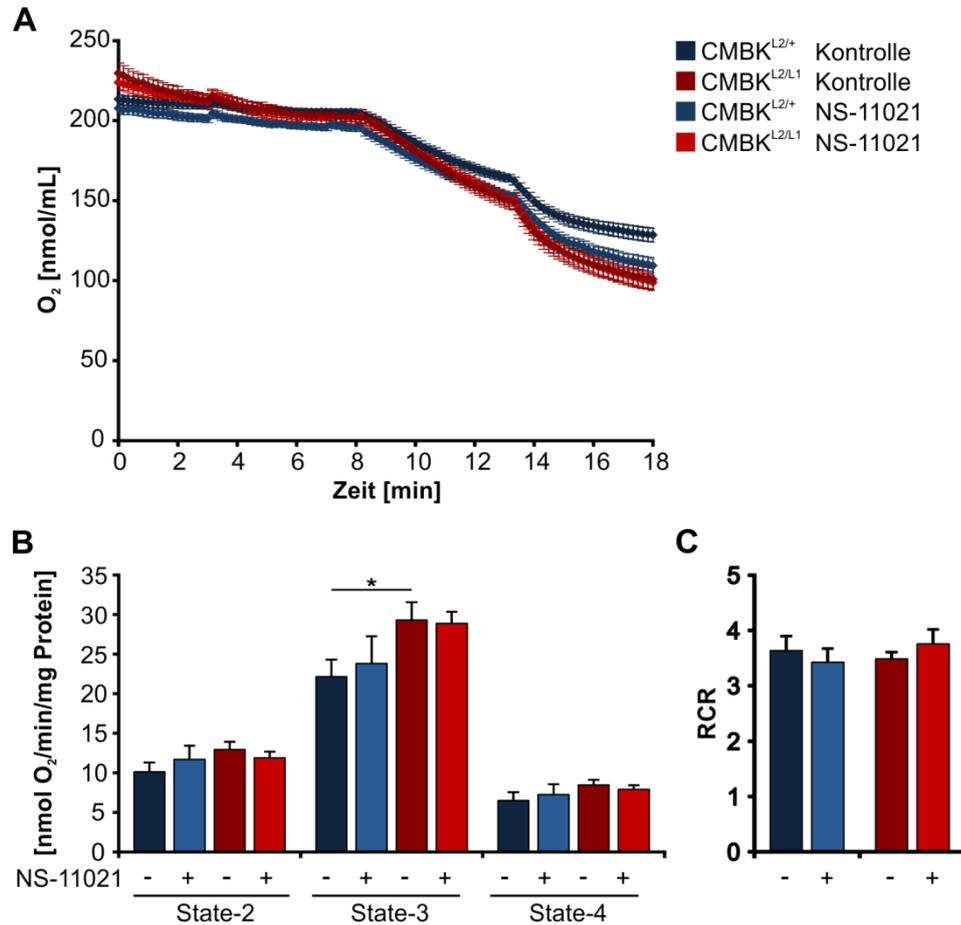
**Abbildung 7.3 Einfluss einer Kardiomyozyten-spezifischen BK-Deletion auf die Respiration von CMM**

(A) Sauerstoffverbrauch der mit Succinat-stimulierten Atmung von CMBK-CTR und CMBK-KO CMM. CMBK-CTR (BK<sup>L2/+</sup>) n=16, CMBK-KO (BK<sup>L2/L1</sup>) n=18. (B) Die ADP-stimulierte Atmung der CMBK-KO CMM war im Vergleich zu den CMBK-CTR CMM signifikant erhöht. (C) Der respiratorische Kontrollindex (RCR) ergab keinen Unterschied zwischen den Genotypen. CMBK-CTR (BK<sup>L2/+</sup>) n=19; CMBK-KO (BK<sup>L2/L1</sup>) n=20. Rauten und Balken repräsentieren Mittelwerte ± SEM; \*p<0,05; \*\*p<0,01.



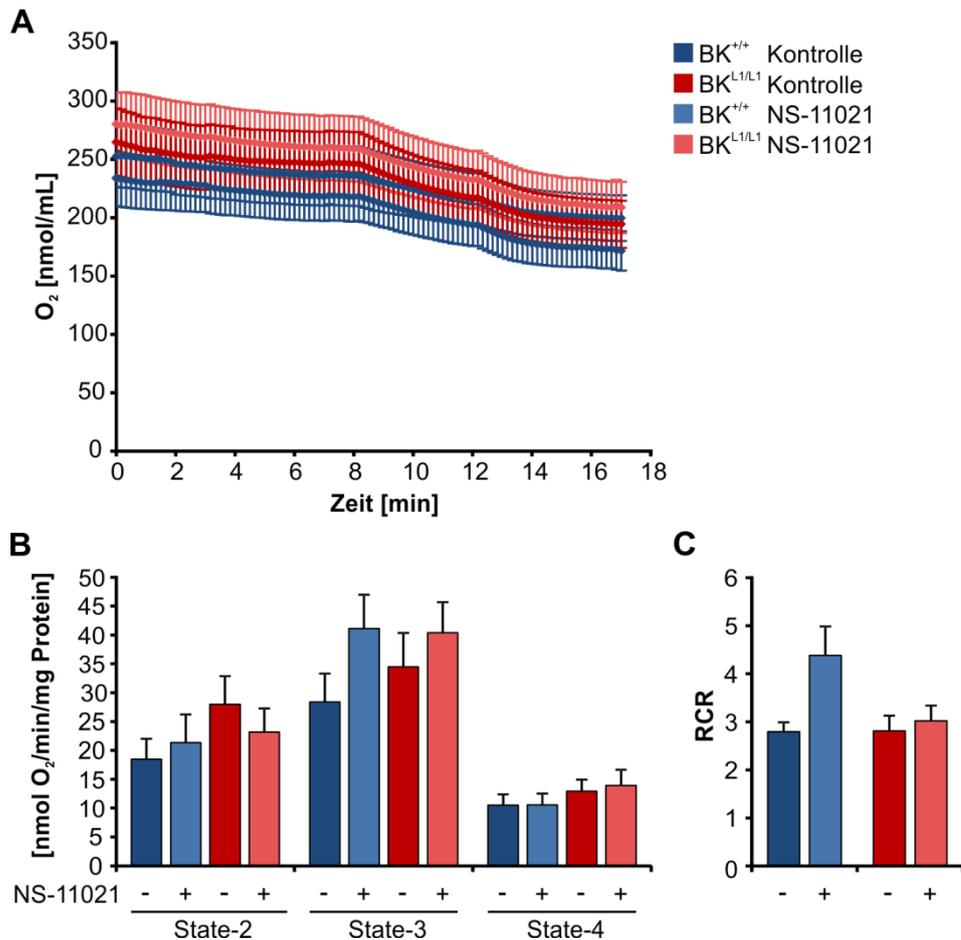
**Abbildung 7.4 Einfluss einer BK-Kanal-Öffnung mit 3 µM NS11021 auf die Respiration von CMM**

(A) Sauerstoffverbrauch von BK-WT und BK-KO CMM ± 3 µM NS11021. (B) Nach Stimulation mit 3 µM NS11021 war keine Steigerung des Sauerstoffverbrauchs durch Zugabe von ADP mehr möglich. Die State-3 und State-4 Atmung war unter NS11021 Stimulation signifikant niedriger. BK-WT (BK<sup>+/+</sup>): NS11021 n=5 und Kontrolle n=4; BK-KO (BK<sup>L1/L1</sup>): NS11021 n=5 und Kontrolle n=4. Rauten und Balken repräsentieren Mittelwerte ± SEM; \*p<0,05; \*\*\*p<0,001.



**Abbildung 7.5 Einfluss einer BK-Kanal Öffnung mit 300 nM NS11021 auf die Respiration von CMM aus CMBK-Tieren**

(A) Sauerstoffverbrauch von CMBK-CTR und CMBK-KO CMM  $\pm$  300 nM NS11021. (B) Die State-3 Atmung der unstimulierten CMBK-KO Messungen war signifikant höher als die State-3 Atmung der unstimulierten CMBK-CTR Messungen. Auch die mit NS11021 stimulierte State-3 Atmung des CMBK-KO zeigte eine Tendenz zu erhöhtem Sauerstoffverbrauch im Vergleich zur NS11021-stimulierten State-3 Atmung der CMBK-CTR. (C) Der respiratorische Kontrollindex (RCR) zeigte keinen Unterschied zwischen den Genotypen  $\pm$  300 nM NS11021. CMBK-CTR (BK<sup>L2/+</sup>): NS11021 n=7 und Kontrolle n=9; CMBK-KO (BK<sup>L2/L1</sup>): NS11021 n=12 und Kontrolle n=10. Rauten und Balken repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM; \*p<0,05.



**Abbildung 7.6 Einfluss einer BK-Kanal-Öffnung mit 150 nM NS11021 auf die Respiration von CMM aus BK-WT und BK-KO**

(A) Sauerstoffverbrauch von BK-WT und BK-KO CMM  $\pm$  150 nM NS11021. (B) Signifikante Unterschiede der mit NS11021-stimulierten Atmung waren nicht zu beobachten. (C) Der respiratorische Kontrollindex (RCR) zeigte in den mit NS11021-stimulierten Atmungen des BK-WT eine Tendenz zu höheren Werten im Vergleich zu den BK-WT Kontrollmessungen und zu den BK-KO  $\pm$  NS11021 Messungen. BK-WT (BK<sup>+/+</sup>): NS11021 n=9 und Kontrolle n=8; BK-KO (BK<sup>L1/L1</sup>): NS11021 n=9 und Kontrolle n=7.

**Tabelle 7.5 Werte der respiratorischen CMM-Messungen  $\pm$  NS11021**

\*\*p<0,01 für BK<sup>L1/L1</sup> vs. BK<sup>+/+</sup> CMM-Messung nach NS11021-Stimulation. #p<0,05; ###p<0,01 stimulierte Messungen vs. unstimulierte Messungen des entsprechenden Genotyps

	O <sub>2</sub> Verbrauch [nmol/min/mg Protein]			RCR
	State-2	State-3	State-4	
<b>Abbildung 4.10A – C (Collagenase II)</b>				
<b>Kontrolle</b>				
BK <sup>+/+</sup>	40,30 $\pm$ 7,64	103,00 $\pm$ 11,37	42,28 $\pm$ 3,48	2,42 $\pm$ 0,19
BK <sup>L1/L1</sup>	47,74 $\pm$ 4,9	96,72 $\pm$ 9,81	42,67 $\pm$ 3,59	2,25 $\pm$ 0,05
<b>NS11021 (300 nM)</b>				
BK <sup>+/+</sup>	48,77 $\pm$ 4,29 <sup>#</sup>	128,45 $\pm$ 17,25	54,41 $\pm$ 5,25	2,32 $\pm$ 0,11
BK <sup>L1/L1</sup>	53,31 $\pm$ 9,26	96,19 $\pm$ 12,16	51,85 $\pm$ 6,76	1,87 $\pm$ 0,06 <sup>**/###</sup>

	O <sub>2</sub> Verbrauch [nmol/min/mg Protein]			RCR
	State-2	State-3	State-4	

Abbildung 4.10D – F (Liberase DH)

Kontrolle				
BK <sup>+/+</sup>	11,95 ± 1,45	24,90 ± 4,12	7,66 ± 1,11	3,19 ± 0,21
BK <sup>L1/L1</sup>	12,72 ± 0,35	29,39 ± 0,78	9,02 ± 0,21	3,26 ± 0,01
NS11021 (300 nM)				
BK <sup>+/+</sup>	16,02 ± 2,27	30,07 ± 6,01	7,68 ± 1,61	3,93 ± 0,13
BK <sup>L1/L1</sup>	14,85 ± 0,57	29,57 ± 2,17	9,17 ± 0,77	3,29 ± 0,36

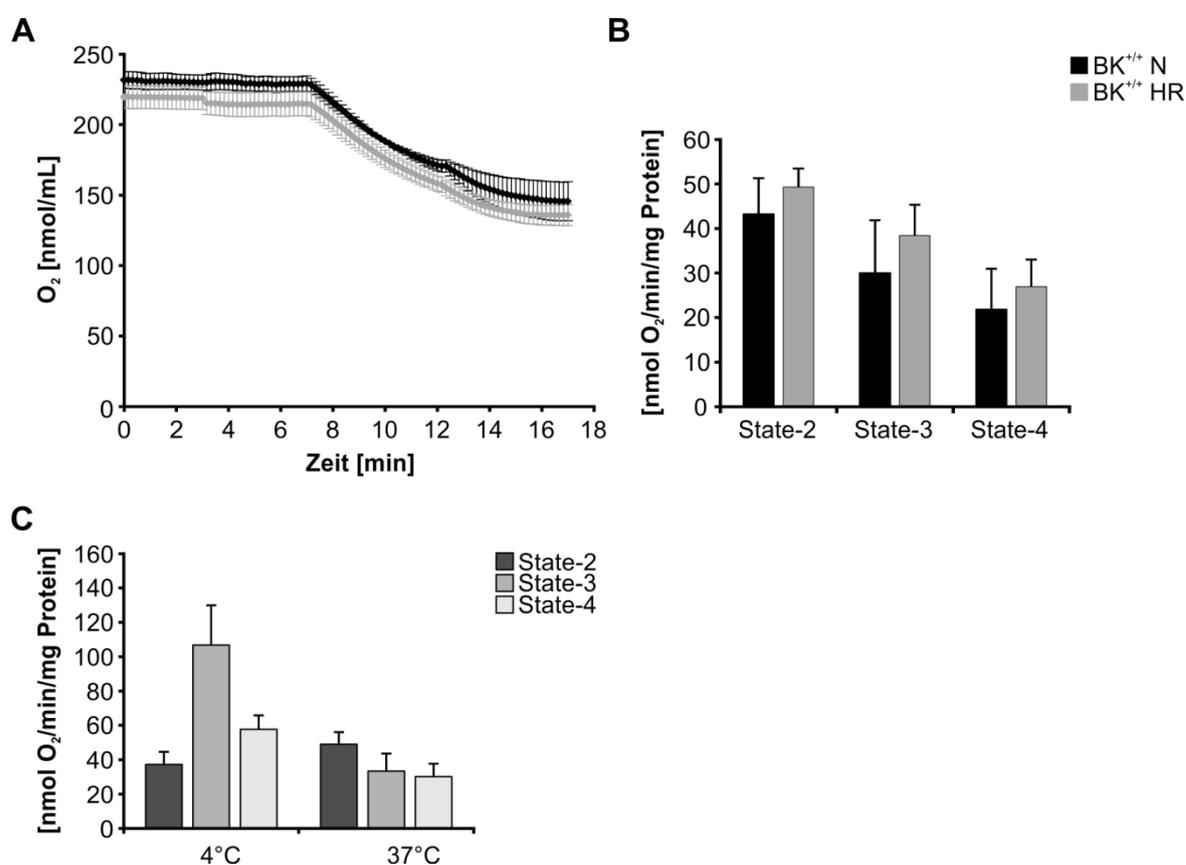
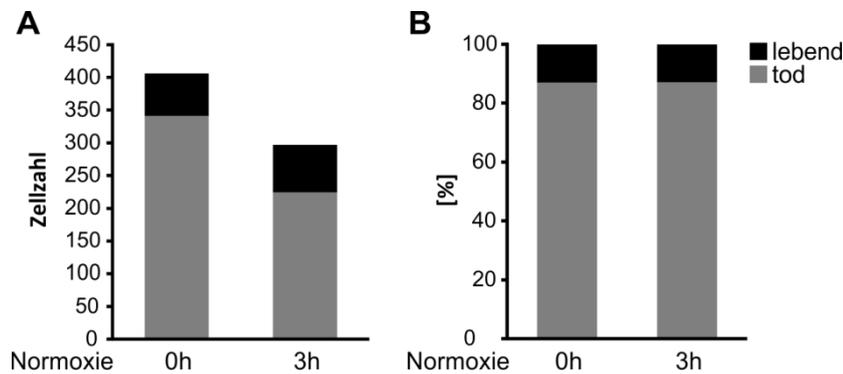


Abbildung 7.7 Mitochondriale Respiration nach Hypoxie-Reoxygenierung

(A) Sauerstoffverbrauch von BK-WT nach 45 min normoxischer Inkubation oder 15 min Hypoxie mit anschließender 30 min Reoxygenierung. (B) Nach sowohl normoxischer als auch hypoxischer Inkubation war kein gesteigerter Sauerstoffverbrauch durch ADP Zugabe möglich. (C) Bereits die Inkubation (30 min) bei 37°C schädigte die Mitochondrien irreversibel, sodass kein gesteigerter Sauerstoffverbrauch im State-3 möglich war. Im Gegensatz hierzu respiratorische Messungen der Mitochondrien nach Inkubation bei ca. 4°C.

### 7.3 Hypoxie-Reoxygenierung isolierter Kardiomyozyten



**Abbildung 7.8 Zellzahl und Überleben kultivierter Kardiomyozyten**

Die Kardiomyozyten lösten sich bei normoxischer Kultivierung von den Laminin-beschichteten Platten ab. (A) Nach 3 h normoxischer Inkubation führte der Mediumwechsel zu einer erheblicher Reduktion der Gesamtzellzahl, während (B) das Gesamtüberleben der Zellen unverändert blieb.

**Tabelle 7.6 LDH-Aktivitäten bei einer Stimulation mit 8-Br-cGMP**

N: LDH-Aktivität nach 90 min Normoxie; R<sub>N</sub>: LDH-Aktivität nach 120 min post-normoxischer Reoxygenierung; H: LDH-Aktivität nach 90 min Hypoxie; R<sub>H</sub>: LDH-Aktivität nach 120 min post-hypoxischer Reoxygenierung

\*p<0,05; \*\*p<0,01 H vs. N des entsprechenden Genotyps

	LDH-Aktivität [U/μg]			
	N	R <sub>N</sub>	H	R <sub>H</sub>
<b>Kontrolle</b>				
BK <sup>+/+</sup>	0,18 ± 0,04	0,30 ± 0,09	0,66 ± 0,09**	0,45 ± 0,06
BK <sup>L1/L1</sup>	0,18 ± 0,04	0,27 ± 0,02	0,79 ± 0,07**	0,59 ± 0,19
<b>8-Br-cGMP (100 μM)</b>				
BK <sup>+/+</sup>	0,22 ± 0,05	0,34 ± 0,13	0,67 ± 0,16*	0,41 ± 0,07
BK <sup>L1/L1</sup>	0,23 ± 0,05	0,33 ± 0,08	0,76 ± 0,09*	0,50 ± 0,11

**Tabelle 7.7 LDH-Aktivitäten bei einer Stimulation mit Cinaciguat**

N: LDH-Aktivität nach 90 min Normoxie; R<sub>N</sub>: LDH-Aktivität nach 120 min post-normoxischer Reoxygenierung; H: LDH-Aktivität nach 90 min Hypoxie; R<sub>H</sub>: LDH-Aktivität nach 120 min post-hypoxischer Reoxygenierung

\*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 H vs. N bzw. R<sub>H</sub> vs. R<sub>N</sub> des entsprechenden Genotyps

	LDH-Aktivität [U/μg]			
	N	R <sub>N</sub>	H	R <sub>H</sub>
<b>Kontrolle</b>				
BK <sup>+/+</sup>	0,18 ± 0,05	0,33 ± 0,07	0,55 ± 0,08**	0,41 ± 0,10
BK <sup>L1/L1</sup>	0,13 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,62 ± 0,06***	0,40 ± 0,05**
<b>Cinaciguat (25 nM)</b>				
BK <sup>+/+</sup>	0,17 ± 0,05	0,33 ± 0,07	0,49 ± 0,08**	0,38 ± 0,12
BK <sup>L1/L1</sup>	0,15 ± 0,02	0,23 ± 0,04	0,54 ± 0,05***	0,29 ± 0,04*

**Tabelle 7.8 LDH-Aktivitäten bei einer Stimulation mit NS11021**

N: LDH-Aktivität nach 90 min Normoxie; R<sub>N</sub>: LDH-Aktivität nach 120 min post-normoxischer Reoxygenierung; H: LDH-Aktivität nach 90 min Hypoxie; R<sub>H</sub>: LDH-Aktivität nach 120 min post-hypoxischer Reoxygenierung

\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 H vs. N, R<sub>H</sub> vs. R<sub>N</sub> bzw. HR vs. NR des entsprechenden Genotyps

	LDH-Aktivität [U/μg]					
	N	R <sub>N</sub>	NR	H	R <sub>H</sub>	HR

**Abbildung 4.16A****Kontrolle**

BK <sup>+/+</sup>	0,12 ± 0,01	0,18 ± 0,02	0,30 ± 0,03	0,52 ± 0,03 <sup>***</sup>	0,36 ± 0,08	0,88 ± 0,1 <sup>***</sup>
BK <sup>L1/L1</sup>	0,22 ± 0,027	0,26 ± 0,05	0,48 ± 0,11	0,74 ± 0,22 <sup>*</sup>	0,57 ± 0,27	1,30 ± 0,49

**NS11021 (300 nM)**

BK <sup>+/+</sup>	0,14 ± 0,01	0,18 ± 0,04	0,32 ± 0,05	0,45 ± 0,05 <sup>***</sup>	0,37 ± 0,08	0,82 ± 0,12
BK <sup>L1/L1</sup>	0,15 ± 0,06	0,21 ± 0,03	0,36 ± 0,08	0,76 ± 0,22 <sup>*</sup>	0,53 ± 0,23	1,28 ± 0,44 <sup>**</sup>

**Abbildung 4.16B****Kontrolle**

BK <sup>+/+</sup>	0,22 ± 0,03	0,36 ± 0,05	0,58 ± 0,04	0,69 ± 0,07 <sup>***</sup>	0,48 ± 0,08	1,17 ± 0,14 <sup>**</sup>
BK <sup>L1/L1</sup>	0,18 ± 0,005	0,41 ± 0,07	0,59 ± 0,07	0,71 ± 0,11 <sup>**</sup>	0,46 ± 0,07	1,12 ± 0,12 <sup>**</sup>

**NS11021 (30 nM)**

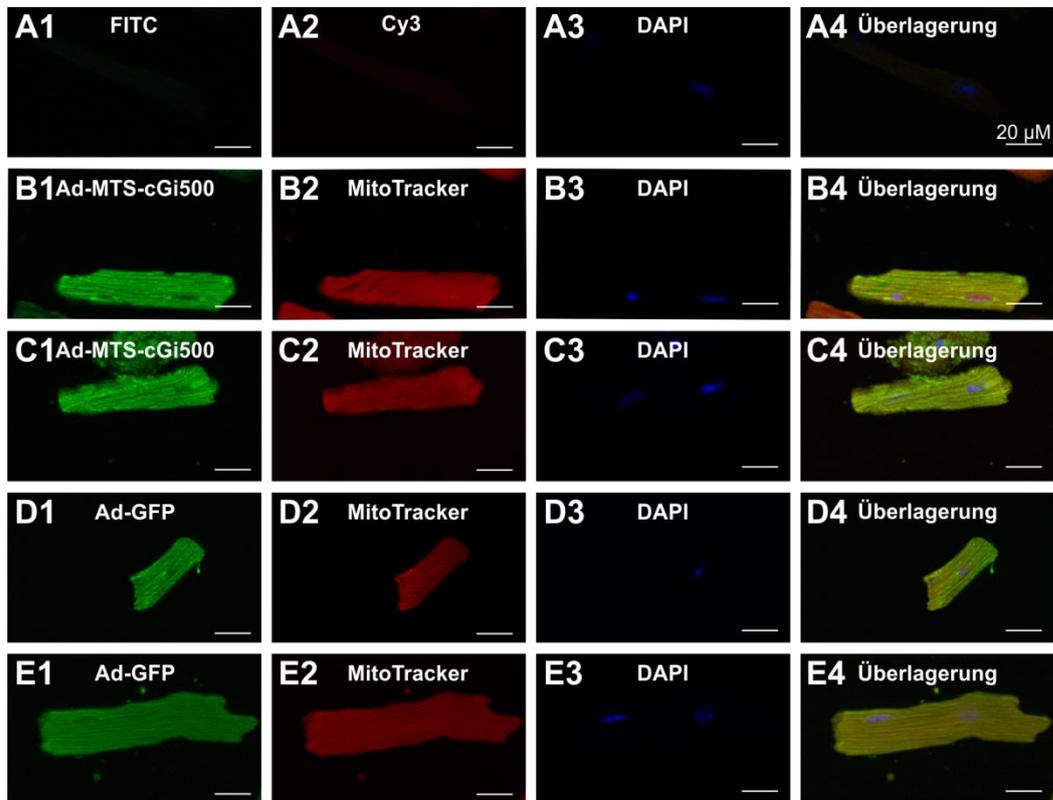
BK <sup>+/+</sup>	0,21 ± 0,04	0,23 ± 0,03	0,44 ± 0,08	0,76 ± 0,06 <sup>**</sup>	0,43 ± 0,06	1,19 ± 0,12 <sup>**</sup>
BK <sup>L1/L1</sup>	0,15 ± 0,02	0,23 ± 0,03	0,38 ± 0,05	0,63 ± 0,09 <sup>**</sup>	0,45 ± 0,07 <sup>*</sup>	1,09 ± 0,13 <sup>**</sup>

**Tabelle 7.9 Phosphorylierungsstatus wichtiger Kinasen des RISK-Signalweges**

\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 im Vergleich zu 90H/0R des entsprechenden Genotyps. #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 für BK<sup>L1/L1</sup> vs. BK<sup>+/+</sup>. §p<0,05; §§p<0,01; §§§p<0,001 im Vergleich zu 90H/90R des entsprechenden Genotyps.

	Reoxygenierung (min)			
	0	5	30	90
<b>p-ERK1/2 / ERK1/2</b>				
BK <sup>+/+</sup>	0,66 ± 0,01	1,42 ± 0,21 <sup>*/§§</sup>	0,94 ± 0,14 <sup>§</sup>	0,42 ± 0,23
BK <sup>L1/L1</sup>	0,20 ± 0,03 <sup>###</sup>	1,91 ± 0,43 <sup>*/§</sup>	1,27 ± 0,29 <sup>**/§</sup>	0,38 ± 0,08
<b>p-Akt / Akt</b>				
BK <sup>+/+</sup>	0,47 ± 0,06	0,95 ± 0,19	1,23 ± 0,32	1,43 ± 0,3 <sup>*</sup>
BK <sup>L1/L1</sup>	0,32 ± 0,13	1,28 ± 0,13 <sup>**</sup>	1,35 ± 0,19 <sup>*</sup>	1,73 ± 0,36 <sup>*</sup>
<b>p-GSK-3β / GSK-3β</b>				
BK <sup>+/+</sup>	0,37 ± 0,09	1,60 ± 0,48	0,68 ± 0,16	0,91 ± 0,15 <sup>*</sup>
BK <sup>L1/L1</sup>	0,56 ± 0,19	1,03 ± 0,24 <sup>§</sup>	1,29 ± 0,13 <sup>*/##/§</sup>	2,06 ± 0,19 <sup>**/##</sup>

## 7.4 Adenovirale Transduktion



**Abbildung 7.9 Repräsentative Bilder der adenoviralen Transduktion isolierter adulter Kardiomyozyten** (A1 – A4) Negativkontrolle ohne Transduktion und MitoTracker -Färbung. (B1 – B4 und C1 – C4) Transduktion mit Ad-CMV-MTS-cGi500 sowie MitoTracker und parallel durchgeführte Kernfärbung mit DAPI. (D1 – D4 und E1 – E4) Transduktion mit Ad-CMV-GFP sowie MitoTracker und parallel durchgeführte Kernfärbung mit DAPI.

## 8 Literaturverzeichnis

- 1 Mozaffarian, D. *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 133, e38-360, (2016).
- 2 Lowel, H. & Meisinger, C. [Epidemiology and demographic evolution exemplified for cardiovascular diseases in Germany]. *Med Klin (Munich)* 101, 804-811, (2006).
- 3 Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, H.-u. K. [Presstext DGK 01/2017.], Deutscher Herzbericht 2016: Behandlung von koronaren Herzkrankheiten ist Erfolgsgeschichte der modernen Herz-Medizin, (2017).
- 4 Piper, H. M., Meuter, K. & Schafer, C. Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. *The Annals of thoracic surgery* 75, S644-648, (2003).
- 5 Jennings, R. B., Sommers, H. M., Smyth, G. A., Flack, H. A. & Linn, H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol* 70, 68-78, (1960).
- 6 Zeymer, U. *et al.* [Treatment of ST-segment elevation acute myocardial infarction in hospitals with and without cardiac catheterization laboratory]. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 138, 1935-1940, (2013).
- 7 Task Force on the management of, S. T. s. e. a. m. i. o. t. E. S. o. C. *et al.* ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Heart J* 33, 2569-2619, (2012).
- 8 Schaper, J., Meiser, E. & Stammler, G. Ultrastructural morphometric analysis of myocardium from dogs, rats, hamsters, mice, and from human hearts. *Circulation research* 56, 377-391, (1985).
- 9 Harris, D. A. & Das, A. M. Control of mitochondrial ATP synthesis in the heart. *Biochem J* 280 ( Pt 3), 561-573, (1991).
- 10 Duchen, M. R. Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signalling and cell death. *The Journal of physiology* 516 ( Pt 1), 1-17, (1999).
- 11 Gunter, K. K. & Gunter, T. E. Transport of calcium by mitochondria. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 26, 471-485, (1994).
- 12 Bernardi, P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* 79, 1127-1155, (1999).
- 13 Szabo, I. & Zoratti, M. Mitochondrial channels: ion fluxes and more. *Physiol Rev* 94, 519-608, (2014).
- 14 Neupert, W. Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem* 66, 863-917, (1997).
- 15 Neely, J. R., Rovetto, M. J. & Oram, J. F. Myocardial utilization of carbohydrate and lipids. *Progress in cardiovascular diseases* 15, 289-329, (1972).
- 16 Neely, J. R. & Morgan, H. E. Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. *Annual review of physiology* 36, 413-459, (1974).
- 17 Giordano, F. J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest* 115, 500-508, (2005).
- 18 Pike, M. M. *et al.* NMR measurements of Na<sup>+</sup> and cellular energy in ischemic rat heart: role of Na<sup>(+)</sup>-H<sup>+</sup> exchange. *The American journal of physiology* 265, H2017-2026, (1993).
- 19 Murphy, E., Perlman, M., London, R. E. & Steenbergen, C. Amiloride delays the ischemia-induced rise in cytosolic free calcium. *Circulation research* 68, 1250-1258, (1991).
- 20 Frelin, C., Vigne, P. & Lazdunski, M. The role of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange system in the regulation of the internal pH in cultured cardiac cells. *European journal of biochemistry / FEBS* 149, 1-4, (1985).

- 21 Piper, H. M. & Das, A. Detrimental actions of endogenous fatty acids and their derivatives. A study of ischaemic mitochondrial injury. *Basic Res Cardiol* 82 Suppl 1, 187-196, (1987).
- 22 Kupriyanov, V. V., Yang, L. & Deslauriers, R. Cytoplasmic phosphates in Na(+)-K+ balance in KCN-poisoned rat heart: a <sup>87</sup>Rb-, <sup>23</sup>Na-, and <sup>31</sup>P-NMR study. *The American journal of physiology* 270, H1303-1311, (1996).
- 23 Griffiths, E. J. *et al.* Mitochondrial calcium transporting pathways during hypoxia and reoxygenation in single rat cardiomyocytes. *Cardiovascular research* 39, 423-433, (1998).
- 24 Murata, M., Akao, M., O'Rourke, B. & Marban, E. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca(2+) overload during simulated ischemia and reperfusion: possible mechanism of cardioprotection. *Circulation research* 89, 891-898, (2001).
- 25 Imahashi, K. *et al.* Cardiac-specific ablation of the Na+-Ca<sup>2+</sup> exchanger confers protection against ischemia/reperfusion injury. *Circulation research* 97, 916-921, (2005).
- 26 Steenbergen, C., Murphy, E., Watts, J. A. & London, R. E. Correlation between cytosolic free calcium, contracture, ATP, and irreversible ischemic injury in perfused rat heart. *Circulation research* 66, 135-146, (1990).
- 27 Grover, G. J. *et al.* Excessive ATP hydrolysis in ischemic myocardium by mitochondrial F1F0-ATPase: effect of selective pharmacological inhibition of mitochondrial ATPase hydrolase activity. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 287, H1747-1755, (2004).
- 28 Jennings, R. B., Reimer, K. A. & Steenbergen, C. Effect of inhibition of the mitochondrial ATPase on net myocardial ATP in total ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 23, 1383-1395, (1991).
- 29 Chen, Q., Moghaddas, S., Hoppel, C. L. & Lesnefsky, E. J. Ischemic defects in the electron transport chain increase the production of reactive oxygen species from isolated rat heart mitochondria. *American journal of physiology. Cell physiology* 294, C460-466, (2008).
- 30 Rouslin, W. Mitochondrial complexes I, II, III, IV, and V in myocardial ischemia and autolysis. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 244, H743-H748, (1983).
- 31 Ferdinandy, P., Schulz, R. & Baxter, G. F. Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol Rev* 59, 418-458, (2007).
- 32 Sanada, S., Komuro, I. & Kitakaze, M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 301, H1723-1741, (2011).
- 33 Piper, H. M. *et al.* The role of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in ischemia-reperfusion. *Basic Res Cardiol* 91, 191-202, (1996).
- 34 Schafer, C. *et al.* Role of the reverse mode of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. *Cardiovascular research* 51, 241-250, (2001).
- 35 Inserte, J. *et al.* Effect of inhibition of Na(+)/Ca(2+) exchanger at the time of myocardial reperfusion on hypercontracture and cell death. *Cardiovascular research* 55, 739-748, (2002).
- 36 du Toit, E. F. & Opie, L. H. Inhibitors of Ca<sup>2+</sup> ATPase pump of sarcoplasmic reticulum attenuate reperfusion stunning in isolated rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 24, 678-684, (1994).
- 37 Kalogeris, T., Bao, Y. & Korthuis, R. J. Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox Biol* 2, 702-714, (2014).
- 38 Ruiz-Meana, M., Garcia-Dorado, D., Miro-Casas, E., Abellan, A. & Soler-Soler, J. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake during simulated ischemia does not affect permeability transition pore opening upon simulated reperfusion. *Cardiovascular research* 71, 715-724, (2006).
- 39 Dixon, L. J. *et al.* Functional consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling in congestive cardiac failure. *Circulation* 107, 1725-1728, (2003).

- 40 Yang, K.-C., Kyle, J. W., Makielski, J. C. & Dudley, S. C. Mechanisms of Sudden Cardiac Death: Oxidants and Metabolism. *Circulation research* 116, 1937-1955, (2015).
- 41 Stadtman, E. R. & Levine, R. L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25, 207-218, (2003).
- 42 Richter, C., Park, J. W. & Ames, B. N. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85, 6465-6467, (1988).
- 43 Castilho, R. F., Kowaltowski, A. J., Meinicke, A. R. & Vercesi, A. E. Oxidative damage of mitochondria induced by Fe(II)citrate or t-butyl hydroperoxide in the presence of Ca<sup>2+</sup>: effect of coenzyme Q redox state. *Free Radic Biol Med* 18, 55-59, (1995).
- 44 Marnett, L. J. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21, 361-370, (2000).
- 45 Turrens, J. F. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* 17, 3-8, (1997).
- 46 Gnaiger, E. & Kuznetsov, A. V. Mitochondrial respiration at low levels of oxygen and cytochrome c. *Biochem Soc Trans* 30, 252-258, (2002).
- 47 Kussmaul, L. & Hirst, J. The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 7607-7612, (2006).
- 48 Borek, A., Sarewicz, M. & Osyczka, A. Movement of the iron-sulfur head domain of cytochrome bc(1) transiently opens the catalytic Q(o) site for reaction with oxygen. *Biochemistry* 47, 12365-12370, (2008).
- 49 Radi, R. *et al.* Detection of catalase in rat heart mitochondria. *The Journal of biological chemistry* 266, 22028-22034, (1991).
- 50 Simmons, T. W. & Jamall, I. S. Relative importance of intracellular glutathione peroxidase and catalase in vivo for prevention of peroxidation to the heart. *Cardiovascular research* 23, 774-779, (1989).
- 51 Garlick, P. B., Davies, M. J., Hearse, D. J. & Slater, T. F. Direct detection of free radicals in the reperfused rat heart using electron spin resonance spectroscopy. *Circulation research* 61, 757-760, (1987).
- 52 Lesnefsky, E. J. *et al.* Blockade of electron transport during ischemia protects cardiac mitochondria. *The Journal of biological chemistry* 279, 47961-47967, (2004).
- 53 Chouchani, E. T. *et al.* Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature* 515, 431-435, (2014).
- 54 Pell, V. R., Chouchani, E. T., Murphy, M. P., Brookes, P. S. & Krieg, T. Moving Forwards by Blocking Back-Flow: The Yin and Yang of MI Therapy. *Circulation research* 118, 898-906, (2016).
- 55 Chouchani, E. T. *et al.* A Unifying Mechanism for Mitochondrial Superoxide Production during Ischemia-Reperfusion Injury. *Cell Metab* 23, 254-263, (2016).
- 56 Haworth, R. A. & Hunter, D. R. The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca<sup>2+</sup> trigger site. *Arch Biochem Biophys* 195, 460-467, (1979).
- 57 Hausenloy, D. J., Duchon, M. R. & Yellon, D. M. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovascular research* 60, 617-625, (2003).
- 58 Halestrap, A. P., McStay, G. P. & Clarke, S. J. The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* 84, 153-166, (2002).
- 59 Chappell, J. B. & Crofts, A. R. Calcium Ion Accumulation and Volume Changes of Isolated Liver Mitochondria. Calcium Ion-Induced Swelling. *Biochem J* 95, 378-386, (1965).
- 60 Halestrap, A. P. & Davidson, A. M. Inhibition of Ca<sup>2+</sup>-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to

- mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochemical Journal* 268, 153-160, (1990).
- 61 Szabo, I. & Zoratti, M. The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. I. Binary structure and voltage dependence of the pore. *FEBS Lett* 330, 201-205, (1993).
- 62 Crompton, M., Ellinger, H. & Costi, A. Inhibition by cyclosporin A of a Ca<sup>2+</sup>-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem J* 255, 357-360, (1988).
- 63 Shimizu, S., Matsuoka, Y., Shinohara, Y., Yoneda, Y. & Tsujimoto, Y. Essential role of voltage-dependent anion channel in various forms of apoptosis in mammalian cells. *J Cell Biol* 152, 237-250, (2001).
- 64 Griffiths, E. J. & Halestrap, A. P. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochemical Journal* 307, 93-98, (1995).
- 65 Brenner, C. *et al.* Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator. *Oncogene* 19, 329-336, (2000).
- 66 Marzo, I. *et al.* Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 281, 2027-2031, (1998).
- 67 Antonsson, B. *et al.* Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* 277, 370-372, (1997).
- 68 Sun, J., Steenbergen, C. & Murphy, E. S-nitrosylation: NO-related redox signaling to protect against oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 8, 1693-1705, (2006).
- 69 Bonfoco, E., Krainc, D., Ankarcona, M., Nicotera, P. & Lipton, S. A. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 7162-7166, (1995).
- 70 Fliss, H. & Gattinger, D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circulation research* 79, 949-956, (1996).
- 71 Whelan, R. S., Kaplinskiy, V. & Kitsis, R. N. Cell Death in the Pathogenesis of Heart Disease: Mechanisms and Significance. *Annual review of physiology* 72, 19-44, (2010).
- 72 Trump, B. F. & Berezesky, I. K. Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J* 9, 219-228, (1995).
- 73 Prasad, M. R. *et al.* Role of phospholipases A2 and C in myocardial ischemic reperfusion injury. *The American journal of physiology* 260, H877-883, (1991).
- 74 Di Lisa, F. & Bernardi, P. Mitochondrial function as a determinant of recovery or death in cell response to injury. *Molecular and Cellular Biochemistry* 184, 379-391, (1998).
- 75 Crompton, M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 341 ( Pt 2), 233-249, (1999).
- 76 Halestrap, A. P., Clarke, S. J. & Javadov, S. A. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovascular research* 61, 372-385, (2004).
- 77 Thornberry, N. A. & Lazebnik, Y. Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316, (1998).
- 78 Sanghavi, D. M., Thelen, M., Thornberry, N. A., Casciola-Rosen, L. & Rosen, A. Caspase-mediated proteolysis during apoptosis: insights from apoptotic neutrophils. *FEBS Lett* 422, 179-184, (1998).
- 79 Li, P. *et al.* Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489, (1997).
- 80 Bratton, S. B. *et al.* Recruitment, activation and retention of caspases-9 and-3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. *EMBO Journal* 20, 998-1009, (2001).

- 81 Li, L. Y., Luo, X. & Wang, X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95-99, (2001).
- 82 Wang, X., Yang, C., Chai, J., Shi, Y. & Xue, D. Mechanisms of AIF-Mediated Apoptotic DNA Degradation in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 298, 1587-1592, (2002).
- 83 Yang, Q. H., Church-Hajduk, R., Ren, J., Newton, M. L. & Du, C. Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes Dev* 17, 1487-1496, (2003).
- 84 Magnusson, C. & Vaux, D. L. Signalling by CD95 and TNF receptors: not only life and death. *Immunol Cell Biol* 77, 41-46, (1999).
- 85 Takemura, G. *et al.* Characterization of ultrastructure and its relation with DNA fragmentation in Fas-induced apoptosis of cultured cardiac myocytes. *The Journal of pathology* 193, 546-556, (2001).
- 86 Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S. & Dixit, V. M. An induced proximity model for caspase-8 activation. *The Journal of biological chemistry* 273, 2926-2930, (1998).
- 87 Baines, C. P. & Molkenstein, J. D. STRESS signaling pathways that modulate cardiac myocyte apoptosis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 38, 47-62, (2005).
- 88 Adams, J. M. & Cory, S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci* 26, 61-66, (2001).
- 89 van Delft, M. F. & Huang, D. C. How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis. *Cell research* 16, 203-213, (2006).
- 90 Basañez, G. *et al.* Bax, but not Bcl-xL, decreases the lifetime of planar phospholipid bilayer membranes at subnanomolar concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 5492-5497, (1999).
- 91 Antonsson, B. *et al.* Inhibition of Bax Channel-Forming Activity by Bcl-2. *Science* 277, 370-372, (1997).
- 92 Shimizu, S., Konishi, A., Kodama, T. & Tsujimoto, Y. BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 3100-3105, (2000).
- 93 Chen, Z., Chua, C. C., Ho, Y. S., Hamdy, R. C. & Chua, B. H. Overexpression of Bcl-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial I/R injury in transgenic mice. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 280, H2313-2320, (2001).
- 94 Kang, P. M., Haunstetter, A., Aoki, H., Usheva, A. & Izumo, S. Morphological and molecular characterization of adult cardiomyocyte apoptosis during hypoxia and reoxygenation. *Circulation research* 87, 118-125, (2000).
- 95 Omura, T. *et al.* Activation of mitogen-activated protein kinases in in vivo ischemia/reperfused myocardium in rats. *J Mol Cell Cardiol* 31, 1269-1279, (1999).
- 96 Yue, T. L. *et al.* Inhibition of extracellular signal-regulated kinase enhances Ischemia/Reoxygenation-induced apoptosis in cultured cardiac myocytes and exaggerates reperfusion injury in isolated perfused heart. *Circulation research* 86, 692-699, (2000).
- 97 Mockridge, J. W., Marber, M. S. & Heads, R. J. Activation of Akt during simulated ischemia/reperfusion in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 270, 947-952, (2000).
- 98 Matsui, T. *et al.* Phenotypic spectrum caused by transgenic overexpression of activated Akt in the heart. *The Journal of biological chemistry* 277, 22896-22901, (2002).
- 99 Cuevas, B. D., Abell, A. N. & Johnson, G. L. Role of mitogen-activated protein kinase kinase kinases in signal integration. *Oncogene* 26, 3159-3171, (2007).

- 100 Cheng, J. Q. *et al.* AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 9267-9271, (1992).
- 101 Brodbeck, D., Cron, P. & Hemmings, B. A. A human protein kinase Bgamma with regulatory phosphorylation sites in the activation loop and in the C-terminal hydrophobic domain. *The Journal of biological chemistry* 274, 9133-9136, (1999).
- 102 Alessi, D. R. *et al.* Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *The EMBO Journal* 15, 6541-6551, (1996).
- 103 Thomas, C. C., Deak, M., Alessi, D. R. & van Aalten, D. M. High-resolution structure of the pleckstrin homology domain of protein kinase b/akt bound to phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate. *Current biology : CB* 12, 1256-1262, (2002).
- 104 Cross, T. G. *et al.* Serine/threonine protein kinases and apoptosis. *Experimental cell research* 256, 34-41, (2000).
- 105 Datta, S. R. *et al.* Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241, (1997).
- 106 Harada, H., Andersen, J. S., Mann, M., Terada, N. & Korsmeyer, S. J. p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 9666-9670, (2001).
- 107 Tsuruta, F., Masuyama, N. & Gotoh, Y. The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt pathway suppresses Bax translocation to mitochondria. *The Journal of biological chemistry* 277, 14040-14047, (2002).
- 108 Yamaguchi, H. & Wang, H. G. The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change. *Oncogene* 20, 7779-7786, (2001).
- 109 Cardone, M. H. *et al.* Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282, 1318-1321, (1998).
- 110 Terada, K., Kaziro, Y. & Satoh, T. Analysis of Ras-dependent signals that prevent caspase-3 activation and apoptosis induced by cytokine deprivation in hematopoietic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 267, 449-455, (2000).
- 111 Dimmeler, S. *et al.* Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399, 601-605, (1999).
- 112 Krieg, T. *et al.* Acetylcholine and bradykinin trigger preconditioning in the heart through a pathway that includes Akt and NOS. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 287, H2606-2611, (2004).
- 113 Balakirev, M., Khramtsov, V. V. & Zimmer, G. Modulation of the mitochondrial permeability transition by nitric oxide. *European journal of biochemistry / FEBS* 246, 710-718, (1997).
- 114 Yellon, D. M. & Downey, J. M. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev* 83, 1113-1151, (2003).
- 115 Oldenburg, O. *et al.* Bradykinin induces mitochondrial ROS generation via NO, cGMP, PKG, and mitoKATP channel opening and leads to cardioprotection. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 286, H468-476, (2004).
- 116 Costa, A. D. & Garlid, K. D. Intramitochondrial signaling: interactions among mitoKATP, PKCepsilon, ROS, and MPT. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 295, H874-882, (2008).
- 117 Costa, A. D. *et al.* The direct physiological effects of mitoK(ATP) opening on heart mitochondria. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 290, H406-415, (2006).
- 118 Korichneva, I., Hoyos, B., Chua, R., Levi, E. & Hammerling, U. Zinc release from protein kinase C as the common event during activation by lipid second messenger or reactive oxygen. *The Journal of biological chemistry* 277, 44327-44331, (2002).

- 119 Cohen, M. V., Yang, X. M., Liu, G. S., Heusch, G. & Downey, J. M. Acetylcholine, bradykinin, opioids, and phenylephrine, but not adenosine, trigger preconditioning by generating free radicals and opening mitochondrial K(ATP) channels. *Circulation research* 89, 273-278, (2001).
- 120 Quintana, F. J., Pitashny, M. & Cohen, I. R. Experimental autoimmune myasthenia gravis in naive non-obese diabetic (NOD/LtJ) mice: susceptibility associated with natural IgG antibodies to the acetylcholine receptor. *International immunology* 15, 11-16, (2003).
- 121 Le Good, J. A. *et al.* Protein kinase C isoforms controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* 281, 2042-2045, (1998).
- 122 Bijur, G. N. & Jope, R. S. Glycogen synthase kinase-3 beta is highly activated in nuclei and mitochondria. *Neuroreport* 14, 2415-2419, (2003).
- 123 Cohen, P. & Frame, S. The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 769-776, (2001).
- 124 Cross, D. A. E., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M. & Hemmings, B. A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785-789, (1995).
- 125 Stambolic, V. & Woodgett, J. R. Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta in intact cells via serine 9 phosphorylation. *Biochemical Journal* 303, 701-704, (1994).
- 126 Juhaszova, M. *et al.* Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest* 113, 1535-1549, (2004).
- 127 Kane, L. P., Shapiro, V. S., Stokoe, D. & Weiss, A. Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Current biology : CB* 9, 601-604, (1999).
- 128 Barkett, M. & Gilmore, T. D. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18, 6910-6924, (1999).
- 129 Hausenloy, D. J. & Yellon, D. M. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovascular research* 61, 448-460, (2004).
- 130 Murry, C. E., Jennings, R. B. & Reimer, K. A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74, 1124-1136, (1986).
- 131 Schulz, R., Rose, J., Post, H. & Heusch, G. Involvement of endogenous adenosine in ischaemic preconditioning in swine. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 430, 273-282, (1995).
- 132 Gross, E. R., Hsu, A. K. & Gross, G. J. Opioid-induced cardioprotection occurs via glycogen synthase kinase beta inhibition during reperfusion in intact rat hearts. *Circulation research* 94, 960-966, (2004).
- 133 Penna, C., Mancardi, D., Tullio, F. & Pagliaro, P. Postconditioning and intermittent bradykinin induced cardioprotection require cyclooxygenase activation and prostacyclin release during reperfusion. *Basic Res Cardiol* 103, 368-377, (2008).
- 134 Krieg, T., Cui, L., Qin, Q., Cohen, M. V. & Downey, J. M. Mitochondrial ROS generation following acetylcholine-induced EGF receptor transactivation requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *J Mol Cell Cardiol* 36, 435-443, (2004).
- 135 Liu, Y., Tsuchida, A., Cohen, M. V. & Downey, J. M. Pretreatment with angiotensin II activates protein kinase C and limits myocardial infarction in isolated rabbit hearts. *J Mol Cell Cardiol* 27, 883-892, (1995).
- 136 Hausenloy, D. J., Tsang, A. & Yellon, D. M. The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning. *Trends in cardiovascular medicine* 15, 69-75, (2005).

- 137 Cohen, M. V., Yang, X. M. & Downey, J. M. The pH hypothesis of postconditioning: staccato reperfusion reintroduces oxygen and perpetuates myocardial acidosis. *Circulation* 115, 1895-1903, (2007).
- 138 Inserte, J., Barba, I., Hernando, V. & Garcia-Dorado, D. Delayed recovery of intracellular acidosis during reperfusion prevents calpain activation and determines protection in postconditioned myocardium. *Cardiovascular research* 81, 116-122, (2009).
- 139 Kaplan, S. H. *et al.* Hypercapnic acidosis and dimethyl amiloride reduce reperfusion induced cell death in ischaemic ventricular myocardium. *Cardiovascular research* 29, 231-238, (1995).
- 140 Ohashi, T. *et al.* Transient reperfusion with acidic solution affects postischemic functional recovery: studies in the isolated working rat heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* 111, 613-620, (1996).
- 141 Inserte, J. *et al.* Effect of acidic reperfusion on prolongation of intracellular acidosis and myocardial salvage. *Cardiovascular research* 77, 782-790, (2008).
- 142 Yang, X. M. *et al.* Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways. *Journal of the American College of Cardiology* 44, 1103-1110, (2004).
- 143 Inserte, J. *et al.* cGMP/PKG pathway mediates myocardial postconditioning protection in rat hearts by delaying normalization of intracellular acidosis during reperfusion. *Journal of molecular and cellular cardiology* 50, 903-909, (2011).
- 144 Murad, F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. *J Clin Invest* 78, 1-5, (1986).
- 145 Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376, (1980).
- 146 Katsuki, S., Arnold, W., Mittal, C. & Murad, F. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J Cyclic Nucleotide Res* 3, 23-35, (1977).
- 147 Ignarro, L. J. Endothelium-derived nitric oxide: pharmacology and relationship to the actions of organic nitrate esters. *Pharm Res* 6, 651-659, (1989).
- 148 Hardman, J. G. & Sutherland, E. W. Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate. *The Journal of biological chemistry* 244, 6363-6370, (1969).
- 149 Hofmann, F., Ammendola, A. & Schlossmann, J. Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci* 113 ( Pt 10), 1671-1676, (2000).
- 150 Chen, K., Pittman, R. N. & Popel, A. S. Nitric oxide in the vasculature: where does it come from and where does it go? A quantitative perspective. *Antioxid Redox Signal* 10, 1185-1198, (2008).
- 151 Moncada, S. & Higgs, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *The New England journal of medicine* 329, 2002-2012, (1993).
- 152 Kamisaki, Y. *et al.* Soluble guanylate cyclase from rat lung exists as a heterodimer. *The Journal of biological chemistry* 261, 7236-7241, (1986).
- 153 Gerzer, R., Hofmann, F. & Schultz, G. Purification of a soluble, sodium-nitroprusside-stimulated guanylate cyclase from bovine lung. *European journal of biochemistry / FEBS* 116, 479-486, (1981).
- 154 Russwurm, M. & Koesling, D. NO activation of guanylyl cyclase. *EMBO J* 23, 4443-4450, (2004).
- 155 Mergia, E., Russwurm, M., Zoidl, G. & Koesling, D. Major occurrence of the new alpha2beta1 isoform of NO-sensitive guanylyl cyclase in brain. *Cell Signal* 15, 189-195, (2003).

- 156 Budworth, J., Meillerais, S., Charles, I. & Powell, K. Tissue distribution of the human soluble guanylate cyclases. *Biochem Biophys Res Commun* 263, 696-701, (1999).
- 157 Kuhn, M. Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A. *Circulation research* 93, 700-709, (2003).
- 158 Schulz, S. C-type natriuretic peptide and guanylyl cyclase B receptor. *Peptides* 26, 1024-1034, (2005).
- 159 Garbers, D. L. & Lowe, D. G. Guanylyl cyclase receptors. *The Journal of biological chemistry* 269, 30741-30744, (1994).
- 160 de Bold, A. J. *et al.* The physiological and pathophysiological modulation of the endocrine function of the heart. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 79, 705-714, (2001).
- 161 Castro, L. R., Verde, I., Cooper, D. M. & Fischmeister, R. Cyclic guanosine monophosphate compartmentation in rat cardiac myocytes. *Circulation* 113, 2221-2228, (2006).
- 162 Ashman, D. F., Lipton, R., Melicow, M. M. & Price, T. D. Isolation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate from rat urine. *Biochem Biophys Res Commun* 11, 330-334, (1963).
- 163 Brown, R. L., Strassmaier, T., Brady, J. D. & Karpen, J. W. The pharmacology of cyclic nucleotide-gated channels: emerging from the darkness. *Curr Pharm Des* 12, 3597-3613, (2006).
- 164 Soderling, S. H., Bayuga, S. J. & Beavo, J. A. Identification and characterization of a novel family of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *The Journal of biological chemistry* 273, 15553-15558, (1998).
- 165 Castro, L. R., Schittl, J. & Fischmeister, R. Feedback control through cGMP-dependent protein kinase contributes to differential regulation and compartmentation of cGMP in rat cardiac myocytes. *Circulation research* 107, 1232-1240, (2010).
- 166 Conti, M. & Beavo, J. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu Rev Biochem* 76, 481-511, (2007).
- 167 Kass, D. A. Cardiac Role of Cyclic-GMP Hydrolyzing Phosphodiesterase Type 5: From Experimental Models to Clinical Trials. *Current heart failure reports* 9, 192-199, (2012).
- 168 Bender, A. T. & Beavo, J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* 58, 488-520, (2006).
- 169 Lincoln, T. M., Komalavilas, P., Boerth, N. J., MacMillan-Crow, L. A. & Cornwell, T. L. cGMP signaling through cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. *Adv Pharmacol* 34, 305-322, (1995).
- 170 Rybalkin, S. D., Yan, C., Bornfeldt, K. E. & Beavo, J. A. Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circulation research* 93, 280-291, (2003).
- 171 Martinez, S. E., Beavo, J. A. & Hol, W. G. GAF domains: two-billion-year-old molecular switches that bind cyclic nucleotides. *Molecular interventions* 2, 317-323, (2002).
- 172 Degerman, E. *et al.* Evidence that insulin and isoprenaline activate the cGMP-inhibited low-Km cAMP phosphodiesterase in rat fat cells by phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 533-537, (1990).
- 173 Loughney, K. *et al.* Isolation and characterization of cDNAs encoding PDE5A, a human cGMP-binding, cGMP-specific 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Gene* 216, 139-147, (1998).
- 174 Stacey, P., Rulten, S., Dapling, A. & Phillips, S. C. Molecular cloning and expression of human cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5). *Biochem Biophys Res Commun* 247, 249-254, (1998).
- 175 Kass, D. A., Takimoto, E., Nagayama, T. & Champion, H. C. Phosphodiesterase regulation of nitric oxide signaling. *Cardiovascular research* 75, 303-314, (2007).

- 176 Takimoto, E. *et al.* Compartmentalization of cardiac beta-adrenergic inotropy modulation by phosphodiesterase type 5. *Circulation* 115, 2159-2167, (2007).
- 177 Fisher, P. W., Salloum, F., Das, A., Hyder, H. & Kukreja, R. C. Phosphodiesterase-5 inhibition with sildenafil attenuates cardiomyocyte apoptosis and left ventricular dysfunction in a chronic model of doxorubicin cardiotoxicity. *Circulation* 111, 1601-1610, (2005).
- 178 Das, A., Xi, L. & Kukreja, R. C. Phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil preconditions adult cardiac myocytes against necrosis and apoptosis. Essential role of nitric oxide signaling. *The Journal of biological chemistry* 280, 12944-12955, (2005).
- 179 McAllister-Lucas, L. M. *et al.* The structure of a bovine lung cGMP-binding, cGMP-specific phosphodiesterase deduced from a cDNA clone. *The Journal of biological chemistry* 268, 22863-22873, (1993).
- 180 Hofmann, F. The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. *The Journal of biological chemistry* 280, 1-4, (2005).
- 181 Pfeifer, A. *et al.* Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 135, 105-149, (1999).
- 182 Keilbach, A., Ruth, P. & Hofmann, F. Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies. *European journal of biochemistry / FEBS* 208, 467-473, (1992).
- 183 Feil, S. *et al.* Distribution of cGMP-dependent protein kinase type I and its isoforms in the mouse brain and retina. *Neuroscience* 135, 863-868, (2005).
- 184 Feil, R. & Kemp-Harper, B. cGMP signalling: from bench to bedside. Conference on cGMP generators, effectors and therapeutic implications. *EMBO reports* 7, 149-153, (2006).
- 185 Geiselhoringer, A., Gaisa, M., Hofmann, F. & Schlossmann, J. Distribution of IRAG and cGKI-isoforms in murine tissues. *FEBS Lett* 575, 19-22, (2004).
- 186 Hofmann, F., Dostmann, W., Keilbach, A., Landgraf, W. & Ruth, P. Structure and physiological role of cGMP-dependent protein kinase. *Biochimica et biophysica acta* 1135, 51-60, (1992).
- 187 Francis, S. H. & Corbin, J. D. Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Annual review of physiology* 56, 237-272, (1994).
- 188 Huggins, J. P., Landgraf, W., Hofmann, F. & Pelton, J. T. Secondary structure and conformational changes associated with substrate-binding and the N-terminus in cyclic GMP-dependent protein kinase. *Biochem Soc Trans* 19, 163S, (1991).
- 189 Vallur, R., Kalbacher, H. & Feil, R. Catalytic Activity of cGMP-Dependent Protein Kinase Type I in Intact Cells Is Independent of N-Terminal Autophosphorylation. *PLoS one* 9, e98946, (2014).
- 190 Hofmann, F., Feil, R., Kleppisch, T. & Schlossmann, J. Function of cGMP-Dependent Protein Kinases as Revealed by Gene Deletion. *Physiological Reviews* 86, 1-23, (2006).
- 191 Surks, H. K. *et al.* Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase I $\alpha$ . *Science* 286, 1583-1587, (1999).
- 192 Robertson, B. E., Schubert, R., Hescheler, J. & Nelson, M. T. cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. *The American journal of physiology* 265, C299-303, (1993).
- 193 Fukao, M. *et al.* Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072. *The Journal of biological chemistry* 274, 10927-10935, (1999).
- 194 White, R. E. *et al.* Potassium channel stimulation by natriuretic peptides through cGMP-dependent dephosphorylation. *Nature* 361, 263-266, (1993).
- 195 Sausbier, M. *et al.* Elevated blood pressure linked to primary hyperaldosteronism and impaired vasodilation in BK channel-deficient mice. *Circulation* 112, 60-68, (2005).

- 196 Sausbier, M. *et al.* Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. *Circulation research* 87, 825-830, (2000).
- 197 Pfeifer, A. *et al.* Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J* 17, 3045-3051, (1998).
- 198 Wegener, J. W. *et al.* cGMP-dependent protein kinase I mediates the negative inotropic effect of cGMP in the murine myocardium. *Circulation research* 90, 18-20, (2002).
- 199 Kojda, G. *et al.* Low increase in cGMP induced by organic nitrates and nitrovasodilators improves contractile response of rat ventricular myocytes. *Circulation research* 78, 91-101, (1996).
- 200 Zhang, Q., Moalem, J., Tse, J., Scholz, P. M. & Weiss, H. R. Effects of natriuretic peptides on ventricular myocyte contraction and role of cyclic GMP signaling. *Eur J Pharmacol* 510, 209-215, (2005).
- 201 Kojda, G. Mechanisms of inotropic effects induced by nitric oxide. *Italian heart journal : official journal of the Italian Federation of Cardiology* 2 Suppl 3, 48s-49s, (2001).
- 202 Vila-Petroff, M. G., Younes, A., Egan, J., Lakatta, E. G. & Sollott, S. J. Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes. *Circulation research* 84, 1020-1031, (1999).
- 203 Marx, S. O. *et al.* PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* 101, 365-376, (2000).
- 204 Blumenthal, D. K., Stull, J. T. & Gill, G. N. Phosphorylation of cardiac troponin by guanosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *The Journal of biological chemistry* 253, 324-326, (1978).
- 205 Layland, J., Li, J. M. & Shah, A. M. Role of cyclic GMP-dependent protein kinase in the contractile response to exogenous nitric oxide in rat cardiac myocytes. *The Journal of physiology* 540, 457-467, (2002).
- 206 Yang, L. *et al.* Protein kinase G phosphorylates Cav1.2 alpha1c and beta2 subunits. *Circulation research* 101, 465-474, (2007).
- 207 Hsu, S. *et al.* Phosphodiesterase 5 inhibition blocks pressure overload-induced cardiac hypertrophy independent of the calcineurin pathway. *Cardiovascular research* 81, 301-309, (2009).
- 208 Fiedler, B. *et al.* Inhibition of calcineurin-NFAT hypertrophy signaling by cGMP-dependent protein kinase type I in cardiac myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 11363-11368, (2002).
- 209 Depre, C. & Hue, L. Cyclic GMP in the perfused rat heart. Effect of ischaemia, anoxia and nitric oxide synthase inhibitor. *FEBS Lett* 345, 241-245, (1994).
- 210 Lochner, A. *et al.* Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in ischemic preconditioning. *Mol Cell Biochem* 186, 169-175, (1998).
- 211 Neshler, R., Robinson, W. F., Gibb, L., Bishop, S. P. & Kruger, F. A. Cyclic nucleotide levels in the perfused rat heart subjected to hypoxia. *Experientia* 33, 215-217, (1977).
- 212 Yamaguchi, F. *et al.* Activation of cardiac muscarinic receptor and ischemic preconditioning effects in in situ rat heart. *Heart and vessels* 12, 74-83, (1997).
- 213 Agullo, L. *et al.* Effect of ischemia on soluble and particulate guanylyl cyclase-mediated cGMP synthesis in cardiomyocytes. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 284, H2170-2176, (2003).
- 214 Stasch, J. P. *et al.* Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. *The Journal of clinical investigation* 116, 2552-2561, (2006).

- 215 Zhou, Z. *et al.* Soluble guanylyl cyclase activation by HMR-1766 (ataciguat) in cells exposed to oxidative stress. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 295, H1763-1771, (2008).
- 216 Vasquez-Vivar, J., Martasek, P., Whitsett, J., Joseph, J. & Kalyanaraman, B. The ratio between tetrahydrobiopterin and oxidized tetrahydrobiopterin analogues controls superoxide release from endothelial nitric oxide synthase: an EPR spin trapping study. *Biochem J* 362, 733-739, (2002).
- 217 Chen, W. *et al.* Peroxynitrite induces destruction of the tetrahydrobiopterin and heme in endothelial nitric oxide synthase: transition from reversible to irreversible enzyme inhibition. *Biochemistry* 49, 3129-3137, (2010).
- 218 Costa, A. D. *et al.* Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria. *Circulation research* 97, 329-336, (2005).
- 219 Xu, Z., Ji, X. & Boysen, P. G. Exogenous nitric oxide generates ROS and induces cardioprotection: involvement of PKG, mitochondrial KATP channels, and ERK. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 286, H1433-1440, (2004).
- 220 Oldenburg, O., Cohen, M. V. & Downey, J. M. Mitochondrial K(ATP) channels in preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 35, 569-575, (2003).
- 221 D'Souza, S. P. *et al.* B-type natriuretic peptide limits infarct size in rat isolated hearts via KATP channel opening. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 284, H1592-1600, (2003).
- 222 Giricz, Z. *et al.* Hyperlipidaemia induced by a high-cholesterol diet leads to the deterioration of guanosine-3',5'-cyclic monophosphate/protein kinase G-dependent cardioprotection in rats. *Br J Pharmacol* 158, 1495-1502, (2009).
- 223 Stasch, J. P. *et al.* NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. *Br J Pharmacol* 136, 773-783, (2002).
- 224 Methner, C. *et al.* Riociguat reduces infarct size and post-infarct heart failure in mouse hearts: insights from MRI/PET imaging. *PloS one* 8, e83910, (2013).
- 225 Ghofrani, H. A. *et al.* Riociguat for the treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine* 369, 319-329, (2013).
- 226 Ghofrani, H. A. *et al.* Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *The New England journal of medicine* 369, 330-340, (2013).
- 227 Follmann, M. *et al.* The chemistry and biology of soluble guanylate cyclase stimulators and activators. *Angew Chem Int Ed Engl* 52, 9442-9462, (2013).
- 228 Krieg, T. *et al.* BAY 58-2667, a nitric oxide-independent guanylyl cyclase activator, pharmacologically post-conditions rabbit and rat hearts. *European heart journal* 30, 1607-1613, (2009).
- 229 Salloum, F. N. *et al.* Cinaciguat, a novel activator of soluble guanylate cyclase, protects against ischemia/reperfusion injury: role of hydrogen sulfide. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 302, H1347-1354, (2012).
- 230 Cohen, M. V., Yang, X. M., Liu, Y., Solenkova, N. V. & Downey, J. M. Cardioprotective PKG-independent NO signaling at reperfusion. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 299, H2028-2036, (2010).
- 231 Methner, C. *et al.* Protection through postconditioning or a mitochondria-targeted S-nitrosothiol is unaffected by cardiomyocyte-selective ablation of protein kinase G. *Basic research in cardiology* 108, 337, (2013).
- 232 Inserte, J. *et al.* Delayed phospholamban phosphorylation in post-conditioned heart favours Ca<sup>2+</sup> normalization and contributes to protection. *Cardiovascular research* 103, 542-553, (2014).

- 233 Burley, D. S. & Baxter, G. F. B-type natriuretic peptide at early reperfusion limits infarct size in the rat isolated heart. *Basic Res Cardiol* 102, 529-541, (2007).
- 234 Ren, B. *et al.* Brain natriuretic peptide limits myocardial infarct size dependent of nitric oxide synthase in rats. *Clin Chim Acta* 377, 83-87, (2007).
- 235 Gorbe, A. *et al.* Role of cGMP-PKG signaling in the protection of neonatal rat cardiac myocytes subjected to simulated ischemia/reoxygenation. *Basic Res Cardiol* 105, 643-650, (2010).
- 236 Kitakaze, M. *et al.* Human atrial natriuretic peptide and nicorandil as adjuncts to reperfusion treatment for acute myocardial infarction (J-WIND): two randomised trials. *Lancet* 370, 1483-1493, (2007).
- 237 Lundberg, J. O., Weitzberg, E. & Gladwin, M. T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 7, 156-167, (2008).
- 238 Webb, A. *et al.* Reduction of nitrite to nitric oxide during ischemia protects against myocardial ischemia-reperfusion damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 13683-13688, (2004).
- 239 Duranski, M. R. *et al.* Cytoprotective effects of nitrite during in vivo ischemia-reperfusion of the heart and liver. *J Clin Invest* 115, 1232-1240, (2005).
- 240 Shiva, S. *et al.* Nitrite augments tolerance to ischemia/reperfusion injury via the modulation of mitochondrial electron transfer. *J Exp Med* 204, 2089-2102, (2007).
- 241 Das, A., Xi, L. & Kukreja, R. C. Protein kinase G-dependent cardioprotective mechanism of phosphodiesterase-5 inhibition involves phosphorylation of ERK and GSK3beta. *The Journal of biological chemistry* 283, 29572-29585, (2008).
- 242 Ockaili, R., Salloum, F., Hawkins, J. & Kukreja, R. C. Sildenafil (Viagra) induces powerful cardioprotective effect via opening of mitochondrial K(ATP) channels in rabbits. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 283, H1263-1269, (2002).
- 243 Kukreja, R. C. *et al.* Pharmacological preconditioning with sildenafil: Basic mechanisms and clinical implications. *Vascul Pharmacol* 42, 219-232, (2005).
- 244 Salloum, F. N. *et al.* Sildenafil and vardenafil but not nitroglycerin limit myocardial infarction through opening of mitochondrial K(ATP) channels when administered at reperfusion following ischemia in rabbits. *J Mol Cell Cardiol* 42, 453-458, (2007).
- 245 Salloum, F. N. *et al.* Phosphodiesterase-5 inhibitor, tadalafil, protects against myocardial ischemia/reperfusion through protein-kinase g-dependent generation of hydrogen sulfide. *Circulation* 120, S31-36, (2009).
- 246 Adelman, J. P. *et al.* Calcium-activated potassium channels expressed from cloned complementary DNAs. *Neuron* 9, 209-216, (1992).
- 247 Atkinson, N. S., Robertson, G. A. & Ganetzky, B. A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila slo* locus. *Science* 253, 551-555, (1991).
- 248 Butler, A., Tsunoda, S., McCobb, D. P., Wei, A. & Salkoff, L. mSlo, a complex mouse gene encoding "maxi" calcium-activated potassium channels. *Science* 261, 221-224, (1993).
- 249 Pallanck, L. & Ganetzky, B. Cloning and characterization of human and mouse homologs of the *Drosophila* calcium-activated potassium channel gene, slowpoke. *Human molecular genetics* 3, 1239-1243, (1994).
- 250 Zhang, X., Solaro, C. R. & Lingle, C. J. Allosteric regulation of BK channel gating by Ca(2+) and Mg(2+) through a nonselective, low affinity divalent cation site. *J Gen Physiol* 118, 607-636, (2001).
- 251 Shi, J. & Cui, J. Intracellular Mg(2+) enhances the function of BK-type Ca(2+)-activated K(+) channels. *J Gen Physiol* 118, 589-606, (2001).

- 252 Shen, K. Z. *et al.* Tetraethylammonium block of Slowpoke calcium-activated potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes: evidence for tetrameric channel formation. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 426, 440-445, (1994).
- 253 Quirk, J. C. & Reinhart, P. H. Identification of a novel tetramerization domain in large conductance K(ca) channels. *Neuron* 32, 13-23, (2001).
- 254 Knaus, H. G. *et al.* Primary sequence and immunological characterization of beta-subunit of high conductance Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channel from smooth muscle. *The Journal of biological chemistry* 269, 17274-17278, (1994).
- 255 Brenner, R., Jegla, T. J., Wickenden, A., Liu, Y. & Aldrich, R. W. Cloning and functional characterization of novel large conductance calcium-activated potassium channel beta subunits, hKCNMB3 and hKCNMB4. *The Journal of biological chemistry* 275, 6453-6461, (2000).
- 256 Ma, Z., Lou, X. J. & Horrigan, F. T. Role of charged residues in the S1-S4 voltage sensor of BK channels. *J Gen Physiol* 127, 309-328, (2006).
- 257 Ledoux, J., Werner, M. E., Brayden, J. E. & Nelson, M. T. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology* 21, 69-78, (2006).
- 258 Fodor, A. A. & Aldrich, R. W. Statistical limits to the identification of ion channel domains by sequence similarity. *J Gen Physiol* 127, 755-766, (2006).
- 259 Xia, X. M., Zeng, X. & Lingle, C. J. Multiple regulatory sites in large-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* 418, 880-884, (2002).
- 260 Schreiber, M. & Salkoff, L. A novel calcium-sensing domain in the BK channel. *Biophysical journal* 73, 1355-1363, (1997).
- 261 Yang, H. *et al.* Activation of Slo1 BK channels by Mg<sup>2+</sup> coordinated between the voltage sensor and RCK1 domains. *Nature structural & molecular biology* 15, 1152-1159, (2008).
- 262 Toro, B. *et al.* KCNMB1 regulates surface expression of a voltage and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel via endocytic trafficking signals. *Neuroscience* 142, 661-669, (2006).
- 263 Hu, X. Q. & Zhang, L. Function and regulation of large conductance Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channel in vascular smooth muscle cells. *Drug Discov Today* 17, 974-987, (2012).
- 264 Lu, R. *et al.* MaxiK channel partners: physiological impact. *The Journal of physiology* 570, 65-72, (2006).
- 265 Zhang, J. & Yan, J. Regulation of BK channels by auxiliary gamma subunits. *Frontiers in physiology* 5, 401, (2014).
- 266 Adams, P. R., Constanti, A., Brown, D. A. & Clark, R. B. Intracellular Ca<sup>2+</sup> activates a fast voltage-sensitive K<sup>+</sup> current in vertebrate sympathetic neurones. *Nature* 296, 746-749, (1982).
- 267 Roberts, W. M., Jacobs, R. A. & Hudspeth, A. J. Colocalization of ion channels involved in frequency selectivity and synaptic transmission at presynaptic active zones of hair cells. *J Neurosci* 10, 3664-3684, (1990).
- 268 Pallotta, B. S., Magleby, K. L. & Barrett, J. N. Single channel recordings of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> currents in rat muscle cell culture. *Nature* 293, 471-474, (1981).
- 269 McCobb, D. P. *et al.* A human calcium-activated potassium channel gene expressed in vascular smooth muscle. *The American journal of physiology* 269, H767-777, (1995).
- 270 Wang, Y. J., Sung, R. J., Lin, M. W. & Wu, S. N. Contribution of BK(Ca)-channel activity in human cardiac fibroblasts to electrical coupling of cardiomyocytes-fibroblasts. *J Membr Biol* 213, 175-185, (2006).
- 271 Soltysinska, E. *et al.* KCNMA1 encoded cardiac BK channels afford protection against ischemia-reperfusion injury. *PloS one* 9, e103402, (2014).

- 272 Singh, H. *et al.* mitoBKCa is encoded by the Kcnma1 gene, and a splicing sequence defines its mitochondrial location. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 10836-10841, (2013).
- 273 Singh, H., Stefani, E. & Toro, L. Intracellular BK(Ca) (iBK(Ca)) channels. *The Journal of physiology* 590, 5937-5947, (2012).
- 274 Douglas, R. M. *et al.* The calcium-sensitive large-conductance potassium channel (BK/MAXI K) is present in the inner mitochondrial membrane of rat brain. *Neuroscience* 139, 1249-1261, (2006).
- 275 Xu, W. *et al.* Cytoprotective role of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in the cardiac inner mitochondrial membrane. *Science* 298, 1029-1033, (2002).
- 276 Toro, L. *et al.* MaxiK channel and cell signalling. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 466, 875-886, (2014).
- 277 Zhang, J. *et al.* The mitochondrial BKCa channel cardiac interactome reveals BKCa association with the mitochondrial import receptor subunit Tom22, and the adenine nucleotide translocator. *Mitochondrion* 33, 84-101, (2017).
- 278 Ohya, S., Kuwata, Y., Sakamoto, K., Muraki, K. & Imaizumi, Y. Cardioprotective effects of estradiol include the activation of large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in cardiac mitochondria. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 289, H1635-H1642, (2005).
- 279 Sausbier, M. *et al.* Cerebellar ataxia and Purkinje cell dysfunction caused by Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 9474-9478, (2004).
- 280 Findlay, I., Dunne, M. J. & Petersen, O. H. High-conductance K<sup>+</sup> channel in pancreatic islet cells can be activated and inactivated by internal calcium. *J Membr Biol* 83, 169-175, (1985).
- 281 Herrera, G. M., Heppner, T. J. & Nelson, M. T. Regulation of urinary bladder smooth muscle contractions by ryanodine receptors and BK and SK channels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279, R60-68, (2000).
- 282 Semenov, I., Wang, B., Herlihy, J. T. & Brenner, R. BK channel beta1-subunit regulation of calcium handling and constriction in tracheal smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291, L802-810, (2006).
- 283 Du, W. *et al.* Calcium-sensitive potassium channelopathy in human epilepsy and paroxysmal movement disorder. *Nat Genet* 37, 733-738, (2005).
- 284 Pyott, S. J. *et al.* Cochlear function in mice lacking the BK channel alpha, beta1, or beta4 subunits. *The Journal of biological chemistry* 282, 3312-3324, (2007).
- 285 Amberg, G. C., Bonev, A. D., Rossow, C. F., Nelson, M. T. & Santana, L. F. Modulation of the molecular composition of large conductance, Ca<sup>2+</sup> activated K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle during hypertension. *J Clin Invest* 112, 717-724, (2003).
- 286 Meredith, A. L., Thorneloe, K. S., Werner, M. E., Nelson, M. T. & Aldrich, R. W. Overactive bladder and incontinence in the absence of the BK large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel. *The Journal of biological chemistry* 279, 36746-36752, (2004).
- 287 Thorneloe, K. S., Meredith, A. L., Knorn, A. M., Aldrich, R. W. & Nelson, M. T. Urodynamic properties and neurotransmitter dependence of urinary bladder contractility in the BK channel deletion model of overactive bladder. *Am J Physiol Renal Physiol* 289, F604-610, (2005).
- 288 Seibold, M. A. *et al.* An african-specific functional polymorphism in KCNMB1 shows sex-specific association with asthma severity. *Human molecular genetics* 17, 2681-2690, (2008).
- 289 Aon, M. A., Cortassa, S., Wei, A. C., Grunnet, M. & O'Rourke, B. Energetic performance is improved by specific activation of K<sup>+</sup> fluxes through K(Ca) channels in heart mitochondria. *Biochimica et biophysica acta* 1797, 71-80, (2010).

- 290 Sato, T., Saito, T., Saegusa, N. & Nakaya, H. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in cardiac myocytes: a mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A. *Circulation* 111, 198-203, (2005).
- 291 Kang, S. H. *et al.* Mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels more efficiently reduce mitochondrial Ca<sup>2+</sup> overload in rat ventricular myocytes. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 293, H307-313, (2007).
- 292 Stowe, D. F. *et al.* Cardiac mitochondrial preconditioning by Big Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channel opening requires superoxide radical generation. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 290, H434-440, (2006).
- 293 Heinen, A. *et al.* Reverse electron flow-induced ROS production is attenuated by activation of mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channels. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 293, H1400-1407, (2007).
- 294 Aon, M. A., Cortassa, S., Wei, A. C., Grunnet, M. & O'Rourke, B. Energetic performance is improved by specific activation of K<sup>+</sup> fluxes through K-Ca channels in heart mitochondria. *Bba-Bioenergetics* 1797, 71-80, (2010).
- 295 Heinen, A. *et al.* Mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-induced K<sup>+</sup> influx increases respiration and enhances ROS production while maintaining membrane potential. *American journal of physiology. Cell physiology* 292, C148-156, (2007).
- 296 Swayze, R. D. & Braun, A. P. A catalytically inactive mutant of type I cGMP-dependent protein kinase prevents enhancement of large conductance, calcium-sensitive K<sup>+</sup> channels by sodium nitroprusside and cGMP. *The Journal of biological chemistry* 276, 19729-19737, (2001).
- 297 Kyle, B. D., Hurst, S., Swayze, R. D., Sheng, J. & Braun, A. P. Specific phosphorylation sites underlie the stimulation of a large conductance, Ca(2+)-activated K(+) channel by cGMP-dependent protein kinase. *FASEB J* 27, 2027-2038, (2013).
- 298 Hoshi, T., Tian, Y., Xu, R., Heinemann, S. H. & Hou, S. Mechanism of the modulation of BK potassium channel complexes with different auxiliary subunit compositions by the omega-3 fatty acid DHA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 4822-4827, (2013).
- 299 Denson, D. D., Wang, X., Worrell, R. T. & Eaton, D. C. Effects of fatty acids on BK channels in GH(3) cells. *American journal of physiology. Cell physiology* 279, C1211-1219, (2000).
- 300 Valverde, M. A. *et al.* Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit. *Science* 285, 1929-1931, (1999).
- 301 Olesen, S. P., Munch, E., Watjen, F. & Drejer, J. NS 004--an activator of Ca(2+)-dependent K<sup>+</sup> channels in cerebellar granule cells. *Neuroreport* 5, 1001-1004, (1994).
- 302 Olesen, S. P., Munch, E., Moldt, P. & Drejer, J. Selective activation of Ca(2+)-dependent K<sup>+</sup> channels by novel benzimidazolone. *Eur J Pharmacol* 251, 53-59, (1994).
- 303 Revermann, M. *et al.* Inhalation of the BK(Ca)-opener NS1619 attenuates right ventricular pressure and improves oxygenation in the rat monocrotaline model of pulmonary hypertension. *PLoS one* 9, e86636, (2014).
- 304 Gonzalez-Corrochano, R. *et al.* Ca<sup>2+</sup> -activated K<sup>+</sup> channel (KCa) stimulation improves relaxant capacity of PDE5 inhibitors in human penile arteries and recovers the reduced efficacy of PDE5 inhibition in diabetic erectile dysfunction. *Br J Pharmacol* 169, 449-461, (2013).
- 305 Akerman, S., Holland, P. R., Lasalandra, M. P. & Goadsby, P. J. Inhibition of trigeminovascular dural nociceptive afferents by Ca(2+)-activated K(+) (MaxiK/BK(Ca)) channel opening. *Pain* 151, 128-136, (2010).
- 306 Gaspar, T. *et al.* Immediate neuronal preconditioning by NS1619. *Brain Res* 1285, 196-207, (2009).

- 307 Gessner, G. *et al.* Molecular mechanism of pharmacological activation of BK channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 3552-3557, (2012).
- 308 Jiang, Y. *et al.* Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* 417, 515-522, (2002).
- 309 Wang, X., Yin, C., Xi, L. & Kukreja, R. C. Opening of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels triggers early and delayed preconditioning against I/R injury independent of NOS in mice. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 287, H2070-2077, (2004).
- 310 Cao, C. M., Xia, Q., Gao, Q., Chen, M. & Wong, T. M. Calcium-activated potassium channel triggers cardioprotection of ischemic preconditioning. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 312, 644-650, (2005).
- 311 Gao, Q., Zhang, S. Z., Cao, C. M., Bruce, I. C. & Xia, Q. The mitochondrial permeability transition pore and the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel contribute to the cardioprotection conferred by tumor necrosis factor-alpha. *Cytokine* 32, 199-205, (2005).
- 312 Shi, Y. *et al.* Mitochondrial big conductance KCa channel and cardioprotection in infant rabbit heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 50, 497-502, (2007).
- 313 Park, W. S. *et al.* The mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel activator, NS 1619 inhibits L-type Ca<sup>2+</sup> channels in rat ventricular myocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 362, 31-36, (2007).
- 314 Saleh, S. N., Angermann, J. E., Sones, W. R., Leblanc, N. & Greenwood, I. A. Stimulation of Ca<sup>2+</sup>-gated Cl<sup>-</sup> currents by the calcium-dependent K<sup>+</sup> channel modulators NS1619 [1,3-dihydro-1-[2-hydroxy-5-(trifluoromethyl)phenyl]-5-(trifluoromethyl)-2H-benzimidazol-2-one] and isopimaric acid. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 321, 1075-1084, (2007).
- 315 Edwards, G., Niederste-Hollenberg, A., Schneider, J., Noack, T. & Weston, A. H. Ion channel modulation by NS 1619, the putative BKCa channel opener, in vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol* 113, 1538-1547, (1994).
- 316 Cancherini, D. V., Queliconi, B. B. & Kowaltowski, A. J. Pharmacological and physiological stimuli do not promote Ca<sup>(2+)</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channel activity in isolated heart mitochondria. *Cardiovascular research* 73, 720-728, (2007).
- 317 Bentzen, B. H. *et al.* The small molecule NS11021 is a potent and specific activator of Ca<sup>2+</sup>-activated big-conductance K<sup>+</sup> channels. *Molecular pharmacology* 72, 1033-1044, (2007).
- 318 Bentzen, B. H. *et al.* Activation of big conductance Ca<sup>(2+)</sup>-activated K<sup>(+)</sup> channels (BK) protects the heart against ischemia-reperfusion injury. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 457, 979-988, (2009).
- 319 Borchert, G. H., Hlavackova, M. & Kolar, F. Pharmacological activation of mitochondrial BK(Ca) channels protects isolated cardiomyocytes against simulated reperfusion-induced injury. *Experimental biology and medicine* 238, 233-241, (2013).
- 320 Zakharov, S. I., Morrow, J. P., Liu, G., Yang, L. & Marx, S. O. Activation of the BK (SLO1) potassium channel by mallotoxin. *The Journal of biological chemistry* 280, 30882-30887, (2005).
- 321 Almassy, J. & Begenisich, T. The LRRC26 protein selectively alters the efficacy of BK channel activators. *Molecular pharmacology* 81, 21-30, (2012).
- 322 Bilmen, J. G., Wootton, L. L. & Michelangeli, F. The mechanism of inhibition of the sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase by paxilline. *Arch Biochem Biophys* 406, 55-64, (2002).
- 323 Bentzen, B. H., Olesen, S. P., Ronn, L. C. & Grunnet, M. BK channel activators and their therapeutic perspectives. *Frontiers in physiology* 5, 389, (2014).

- 324 Wojtovich, A. P. *et al.* SLO-2 is cytoprotective and contributes to mitochondrial potassium transport. *PLoS one* 6, e28287, (2011).
- 325 Garcia-Dorado, D. Myocardial reperfusion injury: a new view. *Cardiovascular research* 61, 363-364, (2004).
- 326 Russwurm, M. *et al.* Design of fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based cGMP indicators: a systematic approach. *Biochem J* 407, 69-77, (2007).
- 327 Thunemann, M. *et al.* Transgenic mice for cGMP imaging. *Circulation research* 113, 365-371, (2013).
- 328 Lukowski, R. *et al.* Cardiac hypertrophy is not amplified by deletion of cGMP-dependent protein kinase I in cardiomyocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 5646-5651, (2010).
- 329 Sternberg, N. & Hamilton, D. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol* 150, 467-486, (1981).
- 330 Agah, R. *et al.* Gene recombination in postmitotic cells. Targeted expression of Cre recombinase provokes cardiac-restricted, site-specific rearrangement in adult ventricular muscle in vivo. *The Journal of clinical investigation* 100, 169-179, (1997).
- 331 Mullis, K. B. & Faloona, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335-350, (1987).
- 332 Louch, W. E., Sheehan, K. A. & Wolska, B. M. Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer. *J Mol Cell Cardiol* 51, 288-298, (2011).
- 333 Vander Heide, R. S., Rim, D., Hohl, C. M. & Ganote, C. E. An in vitro model of myocardial ischemia utilizing isolated adult rat myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 22, 165-181, (1990).
- 334 Decker, T. & Lohmann-Matthes, M. L. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods* 115, 61-69, (1988).
- 335 Burd, J. F. & Usategui-Gomez, M. A colorimetric assay for serum lactate dehydrogenase. *Clin Chim Acta* 46, 223-227, (1973).
- 336 Gurtu, V., Kain, S. R. & Zhang, G. Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis. *Anal Biochem* 251, 98-102, (1997).
- 337 Nicholson, D. W. *et al.* Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376, 37-43, (1995).
- 338 Frezza, C., Cipolat, S. & Scorrano, L. Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nature protocols* 2, 287-295, (2007).
- 339 Clark, L. C., Wolf, R., Granger, D. & Taylor, Z. <em>Continuous Recording of Blood Oxygen Tensions by Polarography</em>. *Journal of Applied Physiology* 6, 189-193, (1953).
- 340 Severinghaus, J. W. & Astrup, P. B. History of blood gas analysis. IV. Leland Clark's oxygen electrode. *Journal of Clinical Monitoring* 2, 125-139, (1986).
- 341 Chance, B. & Williams, G. R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. IV. The respiratory chain. *The Journal of biological chemistry* 217, 429-438, (1955).
- 342 Instruments, H. Oxygraph System Manual.
- 343 Truesdale, G. A. & Downing, A. L. Solubility of Oxygen in Water. *Nature* 173, 1236-1236, (1954).
- 344 Chance, B. & Williams, G. R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state. *The Journal of biological chemistry* 217, 409-427, (1955).
- 345 Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254, (1976).

- 346 Chatterjee, A. *et al.* MOF Acetyl Transferase Regulates Transcription and Respiration in Mitochondria. *Cell* 167, 722-738.e723.
- 347 Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685, (1970).
- 348 Kass-Eisler, A. *et al.* Quantitative determination of adenovirus-mediated gene delivery to rat cardiac myocytes in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 11498-11502, (1993).
- 349 Gotz, K. R. *et al.* Transgenic mice for real-time visualization of cGMP in intact adult cardiomyocytes. *Circulation research* 114, 1235-1245, (2014).
- 350 Thunemann, M., Fomin, N., Krawutschke, C., Russwurm, M. & Feil, R. Visualization of cGMP with cGi biosensors. *Methods Mol Biol* 1020, 89-120, (2013).
- 351 Förster, T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* 437, 55-75, (1948).
- 352 Poot, M. *et al.* Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains. *J Histochem Cytochem* 44, 1363-1372, (1996).
- 353 Baschong, W., Suetterlin, R. & Laeng, R. H. Control of Autofluorescence of Archival Formaldehyde-fixed, Paraffin-embedded Tissue in Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 49, 1565-1571, (2001).
- 354 Oliveira, V. C. *et al.* Sudan Black B treatment reduces autofluorescence and improves resolution of in situ hybridization specific fluorescent signals of brain sections. *Histology and histopathology* 25, 1017-1024, (2010).
- 355 Frankenreiter, S. *et al.* cGMP-Elevating Compounds and Ischemic Conditioning Provide Cardioprotection Against Ischemia and Reperfusion Injury via Cardiomyocyte-Specific BK Channels. *Circulation*, (2017).
- 356 Wirth, C., Brandt, U., Hunte, C. & Zickermann, V. Structure and function of mitochondrial complex I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1857, 902-914, (2016).
- 357 Li, Y., Park, J.-S., Deng, J.-H. & Bai, Y. Cytochrome c Oxidase Subunit IV is Essential for Assembly and Respiratory Function of the Enzyme Complex. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 38, 283-291, (2006).
- 358 Capaldi, R. A. Structure and function of cytochrome c oxidase. *Annu Rev Biochem* 59, 569-596, (1990).
- 359 Xie, Y. W. *et al.* Role of endothelium-derived nitric oxide in the modulation of canine myocardial mitochondrial respiration in vitro. Implications for the development of heart failure. *Circulation research* 79, 381-387, (1996).
- 360 Schwarzfeld, T. A. & Jacobson, S. L. Isolation and development in cell culture of myocardial cells of the adult rat. *J Mol Cell Cardiol* 13, 563-575, (1981).
- 361 Bednarczyk, P., Koziel, A., Jarmuszkiewicz, W. & Szewczyk, A. Large-conductance Ca(2+)-activated potassium channel in mitochondria of endothelial EA.hy926 cells. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 304, H1415-1427, (2013).
- 362 Stenger, R. J. & Spiro, D. Structure of the cardiac muscle cell. *The American Journal of Medicine* 30, 653-665, (1961).
- 363 Downey, J. M. & Cohen, M. V. Reducing infarct size in the setting of acute myocardial infarction. *Progress in cardiovascular diseases* 48, 363-371, (2006).
- 364 Illison, J. *et al.* Obesogenic and Diabetogenic Effects of High-Calorie Nutrition Require Adipocyte BK Channels. *Diabetes* 65, 3621-3635, (2016).
- 365 Knaus, H. G. *et al.* Characterization of tissue-expressed alpha subunits of the high conductance Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channel. *The Journal of biological chemistry* 270, 22434-22439, (1995).

- 366 Zhou, X. B. *et al.* A molecular switch for specific stimulation of the BKCa channel by cGMP and cAMP kinase. *The Journal of biological chemistry* 276, 43239-43245, (2001).
- 367 Zhou, X. B. *et al.* Dual role of protein kinase C on BK channel regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 8005-8010, (2010).
- 368 Balderas, E., Zhang, J., Stefani, E. & Toro, L. Mitochondrial BKCa channel. *Frontiers in physiology* 6, 104, (2015).
- 369 Kathiresan, T., Harvey, M., Orchard, S., Sakai, Y. & Sokolowski, B. A protein interaction network for the large conductance Ca(2+)-activated K(+) channel in the mouse cochlea. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 8, 1972-1987, (2009).
- 370 Singh, H. *et al.* MaxiK channel interactome reveals its interaction with GABA transporter 3 and heat shock protein 60 in the mammalian brain. *Neuroscience* 317, 76-107, (2016).
- 371 Kicinska, A. & Szewczyk, A. Large-Conductance Potassium Cation Channel Opener NS1619 Inhibits Cardiac Mitochondria Respiratory Chain. *Toxicol Mech Methods* 14, 59-61, (2004).
- 372 Debska, G. *et al.* Large-conductance K<sup>+</sup> channel openers NS1619 and NS004 as inhibitors of mitochondrial function in glioma cells. *Biochemical pharmacology* 65, 1827-1834, (2003).
- 373 Jastroch, M., Divakaruni, A. S., Mookerjee, S., Treberg, J. R. & Brand, M. D. Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays in biochemistry* 47, 53-67, (2010).
- 374 Cheng, Y., Gulbins, E. & Siemen, D. Activation of the permeability transition pore by Bax via inhibition of the mitochondrial BK channel. *Cell Physiol Biochem* 27, 191-200, (2011).
- 375 Cheng, Y. *et al.* Hypoxia increases activity of the BK-channel in the inner mitochondrial membrane and reduces activity of the permeability transition pore. *Cell Physiol Biochem* 22, 127-136, (2008).
- 376 McFerrin, M. B., Turner, K. L., Cuddapah, V. A. & Sontheimer, H. Differential role of IK and BK potassium channels as mediators of intrinsic and extrinsic apoptotic cell death. *American journal of physiology. Cell physiology* 303, C1070-1078, (2012).
- 377 Ruttiger, L. *et al.* Deletion of the Ca<sup>2+</sup>-activated potassium (BK) alpha-subunit but not the BKbeta1-subunit leads to progressive hearing loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 12922-12927, (2004).
- 378 Kressel, M. & Groscurth, P. Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labelling of fragmented DNA. *Cell and tissue research* 278, 549-556, (1994).
- 379 Tyas, L., Brophy, V. A., Pope, A., Rivett, A. J. & Tavaré, J. M. Rapid caspase-3 activation during apoptosis revealed using fluorescence-resonance energy transfer. *EMBO reports* 1, 266-270, (2000).
- 380 Wang, Z. *et al.* Kinetic and structural characterization of caspase-3 and caspase-8 inhibition by a novel class of irreversible inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1804, 1817-1831, (2010).
- 381 Kolfshoten, G. M., Hulscher, T. M., Duyndam, M. C. A., Pinedo, H. M. & Boven, E. Variation in the kinetics of caspase-3 activation, Bcl-2 phosphorylation and apoptotic morphology in unselected human ovarian cancer cell lines as a response to docetaxel. *Biochemical pharmacology* 63, 733-743, (2002).
- 382 Narayan, P., Mentzer, R. M., Jr. & Lasley, R. D. Annexin V staining during reperfusion detects cardiomyocytes with unique properties. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 281, H1931-1937, (2001).
- 383 Taimor, G., Lorenz, H., Hofstaetter, B., Schluter, K. D. & Piper, H. M. Induction of necrosis but not apoptosis after anoxia and reoxygenation in isolated adult cardiomyocytes of rat. *Cardiovascular research* 41, 147-156, (1999).
- 384 Garlid, K. D. *et al.* Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circulation research* 81, 1072-1082, (1997).

- 385 Liu, Y., Sato, T., O'Rourke, B. & Marban, E. Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? *Circulation* 97, 2463-2469, (1998).
- 386 Akao, M., Ohler, A., O'Rourke, B. & Marban, E. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels inhibit apoptosis induced by oxidative stress in cardiac cells. *Circulation research* 88, 1267-1275, (2001).
- 387 Noma, A. ATP-regulated K<sup>+</sup> channels in cardiac muscle. *Nature* 305, 147-148, (1983).
- 388 Garlid, K. D. & Halestrap, A. P. The mitochondrial K(ATP) channel--fact or fiction? *J Mol Cell Cardiol* 52, 578-583, (2012).
- 389 Suzuki, M. *et al.* Cardioprotective effect of diazoxide is mediated by activation of sarcolemmal but not mitochondrial ATP-sensitive potassium channels in mice. *Circulation* 107, 682-685, (2003).
- 390 Holland, M., Langton, P. D., Standen, N. B. & Boyle, J. P. Effects of the BKCa channel activator, NS1619, on rat cerebral artery smooth muscle. *Br J Pharmacol* 117, 119-129, (1996).
- 391 Aldakkak, M., Stowe, D. F., Cheng, Q., Kwok, W. M. & Camara, A. K. Mitochondrial matrix K<sup>+</sup> flux independent of large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel opening. *American journal of physiology. Cell physiology* 298, C530-541, (2010).
- 392 Wojtovich, A. P. *et al.* A non-cardiomyocyte autonomous mechanism of cardioprotection involving the SLO1 BK channel. *PeerJ* 1, e48, (2013).
- 393 Nilius, B., Viana, F. & Droogmans, G. Ion channels in vascular endothelium. *Annual review of physiology* 59, 145-170, (1997).
- 394 Suh, S. H. *et al.* Characterisation of explanted endothelial cells from mouse aorta: electrophysiology and Ca<sup>2+</sup> signalling. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 438, 612-620, (1999).
- 395 Kaur, H. *et al.* Targeted Ablation of Periostin-Expressing Activated Fibroblasts Prevents Adverse Cardiac Remodeling in Mice. *Circulation research* 118, 1906-1917, (2016).
- 396 Kisanuki, Y. Y. *et al.* Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo. *Dev Biol* 230, 230-242, (2001).
- 397 Anghelina, M., Moldovan, L. & Moldovan, N. I. Preferential activity of Tie2 promoter in arteriolar endothelium. *J Cell Mol Med* 9, 113-121, (2005).
- 398 Palmer, J. W., Tandler, B. & Hoppel, C. L. Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle. *The Journal of biological chemistry* 252, 8731-8739, (1977).
- 399 Palmer, J. W., Tandler, B. & Hoppel, C. L. Biochemical differences between subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria from rat cardiac muscle: effects of procedural manipulations. *Arch Biochem Biophys* 236, 691-702, (1985).
- 400 Weinstein, E. S., Benson, D. W. & Fry, D. E. Subpopulations of human heart mitochondria. *J Surg Res* 40, 495-498, (1986).
- 401 Zenebe, W. J., Nazarewicz, R. R., Parihar, M. S. & Ghafourifar, P. Hypoxia/Reoxygenation of Isolated Rat Heart Mitochondria Causes Cytochrome c Release and Oxidative Stress; Evidence for Involvement of Mitochondrial Nitric Oxide Synthase. *Journal of molecular and cellular cardiology* 43, 411-419, (2007).
- 402 Robin, E., Derichard, A., Vallet, B., Hassoun, S. M. & Neviere, R. Nitric oxide scavenging modulates mitochondrial dysfunction induced by hypoxia/reoxygenation. *Pharmacological reports : PR* 63, 1189-1194, (2011).
- 403 Maruyama, D., Hirata, N., Miyashita, R., Kawaguchi, R. & Yamakage, M. Substrate-dependent modulation of oxidative phosphorylation in isolated mitochondria following in vitro hypoxia and reoxygenation injury. *Experimental and clinical cardiology* 18, 158-160, (2013).

- 404 Pravdic, D. *et al.* Isoflurane protects cardiomyocytes and mitochondria by immediate and cytosol-independent action at reperfusion. *Br J Pharmacol* 160, 220-232, (2010).
- 405 Hickey, A. J. *et al.* A radical approach to beating hypoxia: depressed free radical release from heart fibres of the hypoxia-tolerant epaulette shark (*Hemiscyllium ocellatum*). *J Comp Physiol B* 182, 91-100, (2012).
- 406 Guo, S. *et al.* A cell-based phenotypic assay to identify cardioprotective agents. *Circulation research* 110, 948-957, (2012).
- 407 Readnower, R. D., Brainard, R. E., Hill, B. G. & Jones, S. P. Standardized bioenergetic profiling of adult mouse cardiomyocytes. *Physiol Genomics* 44, 1208-1213, (2012).
- 408 Rudolph, V. *et al.* Endogenous generation and protective effects of nitro-fatty acids in a murine model of focal cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovascular research* 85, 155-166, (2010).
- 409 Backstrom, T., Goiny, M., Lockowandt, U., Liska, J. & Franco-Cereceda, A. Cardiac outflow of amino acids and purines during myocardial ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol (1985)* 94, 1122-1128, (2003).
- 410 Piper, H. M., Garcia-Dorado, D. & Ovize, M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovascular research* 38, 291-300, (1998).
- 411 Diaz, R. J. & Wilson, G. J. Studying ischemic preconditioning in isolated cardiomyocyte models. *Cardiovascular research* 70, 286-296, (2006).
- 412 Ehler, E., Moore-Morris, T. & Lange, S. Isolation and Culture of Neonatal Mouse Cardiomyocytes. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 50154, (2013).
- 413 Nagata, T. *et al.* Cardiac-Specific SOCS3 Deletion Prevents In Vivo Myocardial Ischemia Reperfusion Injury through Sustained Activation of Cardioprotective Signaling Molecules. *PloS one* 10, e0127942, (2015).
- 414 Zhou, J. *et al.* Crosstalk Between MAPK/ERK and PI3K/AKT Signal Pathways During Brain Ischemia/Reperfusion. *ASN NEURO* 7, 1759091415602463, (2015).
- 415 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. *Circulation research* 90, 377-379, (2002).
- 416 Das, S., Wong, R., Rajapakse, N., Murphy, E. & Steenbergen, C. Glycogen synthase kinase 3 inhibition slows mitochondrial adenine nucleotide transport and regulates voltage-dependent anion channel phosphorylation. *Circulation research* 103, 983-991, (2008).
- 417 Gross, E. R., Hsu, A. K. & Gross, G. J. Delayed cardioprotection afforded by the glycogen synthase kinase 3 inhibitor SB-216763 occurs via a KATP- and MPTP-dependent mechanism at reperfusion. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 294, H1497-1500, (2008).
- 418 Park, S. S., Zhao, H., Jang, Y., Mueller, R. A. & Xu, Z. N6-(3-iodobenzyl)-adenosine-5'-N-methylcarboxamide confers cardioprotection at reperfusion by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening via glycogen synthase kinase 3 beta. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 318, 124-131, (2006).
- 419 Grimes, C. A. & Jope, R. S. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  in cellular signaling. *Progress in Neurobiology* 65, 391-426, (2001).
- 420 Hernández, F., Langa, E., Cuadros, R., Avila, J. & Villanueva, N. Regulation of GSK3 isoforms by phosphatases PP1 and PP2A. *Molecular and Cellular Biochemistry* 344, 211-215, (2010).
- 421 Szatmari, E. *et al.* A positive feedback loop between glycogen synthase kinase 3beta and protein phosphatase 1 after stimulation of NR2B NMDA receptors in forebrain neurons. *The Journal of biological chemistry* 280, 37526-37535, (2005).

- 422 Morisco, C. *et al.* Glycogen synthase kinase 3beta regulates GATA4 in cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* 276, 28586-28597, (2001).
- 423 Fryer, R. M., Patel, H. H., Hsu, A. K. & Gross, G. J. Stress-activated protein kinase phosphorylation during cardioprotection in the ischemic myocardium. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 281, H1184-1192, (2001).
- 424 Knight, R. J. & Buxton, D. B. Stimulation of c-Jun kinase and mitogen-activated protein kinase by ischemia and reperfusion in the perfused rat heart. *Biochem Biophys Res Commun* 218, 83-88, (1996).
- 425 Laderoute, K. R. & Webster, K. A. Hypoxia/reoxygenation stimulates Jun kinase activity through redox signaling in cardiac myocytes. *Circulation research* 80, 336-344, (1997).
- 426 Hilfiker-Kleiner, D. *et al.* Signal transducer and activator of transcription 3 is required for myocardial capillary growth, control of interstitial matrix deposition, and heart protection from ischemic injury. *Circulation research* 95, 187-195, (2004).
- 427 Heusch, G., Musiolik, J., Gedik, N. & Skyschally, A. Mitochondrial STAT3 activation and cardioprotection by ischemic postconditioning in pigs with regional myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation research* 109, 1302-1308, (2011).
- 428 Boengler, K., Hilfiker-Kleiner, D., Heusch, G. & Schulz, R. Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion. *Basic Res Cardiol* 105, 771-785, (2010).
- 429 Nikolaev, V. O. & Lohse, M. J. Novel techniques for real-time monitoring of cGMP in living cells. *Handbook of experimental pharmacology*, 229-243, (2009).
- 430 Nikolaev, V. O., Gambaryan, S. & Lohse, M. J. Fluorescent sensors for rapid monitoring of intracellular cGMP. *Nature methods* 3, 23-25, (2006).
- 431 Fischmeister, R. *et al.* Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Circulation research* 99, 816-828, (2006).
- 432 Singh, H. *et al.* Visualization and quantification of cardiac mitochondrial protein clusters with STED microscopy. *Mitochondrion* 12, 230-236, (2012).
- 433 Willig, K. I. *et al.* Nanoscale resolution in GFP-based microscopy. *Nature methods* 3, 721-723, (2006).
- 434 Behmenburg, F. *et al.* Impact of Mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-Sensitive Potassium (mBKCa) Channels in Sildenafil-Induced Cardioprotection in Rats. *PloS one* 10, e0144737, (2015).



## Publikationen und Kongressbeiträge

### Publikationen

Soltysinska E, Bentzen BH, Barthmes M, Hattel H, Thrush AB, Harper ME, Qvortrup K, Larsen FJ, Schiffer TA, Losa-Reyna J, Straubinger J, **Kniess A**, Thomsen MB, Bruggemann A, Fenske S, Biel M, Ruth P, Wahl-Schott C, Boushel RC, Olesen SP and Lukowski R (2014). “KCNMA1 Encoded Cardiac BK Channels Afford Protection against Ischemia-Reperfusion Injury.” *PloS one*. 2014;9:e103402.

Frankenreiter S, Bednarczyk P, **Kniess A**, Bork N, Straubinger J, Koprowski P, Wrzosek A, Mohr E, Logan A, Murphy MP, Gawaz M, Krieg T, Szewczyk A, Nikolaev VO, Ruth P and Lukowski R (2017). “cGMP-Elevating Compounds and Ischemic Conditioning Provide Cardioprotection Against Ischemia and Reperfusion Injury via Cardiomyocyte-Specific BK Channels.” *Circulation*. (*Epub ahead of print*; Abbildung 4.2F und G, Abbildung 4.4A und B (in abgeänderter Form), Abbildung 4.12 und Abbildung 7.1 (in abgeänderter Form) werden mit dieser Arbeit veröffentlicht)

### Kongressbeiträge

**Kniess A.**<sup>#</sup>, Frankenreiter S.<sup>#</sup>, Ruth P., Lukowski R. “BK channels as targets of cGMP signalling in myocardial pre- and postconditioning and survival”. DFG FOR2060 Konferenz in Göttingen (02/2014), Göttingen (Poster)

Frankenreiter S., **Kniess A.**, Ruth P., Lukowski R. “BK channels as targets of cGMP signalling in myocardial pre- and postconditioning and survival”. Summer School für biomedizinische Nachwuchsforscher: *Tracking fast signaling processes in vivo - mechanisms, targets and tools* (07/2014), Kloster Frauenchiemsee (Poster)

Frankenreiter S., **Kniess A.**, Ruth P., Krieg T., Friebe A., Lukowski R. „Cardioprotection against ischemia/reperfusion injury by cyclic GMP signaling and mitochondrial BK channels”. DFG FOR2060 *Meeting on New Developments in Signal Transduction & cGMP Research* (01/2015), Rottenburg (Poster)

Frankenreiter S., **Kniess A.**, Ruth P, Krieg T., Friebe A., Lukowski R. “Cyclic GMP signaling and mitochondrial BK channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury”. 7th International Conference on cGMP: *Generators, Effectors and Therapeutic Implications* (06/2015), Trier (Poster)

---

<sup>#</sup> Diese Autoren trugen gleichermaßen zur entstandenen Arbeit bei



## **Lebenslauf**

Auf einen Lebenslauf wurde in der elektronischen Fassung aus Datenschutzgründen verzichtet.



## Danksagung

Mein Dank geht an JProf. Dr. Robert Lukowski für das super spannende, herausfordernde Thema sowie die hervorragende Betreuung dieser Arbeit. Das alles hat mir spannende und vor allem lehrreiche Einblicke in die Wissenschaft ermöglicht.

Herzlichen Dank an Prof. Dr. Peter Ruth für die Betreuung und das Interesse am Fortgang meiner Doktorarbeit und für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Ein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Andreas Friebe von der Julius-Maximilians Universität in Würzburg – für die verantwortungsvolle und ernstgenommene Aufgabe als mein „Mentor“ und natürlich für sein Angebot und seine sofortige Zusage als Prüfer meiner Dissertation zu fungieren. Weiterhin möchte ich mich bei PD Dr. Bertolt Gust für seine Bereitschaft als weiterer Prüfer zu fungieren herzlich bedanken.

Ich danke der DFG Forschergruppe FOR2060 „cGMP signalling in cell growth and survival“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die Finanzierung sowie die wissenschaftlichen Gespräche bei unseren Treffen, die mich stets bereichert haben. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Viacheslav Nikolaev und Dr. Hariharan Subramanian (Experimentelle Kardiologie, Universitäts-klinikum Hamburg-Eppendorf) für die herzliche Unterstützung bei der Neu-Etablierung der Kardiomyozytenisolation bedanken.

Für die Kooperation und Möglichkeit, meine Zellen zu transfizieren bedanke ich mich bei Prof. Dr. Ulrike Nauman (Zentrum für Neurologie; Hertie-Institut Tübingen) für die Bereitstellung des Virus und die S2-Zellkultur und bei Prof. Dr. Feil für die Kooperationsmöglichkeit.

Ein ganz herzliches Dankeschön an alle, die mir während meiner Promotion mit Rat und Tat im Labor zur Seite standen und mich unterstützten. Ein großes Dankeschön geht an Isolde für das Züchten und Genotypisieren zahlreicher BK-Mäuse. Ein weiteres Dankeschön an Michael, ebenfalls für die Unterstützung bei den Genotypisierungen, beim „Notfälle“ beseitigen und das Verbreiten von guter Laune im Labor. Clément möchte ich darüber hinaus für seine wertvollen Tipps fürs Leben danken. Unserer Tierpflegerin Ilona danke ich für die zuverlässige Pflege und Versorgung unserer Mäuse.

Herzlichen Dank allen aktuellen und ehemaligen Postdocs, Doktoranden, Diplomanden und Masterstudenten des Arbeitskreises Ruth/Lukowski. Danke für die angenehme Arbeitsatmosphäre, für scharfsinnige Anregungen und die Bereitstellung eurer fachlichen Kompetenz sowie die zahlreichen Unternehmungen außerhalb der Universität. Insbesondere danke ich Julia für ihre fachliche und praktische Unterstützung und besonders für das Korrekturlesen meiner Arbeit. Ein besonderer Dank geht auch an das ehemalige und neue Ü30-Büro Rebekka, Anne, Markus und Christina für ihr stets offenes Ohr in allen Belangen und ihre fachliche Unterstützung sowie an Friederike für unvergessliche Momente. Ein besonderer Dank geht an Tanja für die Einführung in die Geheimnisse des Western-Blots und die daraus entstandene Freundschaft. Ich möchte die Zeit mit Euch allen nicht missen und hoffe, dass es noch viele weitere schöne Momente für uns zusammen gibt. Ihr habt meine Promotionszeit in Tübingen für mich zu etwas Besonderem gemacht.

Nicht zuletzt gebührt meiner Familie Dank, ohne welche diese Arbeit schon im Vorhinein niemals zustande gekommen wäre und ein besonderer Dank geht an meine Mutter, zur sprachlichen Korrektur dieser Arbeit. Ich danke Dietrich, für dein stets offenes Ohr sowie deine Unterstützung und Geduld, insbesondere in den letzten Monaten.