

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN II
PROF. DR. LARS MAIER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

DER EINFLUSS DES ER-STRESSSENSORPROTEINS PERK AUF DEN
ISCHÄMIE-REPERFUSIONSSCHADEN AM HERZEN

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Philipp Hegner

2020

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN II
PROF. DR. LARS MAIER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

DER EINFLUSS DES ER-STRESSSENSORPROTEINS PERK AUF DEN
ISCHÄMIE-REPERFUSIONSSCHADEN AM HERZEN

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Philipp Hegner

2020

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Stefan Wagner
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Daniele Camboni
Tag der mündlichen Prüfung:	17.09.2020

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VIII
1. EINLEITUNG.....	1
1.1. Einführung	1
1.2. Ultrastruktur eines Kardiomyozyten.....	2
1.3. Elektromechanische Kopplung	3
1.4. Myokardinfarkt.....	6
1.4.1. Pathophysiologie.....	6
1.4.2. Interventionelle Revaskularisierung.....	7
1.5. Der Ischämie/Reperfusionsschaden	8
1.5.1. Intrazelluläre Prozesse	9
1.5.2. Extrazelluläre Prozesse.....	11
1.5.3. Endogene Induktion der Apoptose im Kontext von I/R	11
1.5.4. Strukturelle und funktionelle Veränderungen/Remodeling	12
1.6. ER Stress und die Unfolded Protein Response	13
1.6.1. PERK	13
1.6.2. IRE1	16
1.6.3. ATF6	16
1.7. Zielsetzung.....	17
2. MATERIAL UND METHODEN.....	18
2.1. Versuchstiere	18
2.2. Isolation ventrikulärer Rattenkardiomyozyten	18
2.3. Normoxische und hypoxische Kultur der Primärzellen.....	21
2.4. Der PERK-Inhibitor GSK2656157	23

2.5.	Technik der selektiven mitochondrialen Beladung mit Rhod-2-AM.....	25
2.5.1.	Herstellung der Beladungslösung mit Rhod-2-AM.....	26
2.6.	Zytosolische Beladung mit Fluo-4-AM	27
2.6.1.	Herstellung der Beladungslösung mit Fluo-4-AM	27
2.7.	Anfärben der Mitochondrien mit Mitotracker™ Green FM.....	28
2.7.1.	Herstellung der Beladungslösung mit Mitotracker™ Green FM.....	28
2.8.	Konfokalmikroskopie	28
2.8.1.	Grundlagen der konfokalen Lasermikroskopie	28
2.8.2.	Erläuterung zur Wahl der Farbstoffe und zum Mikroskop-Setup	29
2.8.3.	Ablauf einer Messung	32
2.9.	Auszählen hyperkontraktiler Zellen.....	34
2.10.	Fluoreszenztechnische Bestimmung der Apoptose	36
2.11.	Datenauswertung und Statistik	38
2.11.1.	Auswertung der Anteile hyperkontraktiler Zellen.....	38
2.11.2.	Auswertung der Framescans	38
2.11.3.	Auswertung der Linescans.....	38
2.11.4.	Auswertung TUNEL.....	39
2.11.5.	Statistische Auswertung.....	39
3.	ERGEBNISSE	40
3.1.	Verifizierung der mitochondrialen Rhod-2 Beladung mit Mitotracker Green FM.....	40
3.2.	Korrelationsanalyse der Beladungsmuster	41
3.3.	Messung des basalen Kalziumniveaus	43
3.4.	Zytosolische Kalziumtransientenmessung mit Fluo-4.....	46
3.5.	Mitochondriale Kalziumtransientenmessung mit Rhod-2	50
3.6.	Analyse der Hyperkontraktilität	54
3.7.	Fluoreszenztechnische Bestimmung der Apoptose	58
4.	DISKUSSION.....	60

4.1.	Das H/R Modell simuliert erfolgreich einen I/R Schaden in vitro	61
4.2.	Rhod-2 verteilt sich vorwiegend mitochondrial	62
4.3.	PERK Inhibition reduziert H/R-vermittelte zytosolische und mitochondriale Kalziumüberladung....	62
4.4.	Physiologische Notwendigkeit von PERK	66
4.5.	Einschränkungen der Messungen und des Modells.....	67
5.	ZUSAMMENFASSUNG	70
6.	LITERATURVERZEICHNIS	72
7.	LEBENS LAUF	83
8.	DANKSAGUNG	84

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1 – ULTRASTRUKTUR EINES HERZMUSKELZELLENAUSSCHNITTS.....	2
ABBILDUNG 2 – AUFBAU EINES SARKOMERS.....	3
ABBILDUNG 3 – ELEKTROMECHANISCHE KOPPLUNG IN EINER HERZMUSKELZELLE.....	4
ABBILDUNG 4 – BALLONANGIOPLASTIE MIT STENTIMPLANTATION, SCHEMATISCH.....	7
ABBILDUNG 5 – MYOKARDIALE INFARKTGRÖÙE IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ZEIT BIS PCI SOWIE DARSTELLUNG DES ANTEILS DES REPERFUSIONSSCHADENS.....	8
ABBILDUNG 6 – STÖRUNG DER ZELLULÄREN HOMÖOSTASE WÄHREND DER ISCHÄMIEPHASE UND REPERFUSION.....	10
ABBILDUNG 7 – STRUKTUR VON PERK ALS MONOMER, DIMER UND TETRAMER.....	14
ABBILDUNG 8 – SCHEMATISCHE SIGNALKASKADE ZU ER-STRESS INDUZIRTER APOPTOSE MIT FOKUS AUF PERK.....	15
ABBILDUNG 9 – SCHEMATISCHER AUFBAU DES LANGENDORFF PERFUSIONSAPPARATES.....	20
ABBILDUNG 10 – STRUKTURFORMEL DES PERK INHIBITORS GSK2656157 UND IC50 WERTE EINIGER KINASEN.....	24
ABBILDUNG 11 – BELADUNG EINES KARDIOMYOZYTEN MIT RHOD-2-AM).....	25
ABBILDUNG 12 – BELADUNG EINES KARDIOMYOZYTEN MIT FLUO-4-AM.....	27
ABBILDUNG 13 – RELATIVE ABSORPTION UND EMISSION VON FLUO-4 UND RHOD-2.....	30
ABBILDUNG 14 – LICHTWEGE IM ZEISS LSM 700 KONFOKALEM LASERMIKROSKOP.....	31
ABBILDUNG 15 – EMISSIONSSPEKTREN VON FLUO-4 UND RHOD-2 BEI PARALLELER ANREGUNG.....	32
ABBILDUNG 16 – BEISPIEL EINES LINE SCANS MIT PARALLELER REGISTRIERUNG VON FLUO-4 UND RHOD-2.....	33
ABBILDUNG 17 – AUSSEHEN VON KARDIOMYOZYTEN.....	35

ABBILDUNG 18 – ORIGINALAUFNAHMEN (FRAME SCANS) EINER ZELLE BELADEN MIT MITOTRACKER GREEN FM UND RHOD-2 AM.....	41
ABBILDUNG 19 – ERGEBNISSE DER KOLOKALISATIONSANALYSE MIT ZEN BLACK.....	42
ABBILDUNG 20 – ORIGINALAUFNAHMEN (FRAME SCANS) VON KARDIOMYOZYTEN ± PERK INHIBITION ± HYPOXIE/REOXYGENIERUNG.....	43
ABBILDUNG 21 – FLUORESZENZWERTE DER FRAMESCANS, GEMITTELT PRO ISOLATION.....	45
ABBILDUNG 22 – ORIGINALREGISTRIERUNGEN VON ZYTOSOLISCHEN KALZIUMTRANSIENTEN (FLUO-4) ALS ROHDATEN.....	46
ABBILDUNG 23 – ORIGINALREGISTRIERUNGEN VON ZYTOSOLISCHEN KALZIUMTRANSIENTEN (FLUO-4), JEWEILS AUF F0 NORMALISIERT.....	47
ABBILDUNG 24 – DIASTOLISCHES F0 (BASELINE) DER ZYTOSOLISCHEN TRANSIENTEN.....	48
ABBILDUNG 25 – DIE AMPLITUDE DER TRANSIENTEN, NORMALISIERT AUF DIE BASELINE (F0).....	48
ABBILDUNG 26 – ORIGINALREGISTRIERUNGEN VON MITOCHONDRIALEN KALZIUMTRANSIENTEN (RHOD-2) ALS ROHDATEN.....	50
ABBILDUNG 27 – ORIGINALREGISTRIERUNGEN VON MITOCHONDRIALEN KALZIUMTRANSIENTEN (RHOD-2), JEWEILS AUF F0 NORMALISIERT.....	51
ABBILDUNG 28 – F0 (BASELINE) DER MITOCHONDRIALEN TRANSIENTEN....	52
ABBILDUNG 29 – DIE AMPLITUDE DER TRANSIENTEN, NORMALISIERT AUF DIE BASELINE (F0).....	52
ABBILDUNG 30 – LICHTMIKROSKOPISCHE ORIGINALAUFNAHMEN 60 MIN POST-REOXYGENIERUNG.....	54
ABBILDUNG 31 – ANTEIL HYPERKONTRAKTILER ZELLEN NACH 30 MIN REOXYGENIERUNG IN PROZENT.....	55
ABBILDUNG 32 – ANTEIL HYPERKONTRAKTILER ZELLEN NACH 60 MIN REOXYGENIERUNG IN PROZENT.....	55
ABBILDUNG 33 – ANTEIL HYPERKONTRAKTILER ZELLEN ÜBER DIE ZEIT (VEHIKELGRUPPEN).....	56
ABBILDUNG 34 – ANTEIL HYPERKONTRAKTILER ZELLEN ÜBER DIE ZEIT (GSK2656157).....	56
ABBILDUNG 35 – ÜBERLAPPUNG VON ABBILDUNG 33 UND ABBILDUNG 34...57	57

ABBILDUNG 36 – ORIGINALAUFNAHMEN VON KARDIOMYOZYTEN NACH TUNEL
MIT HOECHST 33342 KERNGEGENFÄRBUNG.....59

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 – Isolationstyrode.....	19
Tabelle 2 – Enzymlösung.....	20
Tabelle 3 – Stopplösung.....	21
Tabelle 4 – Kalziumaufbaulösungen.....	21
Tabelle 5 – Hypoxietyrode.....	22
Tabelle 6 – Kulturmedium I.....	22
Tabelle 7 – Kulturmedium II.....	22
Tabelle 8 – Messtyrode.	26
Tabelle 9 – Beladungslösung Rhod-2-AM.....	26
Tabelle 10 – Beladungslösung Fluo-4-AM.....	27
Tabelle 11 – Kriterien für die Klassifizierung als stabförmig oder hyperkontraktil.....	35
Tabelle 12 – Synopsis der Parameter zytosolischer Transienten.....	49
Tabelle 13 – Synopsis der Parameter mitochondrialer Transienten.....	53

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

- ACS - acute coronary syndrome
ADP - Adenosindiphosphat
AMP - Adenosinmonophosphat
AP - Angina Pectoris
ATF4 - activating transcription factor 4
ATF-6 - activating transcription factor 6
ATP - Adenosintriphosphat
BCS - bovine calf serum
CHOP - C/EBP homologous protein
CLSM - confocal laser scanning microscopy
DHPR - Dihydropyridinrezeptoren
DMSO - Dimethylsulfoxid
DNA - Desoxyribonukleinsäure
eIF2 α - eukaryotischer Initiationsfaktor 2 alpha
ER - endoplasmatisches Retikulum
ERAD - endoplasmic-reticulum-associated protein degradation
FADH₂ - Flavin-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
FKBP12.6 - FK506 binding protein 12.6
IC₅₀ - halbmaximale inhibitorische Konzentration
IHD - ischemic heart disease
IRE-1 - inositol-requiring-enzyme 1
IRI - ischemia reperfusion injury
KHK - koronare Herzkrankheit
MHC - major histocompatibility complex
mPTP - mitochondrial permeability transition pore
mRNA - messenger RNA
mtDNA - mitochondriale DNA
NADH - Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NAD⁺ - Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NCX - Na⁺/Ca²⁺ Exchanger
NO - Stickstoffmonoxid
PBS - phosphate buffered saline

PCI - percutaneous coronary intervention
PERK - PKR-like endoplasmic reticulum kinase
PMT - Photomultiplier
PTCA - percutaneous transluminal coronary angioplasty
ROS - reactive oxygen species
RyR - Ryanodinrezeptoren
SEM - standard error of the mean
SERCA - SR sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase
SR - sarkoplasmatisches Retikulum
SRP - signal recognition particle
STEMI - ST elevation myocardial infarction
TdT - terminale Desoxyribonukleotidyltransferase
TUNEL - TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling
UPR - unfolded protein response
VSD - variable secondary dichroic
WRS - Wollcott Rallison syndrome
XBP - x-box-binding-protein

1. Einleitung

1.1. Einführung

Ischämische Herzerkrankung (engl. ischemic heart disease (IHD)) stellte in der Global Burden of Disease Study (1980-2016) weltweit die größte Ursache für durch vorzeitigen Tod verlorene Lebensjahre dar. Des Weiteren bildet sie aus der Gruppe der kardiovaskulären Erkrankungen, welche wiederum den größten Anteil an nicht-übertragbaren Erkrankungen darstellt, die häufigste Todesursache (1).

Durch Arteriosklerose entstehen flusslimitierende Stenosen in den Koronarien (2, 3). In Folge entwickelt sich ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Bedarf des Myokards (4). Diese Ischämie kann klinisch ein sehr heterogenes Bild zeichnen. Zu den Manifestationsformen der IHD zählen die asymptomatische Koronare Herzerkrankung (KHK), symptomatische KHK (aufgeteilt in stabile Angina pectoris (AP) und das akute Koronarsyndrom (ACS)), ischämische Herzmuskelschädigung, Herzrhythmusstörungen und plötzlicher Herztod (2). In Deutschland liegt die Lebenszeitprävalenz für KHK bei Männern bei 30% (Frauen 15%), und mit 50% ist das ACS, welches auch den schwerwiegenden ST-Hebungsinfarkt beinhaltet, die häufigste Erstmanifestation (2, 3).

Somit ist es aus sowohl aus einer gesundheitlichen als auch sozioökonomischen Perspektive erstrebenswert, die Auswirkungen der IHD, insbesondere des Myokardinfarktes, zu reduzieren. IHD erzeugt in den USA jährlich 180 Milliarden Dollar an Kosten, wovon für 20-40 Milliarden Dollar die Herzinsuffizienz nach einem Infarkt verantwortlich ist (5). Neben einer zeitlich nahen Reperfusion gibt es aktuell (Stand 2019) keine weiteren, standardisierten, klinisch etablierten Therapien, die den Infarktschaden zielgerichtet reduzieren können. In der vorliegenden Arbeit wurde in einem experimentellen Modell auf zellulärer Ebene ein möglicher therapeutischer Ansatz untersucht, um den Schaden durch einen Myokardinfarkt sowie die anschließende Reperfusion für den Herzmuskel zu verringern.

1.2. Ultrastruktur eines Kardiomyozyten

Herzmuskulatur ist eine Spezialform der quergestreiften Muskulatur. Sie besteht aus Kardiomyozyten, die im humanen Gewebe zwischen 100-150 μm lang sind und 20-35 μm quer messen (6, 7). Im menschlichen Herzen sind Kardiomyozyten meist mononukleär (6). Dagegen besitzen über 96% der Kardiomyozyten aus Ratten zwei Zellkerne (8). Kollektiv bilden die Kardiomyozyten ein funktionelles Synzytium, und sind an ihren Enden über Glanzstreifen, die unter anderem Desmosomen, Fasciae adhaerentes, und Gap Junctions enthalten, verbunden (7). Während Desmosomen und Fasciae adhaerentes mechanischen Zusammenhalt vermitteln, sind die Kardiomyozyten über die Gap Junctions elektrisch gekoppelt und bilden eine funktionelle Einheit (9-11). Ein Gap Junction Kanal besteht aus 12 Connexonen, wobei immer zwei Connexone benachbarte Zellen miteinander verbinden, und somit die Passage von niedermolekularen Stoffen wie dem second messenger cAMP, Inositol Triphosphat, und Kalziumionen erlauben (7).

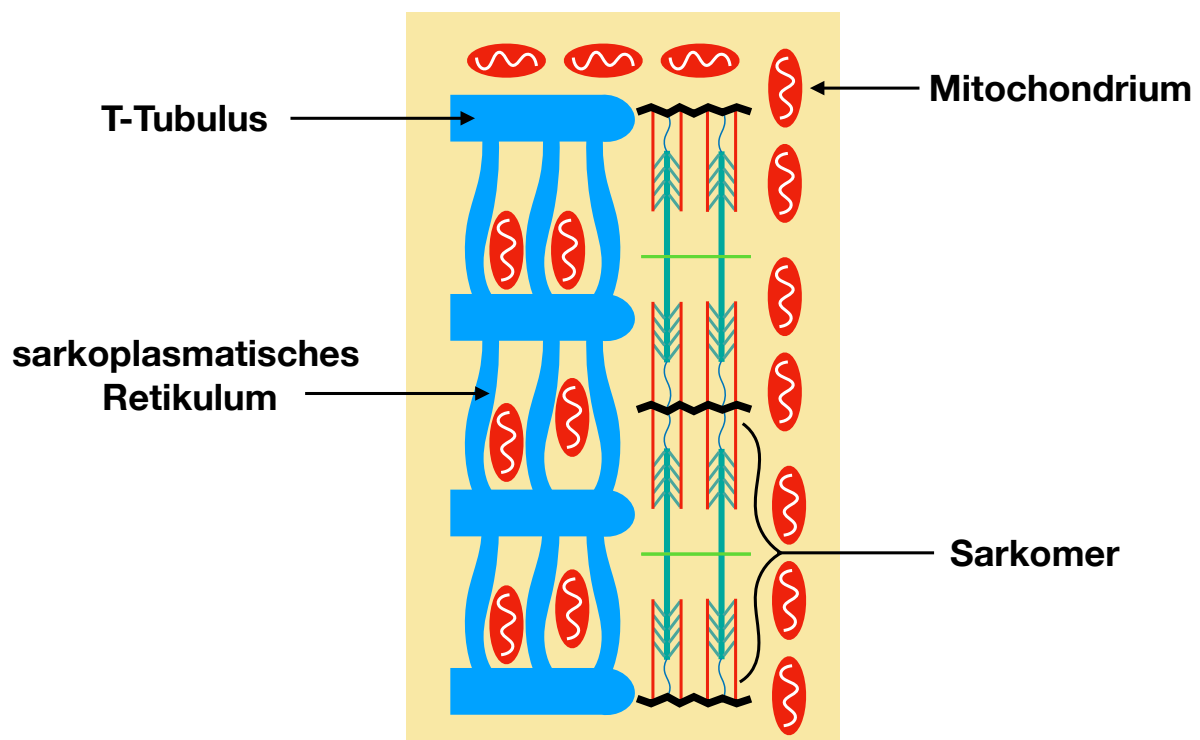


Abbildung 1 – Ultrastruktur eines Herzmuskelzellenausschnitts.

Strukturell besteht der kontraktile Apparat eines Kardiomyozyten wie der einer Skelettmuskelzelle aus parallel angeordneten Aktin und Myosinfilamenten, woraus die

charakteristische Querstreifung hervorgeht (12). In Abbildung 2 ist ein Sarkomer dargestellt, die kleinste kontraktile Einheit eines Myozyten. Aktin- und Myosinfilamente lagern zwischen zwei Z-Scheiben, den Begrenzungen des Sarkomers, aneinander (13). Wird eine Kontraktion durch erhöhte intrazelluläre Kalziumspiegel ausgelöst, so knicken die zahlreichen Köpfe der Myosinfilamente unter ATP-Hydrolyse ab, und das Sarkomer - und damit auch die (Herz-)Muskelzelle – verkürzen sich (14). Pro ATP Zyklus ergibt sich eine Verkürzung um ca. 600Å, was ca. 0,06µm entspricht (15).

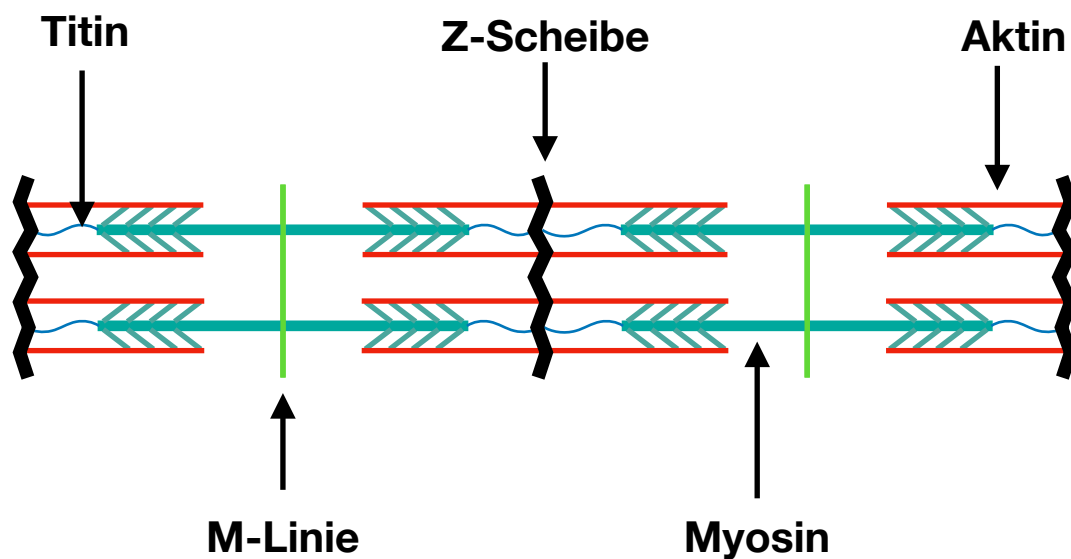


Abbildung 2 – Aufbau eines Sarkomers.

1.3. Elektromechanische Kopplung

Die elektromechanische Kopplung beschreibt den Prozess von der Erregung eines Myozyten bis zur Kontraktion der Zelle (16). In der elektromechanischen Kopplung nimmt das zweiwertige Kalziumion eine zentrale Rolle ein als Vermittler der Erregung und auch der Kontraktion in Herzmuskelzellen. Abnormales Ca^{2+} Handling und gestörte elektromechanische Kopplung können sich in Arrhythmien klinisch manifestieren (17).

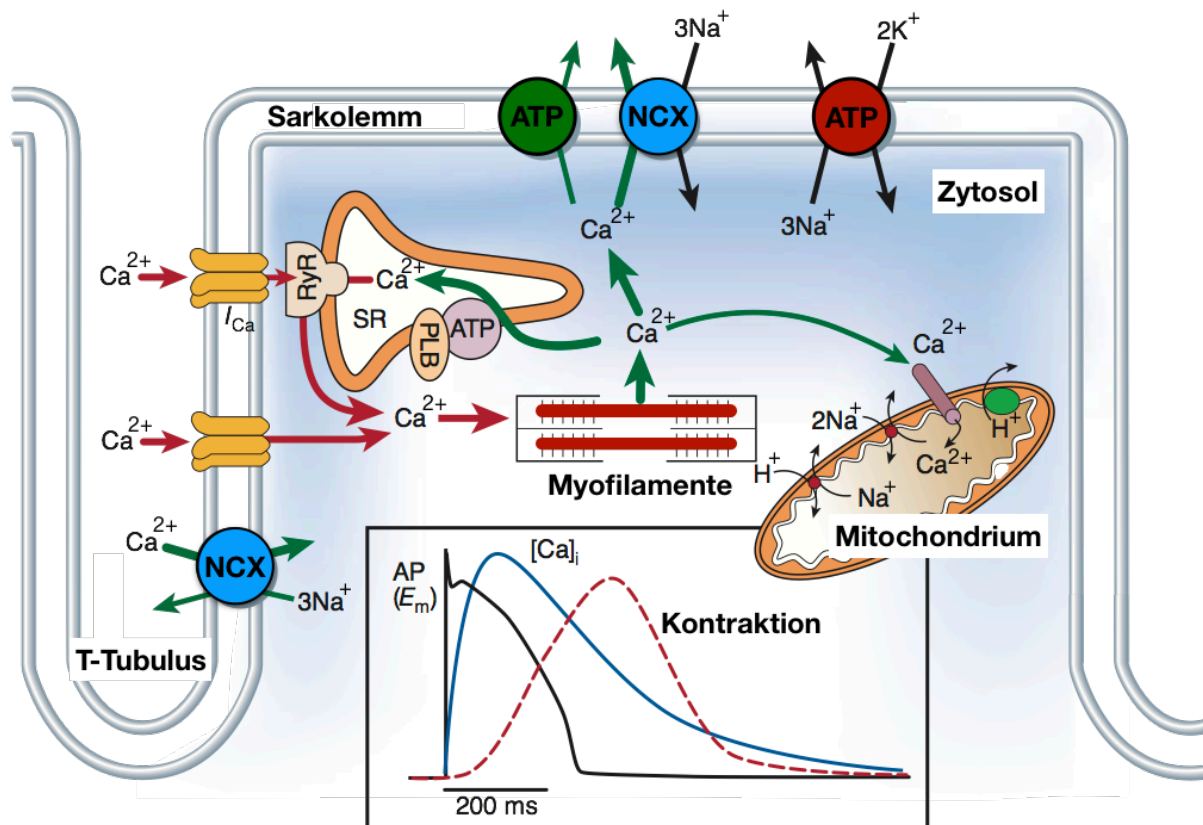


Abbildung 3 – Elektromechanische Kopplung in einer Herzmuskelzelle, modifiziert nach (16)

Beginnt ein kardiales Aktionspotenzial, kommt es zum Einstrom von Ca^{2+} in die Herzmuskelzelle durch spannungsabhängige L-Typ Kalziumkanäle (auch Dihydropyridinrezeptoren – DHPR) (16). Natriumionen spielen hierbei nur eine untergeordnete Rolle (18). Dieser Einwärtsstrom $[Ca]_i$ ist für das charakteristische Plateau im Aktionspotenzial von ventrikulären Herzmuskelzellen mitverantwortlich (siehe Abbildung 3)(16). Durch den Einstrom von Kalziumionen über spannungsgesteuerte Ionenkanäle werden weitere Kalziumionen aus dem zellulären Kalziumspeicher – dem sarkoplasmatischen Retikulum – freigesetzt (19). Dieser selbstverstärkende Prozess wird auch Kalzium-induzierte-Kalziumfreisetzung genannt (20, 21).

Räumlich gesehen besteht eine Verdichtung von L-Typ Kanälen der T-Tubuli in der Nähe der Ryanodinrezeptoren vom Typ 2 (RyR2) des SR, wobei die funktionelle Einheit aus L-Typ Kalziumkanal, RyR2 und dem Spalt dazwischen auch als Diade zusammengefasst wird (21). Ein (lokal) erhöhter Kalziumspiegel aktiviert die RyR2, und weitere Ca^{2+} Ionen werden über eine verstärkende Rückkopplung aus dem SR in das Zytosol freigesetzt (22). Der erhöhte zytosolische Kalziumspiegel übt wiederum

eine negative Rückkopplung auf die Öffnungswahrscheinlichkeit der L-Typ Kanäle aus und limitiert den Kalziumeinstrom (16).

Der Querbrückenzyklus in Herzmuskelzellen ähnelt stark dem in Skelettmuskelzellen (23). Freie Ca^{2+} Ionen im Zytosol binden an Troponin C, welches zusammen mit Tropomyosin an die Aktinfilamente angelagert ist (19). Die Kalziumbindung induziert eine Konformationsänderung im Troponinkomplex, und die Myosinbindungsstellen in den Aktinfilamenten werden freigelegt (24). ATP-gebundenes Myosin geht mit Aktin nun eine querbrückenartige Verbindung ein. Durch Hydrolyse des ATPs zu ADP und anorganischem Phosphat sowie die Dissoziation der beiden Produkte wird die Kraft für die Muskelkontraktion aufgebracht. Die Myosinköpfe knicken ab und die Sarkomere verkürzen sich, wobei Aktin und Myosinfilamente parallel aneinander vorbeigleiten. Durch erneute ATP Bindung lösen sich die Myosinköpfe wieder und ein neuer Zyklus kann beginnen.

Während der Diastole kommt es zur Relaxierung der Sarkomere. Um dies zu erreichen muss zytosolisches Kalzium wieder entfernt werden. Hierfür stehen im Wesentlichen drei verschiedene Mechanismen zur Verfügung. In Ratten-Kardiomyozyten wird 92% des freigesetzten Kalziums über die SR- Ca^{2+} -ATPase (SERCA) zurück in das Lumen des SR befördert, weitere 7% werden über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher (NCX) unter Ausnutzung des Natriumgradienten nach extrazellulär gepumpt und ca. 1% über die membranständige Ca-ATPase und Mitochondrien entfernt (16). Durch die Aktivität der Na^+/K^+ - ATPase werden eingeströmte Natriumionen wieder entfernt und der physiologische Gradient wiederhergestellt (25).

1.4. Myokardinfarkt

1.4.1. Pathophysiologie

Ein akuter ST-Hebungsinfarkt (STEMI) entsteht durch den Verschluss einer Herzkranzarterie. Dies kann entweder durch einen thrombotischen Verschluss infolge aufgerissener arteriosklerotischer Plaques, seltener durch embolische Ereignisse oder Vasospasmus entstehen (26-28). Dabei kommt es nicht zwingend auf den Stenosegrad des Gefäßes an, sondern vielmehr, dass der Verschluss plötzlich entsteht. Entwickeln sich Stenosen über einen längeren Zeitraum, so bilden sich ausreichend Kollateralen aus (29). Reißt dagegen eine arteriosklerotische Plaque auf, so setzt sie thrombogenes Material wie Kollagen und „tissue factor“ frei (30). Die im Nachfolgenden stattfindende Plättchenaktivierung verstärkt sich durch Ausschütten von ADP, Serotonin und Thromboxan A₂ selbständig (31). Zusätzlich wirken Serotonin und Thromboxan A₂ vasokonstriktiv (32). Neben der Thrombozytenaggregation läuft auch die Gerinnungskaskade ab. Diese wird vor allem durch den Tissue Factor aus Endothelzellen angestoßen (30, 33). Über Aktivierung weiterer Faktoren wird schließlich Prothrombin in Thrombin umgewandelt, und es bildet sich ein Netzwerk aus Fibrin, das noch quervernetzt wird. Ist der Gefäßverschluss komplett, kommt es bei diesem fulminanten Infarkt zu charakteristischen Veränderungen im EKG - den namensgebenden ST-Streckhebungen. Im Falle eines NSTEMI ist der Gefäßverschluss dagegen nicht komplett. Hier liegt in etwa 35% der Fälle eine Dreigefäßerkrankung vor, in 20% der Fälle eine Zweigefäßerkrankung, weitere 20% der Patienten haben eine Eingefäßerkrankung, 10% eine Hauptstammstenose, und 15% leiden unter Störungen der Mikrozirkulation oder Vasospasmen (3).

1.4.2. Interventionelle Revaskularisierung

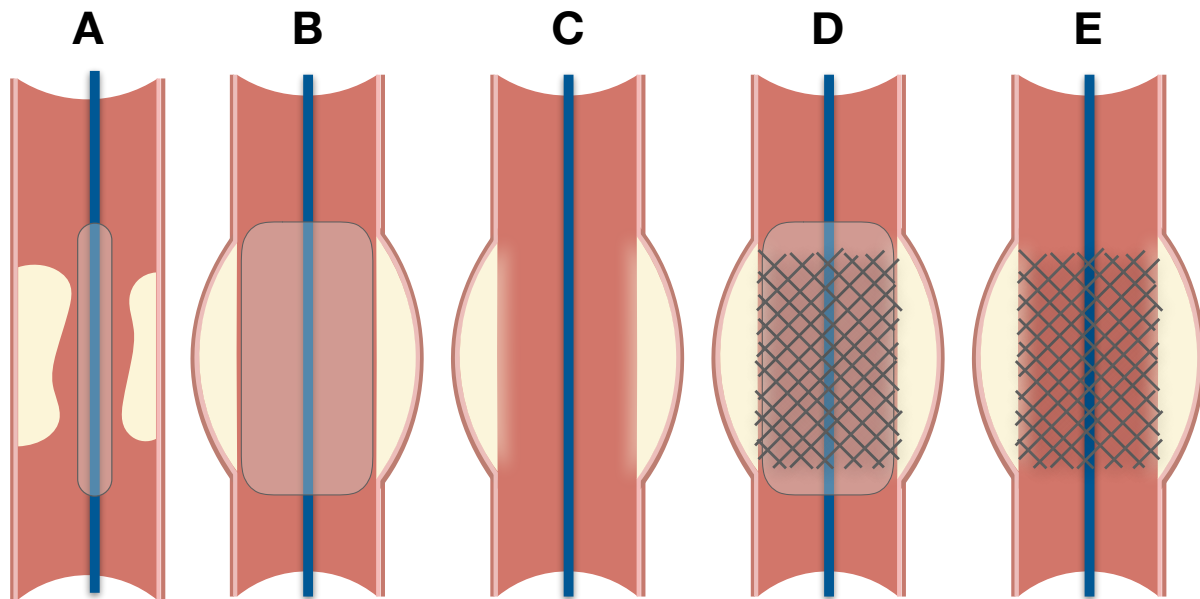


Abbildung 4 – Ballonangioplastie mit Stentimplantation, schematisch.

Zuerst wird ein Führungsdraht über den betroffenen Abschnitt vorgeschoben (A), anschließend das Gefäß mittels eines Ballons gedehnt (B), wodurch sich das Lumen bereits wieder vergrößert (C). Zuletzt erfolgt die Implantation eines Stents (D), indem dieser über den Führungsdraht an der Stenose positioniert wird und mittels Ballon in die Gefäßwand hineingedehnt wird. Der Stent verbleibt und der Führungsdraht wird entfernt (E).

Das Verfahren der perkutanen transluminalen Koronarangioplastie (PTCA), auch perkutane koronare Intervention genannt (PCI) wurde erstmals 1977 angewendet und hat sich heute zu einem der Haupteingriffe im Bereich der interventionellen Kardiologie entwickelt (34). Um die PCI durchzuführen wird ein Führungsdraht über eine Schleuse (A. radialis oder alternativ A. femoralis) bis in die betroffene Koronarie vorgeführt, und dann unter Beleuchtung analog zu Abbildung 4 die Stenose gedehnt und ein Stent implantiert. Zur langfristigen Aufrechterhaltung des Flusses über der ehemaligen Stenose sind die meisten Stents heutzutage mit Zytostatika oder Immunsuppressiva beschichtet (engl. drug eluting stents, DES). Die pathophysiologische Idee dahinter ist, dass durch Verhinderung einer Intimaproliferation die Rate an Restenosen gesenkt werden kann. Diese Überlegung konnte in Studien bestätigt werden (35, 36). Schon 2004 wurden in über 80% der Interventionen DES verwendet (37).

1.5. Der Ischämie/Reperfusionsschaden

Der Ischämie/Reperfusionsschaden (engl. ischemia reperfusion injury (IRI)) setzt sich aus zwei Komponenten zusammen. Einmal entsteht ein Schaden durch die Effekte der Ischämie selbst, und paradoxerweise weiterer Schaden durch die anschließende Reperfusion (38, 39). Im Beispiel des myokardialen Ischämie/Reperfusionsschadens sind unterversorgte Kardiomyozyten im Versorgungsbereich des betroffenen Gefäßes primär dem Risiko der Nekrose ausgesetzt, welche unvermeidbar eintritt, sollte auf Dauer keine Reperfusion erfolgen (40). Während die Reperfusion, und somit Wiederversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen, Zellen vor dem Schicksal der Nekrose bewahren kann, bringt auch sie weitere Komplikationen mit sich, die dennoch mit dem Zelltod enden können. Allein der Reperfusionsschaden kann bis zu 50% der endgültigen Infarktgröße ausmachen (39). Abbildung 5 zeigt eine Verlaufsgrafik des myokardialen Schadens bedingt durch Ischämie beziehungsweise Reperfusion.

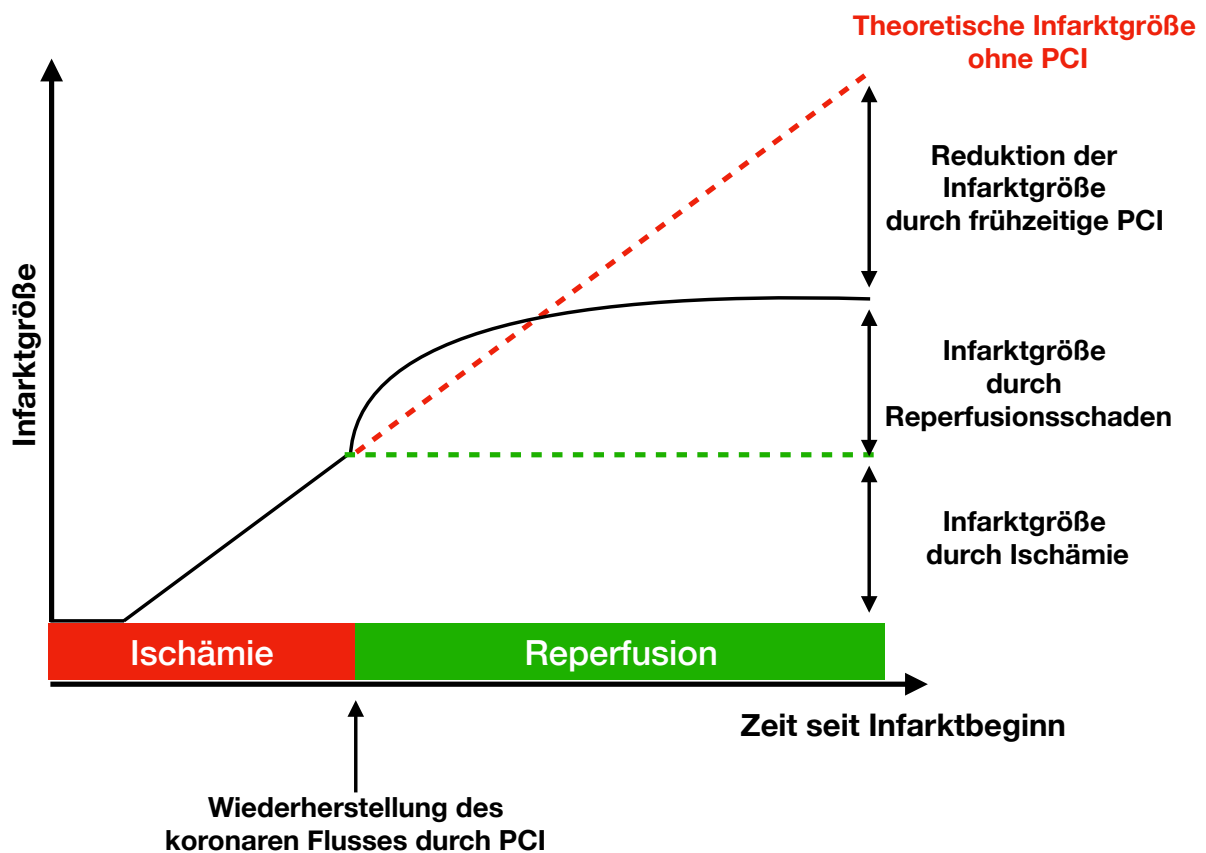


Abbildung 5 – Myokardiale Infarktgröße in Abhängigkeit von der Zeit bis PCI sowie Darstellung des Anteils des Reperfusionsschadens.

Die theoretische Infarktgröße ohne Reperfusion wird durch PCI nicht erreicht. In Anlehnung an (40)

Diverse Faktoren tragen zum Ischämie/Reperfusionsschaden bei oder begünstigen ihn, wobei sowohl intra- als auch extrazelluläre Vorgänge eine Rolle spielen.

1.5.1. Intrazelluläre Prozesse

Durch die Hypoxie werden die Zellen gezwungen, ihren Energiebedarf durch anaeroben Stoffwechsel zu decken. Der anaerobe Stoffwechsel führt zu einer Anhäufung von Laktat und Protonen und somit zu einer Absenkung des intrazellulären pH Wertes (41). Die zunehmende intrazelluläre Akkumulation an Protonen bedingt eine verstärkte Aktivität des Na^+/H^+ Tauschers, und es kommt zur Na^+ Überladung (42). Diese erhöhte intrazelluläre Na^+ Konzentration kehrt die Austauschrichtung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Tauschers (NCX) um; der sogenannte „reverse mode“ tritt ein (43). Die intrazelluläre Kalziumkonzentration nimmt stark zu. Eine Hyperkontraktur des Kardiomyozyts sowie das Öffnen der mitochondrial permeability transition pore (mPTP) wird jedoch noch durch einen niedrigen intrazellulären pH verhindert (44). Die mPTP ist ein unspezifischer mitochondrialer Ionenkanal, dessen Öffnung vor allem durch hohe Kalziumkonzentrationen vermittelt wird und zum Zusammenbruch des mitochondrialen Potenzials, mitochondrialer Schwellung und Zelltod führt (45, 46). Gleichzeitig akkumulieren im ER ungefaltete Proteine und die unfolded protein response (UPR) wird ausgelöst (47). Welche Rolle ER-Stress und die UPR für den Ischämie/Reperfusionsschaden spielen, wird im Abschnitt 1.6 besprochen.

Durch Mangel an energiereichen Äquivalenten während der Hypoxie wird der weitere Abbau von ADP über AMP, Adenosin, Inosin, zum Hypoxanthin angestoßen (48). Unter hypoxischen Bedingungen wird die Xanthindehydrogenase, welche die Reaktion von Hypoxanthin zu Xanthin katalysiert und dabei Nikotinamidadenindinukleotid (NAD^+/NADH) als Koenzym benötigt, in die Xanthinoxidase umgewandelt, die dagegen elementaren Sauerstoff benötigt und diesen in reaktive Sauerstoffspezies (ROS) überführt (49). Die Umwandlung von Hypoxanthin in Xanthin durch die Xanthinoxidase mit der einhergehenden Produktion von ROS ist somit während der Hypoxie noch inhibiert.

Kommt es zur Reperfusion, so ist schlagartig wieder Sauerstoff verfügbar, und der extrazelluläre pH normalisiert sich. Der intrazelluläre pH gleicht sich zügig an, und aerober Stoffwechsel und oxidative Phosphorylierung werden wiederaufgenommen, wodurch die ATP Reserven der Zelle steigen (41). Die Inhibition des

Querbrückenzyklus wird durch die pH Normalisierung nach der Reperfusion wieder aufgehoben (50). Durch die weiterhin hohen zyttoplasmatischen Ca^{2+} Spiegel kommt es zu einer maximalen Kraftentwicklung mit mechanischem Zellschaden und somit Ausbildung einer irreversiblen Hyperkontraktur (51).

Gleichzeitig kommt es in der frühen Phase der Reperfusion zu einer verstärkten ROS Produktion (52). Die Xanthin Oxidase ist aufgrund des Sauerstoffangebots nicht mehr inhibiert, und durch den Abbau des aufgestauten Hypoxanthins entstehen ROS (49). Die ROS Produktion führt zu einer Verstärkung der Kalziumüberladung durch Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (40). Ein wichtiger Mechanismus dafür ist die Oxidation und somit Aktivierung von Ryanodinrezeptoren (53). Einhergehend mit der pH-Normalisierung und ROS Produktion bei vorhandener Kalziumüberladung öffnet sich die mPTP (54, 55). Der Prozess der ROS-Produktion läuft nach Öffnen der mPTP selbstverstärkend ab (56). In den Komplexen der Atmungskette kommt es zu oxidativen Schädigungen und consequenten Undichtigkeiten, wodurch weitere ROS abgegeben werden (57).

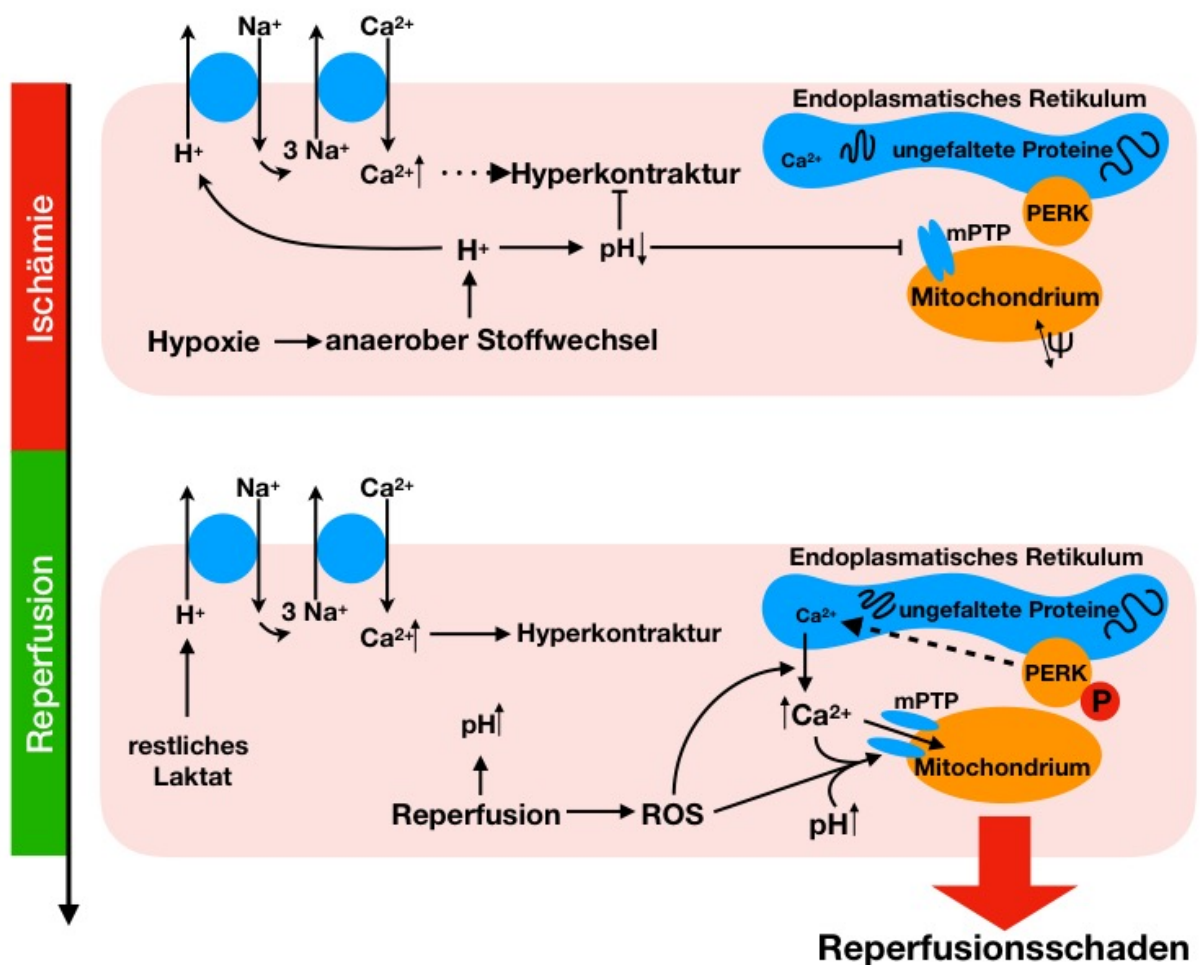


Abbildung 6 – Störung der zellulären Homöostase während der Ischämiephase und Reperfusion.

Pfeile kennzeichnen verstärkende Wirkungen, mit einem Strich endende Linien inhibierende Wirkungen.

1.5.2. Extrazelluläre Prozesse

Zu den intrazellulären Effekten des Ischämie-/Reperfusionsschadens addiert sich *in vivo* noch der Schaden, der von Immunzellen, Endothelzellen und vaskulärer Schädigung ausgeht. Durch Endothelschwellung, Vasospasmus, Einschwellen von Mikrothromben und Immunzellen sowie kapillärer Kompression durch Myokardödeme kann es zum „no-reflow“ Phänomen kommen (58, 59). „No-reflow“ bezeichnet keinen oder einen verminderten koronaren Fluss nach PCI (58). Ein vermindertes koronarer Fluss nach PCI ist mit einem erhöhten Auftreten von Herzinsuffizienz, Arrhythmien und Tod assoziiert (60). Der schlechtere Outcome deutet eine Verstärkung des Ischämie-/Reperfusionsschadens an. Zum „no-reflow“ Phänomen nach Ischämie/Reperfusion trägt die Kontraktion von Perizyten, die den Endothelzellen von außen aufgelagert sind, bei (61). Durch die Kontraktion der Perizyten, eventuell unter Mitbeteiligung weiterer extravasaler Zelltypen, können sich koronare Kapillaren verschließen und zu einer post-ischämischen Minderdurchblutung des betroffenen Areals führen (62). Des Weiteren bewirken vermehrte ROS eine geringere Bioverfügbarkeit von dem Vasodilatator NO (63). Zusätzlich werden durch Chemotaxe neutrophile Granulozyten in das Infarktgebiet gelockt, und wandern innerhalb von 24 Stunden in das Herzmuskelgewebe ein (39). Dort setzen sie ROS und lytische Enzyme frei, welche neben den beschädigten Kardiomyozyten auch noch funktionale Zellen angreifen (48). Eine Kalziumüberladung in geschädigten Endothelzellen bewirkt eine endotheliale Dysfunktion, welche die Leukozytenwanderung und ein extravasales Ödem weiter begünstigen (64). Extrazelluläre Prozesse können methodisch in dem hier verwendeten Modell nicht berücksichtigt werden.

1.5.3. Endogene Induktion der Apoptose im Kontext von I/R

Synonym zu Apoptose wird häufig der Begriff „programmierter Zelltod“ verwendet, welcher die Apoptose prägnant und zutreffend zusammenfasst. Der Begriff „Apoptose“ wurde erstmals 1972 verwendet und beschreibt einen von der Zelle aktiv gesteuerten Prozess, dem äußere oder innere Ursachen zugrunde liegen, und letztendlich zum Absterben der Zelle führt (65). Die Apoptose besitzt einen hohen physiologischen Stellenwert in Prozessen der Differenzierung des Organismus, Regulation der Zellzahl, und Beseitigung defekter oder (durch Viren) infizierter Zellen (66, 67). Jedoch

gibt es Situationen, wie Reperfusion nach Ischämie, z.B. bei PCI nach einem Myokardinfarkt, in denen verstärkte Apoptose zu einem zusätzlichen Zelluntergang und somit Organschädigung führt (68, 69).

Auf die extrinsische Induktion der Apoptose, beispielweise durch Immunzellen über Fas-Rezeptoren, wird in dieser Arbeit aufgrund der fehlenden Relevanz an isolierten Zellen nicht näher eingegangen. Vielmehr ist die intrinsische Regulation in diesem Modell interessant. Diverse Intrazelluläre Signale, beispielsweise DNA-Schäden, Radikale oder eine gestörte zelluläre Homöostase können Apoptose auslösen (70). Neben ihrer Rolle als Energielieferanten der Zelle besitzen Mitochondrien eine weitere Funktion mit der Regulation der Apoptose. Die mitochondrial permeability transition pore (mPTP), ROS, und Cytochrom C nehmen hierbei eine zentrale Rolle ein (71). Durch mitochondriale Dysfunktion, ROS Produktion und Kalziueinstrom kommt es zur Öffnung der mPTP und Verlust des inneren Membranpotenzials (72-74). Es konnte gezeigt werden, dass der Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials zur Induktion der Apoptose führt. Durch Verlust des Potenzials und der erhöhten Permeabilität der inneren Mitochondrialen Membran kommt es zum Anschwellen der Mitochondrien (73), und zur Erhöhung der Membranpermeabilität für Cytochrom C (71). Durch Freisetzen dieses proapoptotischen Proteins wird der programmierte Zelltod eingeleitet (74). Neben Apoptose kann ein Öffnen der mPTP auch zur Nekrose führen (75).

1.5.4. Strukturelle und funktionelle Veränderungen/Remodeling

Die myokardiale Ischämie sollte möglichst innerhalb der ersten zwei Stunden nach Beginn behoben werden, da mit zunehmender Ischämiedauer das mittlere Überleben der Patienten abnimmt (76). Ist durch den Infarkt ein schwerwiegender Schaden entstanden, so können sich auch nach Reperfusion längerfristige Konsequenzen entwickeln, denn myokardiale Ischämie ist einer der Hauptursachen von Herzinsuffizienz (77). Nach einem Herzinfarkt kommt es zum sogenannten Remodeling – ein komplexer multifaktorieller Prozess der biochemische, strukturelle und geometrische Veränderungen im Herzmuskel beschreibt (78). Im Prozess des Remodeling kommt es erstmal zu einem Entzündungsprozess durch Zytokinausschüttung (79). Matrix Metalloproteasen werden durch ROS und Zytokine

aktiviert (80). Durch die Metalloproteasen wird die Kollagenquervernetzung geschwächt und begünstigt so einen dilatativen Umbau (81). Resultierendes Narbengewebe verursacht eine gestörte Relaxation und somit diastolische Dysfunktion, und verstärkt die durch Zelltod entstandene systolische Insuffizienz (77). Zusätzlich zu den strukturellen Veränderungen finden diverse elektrophysiologische Veränderungen auf Ionenkanalebene statt, welche die Entstehung von Arrhythmien nach postischämischem Remodeling begünstigen (82).

1.6. ER Stress und die Unfolded Protein Response

Wenn fehlgefaltete Proteine im Lumen des endoplasmatischen Retikulums akkumulieren und die zellulären Korrekturmechanismen hierdurch überlastet sind, kommt es zum ER-Stress (83, 84). Ursächlich hierfür können endogene oder exogene Faktoren wie z.B. UV-Strahlung, reaktive Sauerstoffspezies, Hypoxie, Proteinmutationen oder Nährstoffentzug sein (85). Auch Ischämie/Reperfusion sowie *in-vitro* Hypoxie/Reoxygenierung führen zu ER Stress (86). Infolge dessen wird eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst, die sogenannte „unfolded protein response“ (UPR) (85, 87, 88). Die UPR ist eine zelluläre Antwort auf ER-Stress, und soll diesem primär entgegenwirken beziehungsweise bei schwerwiegenderer Schädigung die Apoptose einleiten (87, 88). Sie ist evolutionär von der Hefe bis zu Säugetieren hoch konserviert (89), und stützt sich hauptsächlich auf drei Signalgeber: PERK, inositol-requiring-enzyme 1 (IRE1), und activating transcription factor 6 (ATF6) (83, 88). Im Ruhezustand binden die Sensoren das Protein GRP78/BiP, welches diese inhibiert, und bei ER-Stress dissoziiert (90). Als „chaperone“ ist GRP78 im Rahmen der Proteinfaltung und Translokation unterstützend tätig.

1.6.1. PERK

Das Protein „PKR-like endoplasmic reticulum kinase“, kurz PERK, ist in der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert, und wurde erstmals 1998 beschrieben (91). Es besteht aus einer N-terminalen luminalen Domäne, die ins ER ragt, und einer zytosolischen Domäne, die die Kinase darstellt (84, 92). PERK ist eines der Hauptproteine, welche durch ER-Stress aktiviert werden und die entstandene Imbalance von korrekt und fehlgefalteten Proteinen detektieren kann (92). Der genaue

Aktivierungsmechanismus für PERK ist hierbei noch unklar. Jedoch spielt die Interaktion der Beta-Faltblatt Untereinheit von PERK mit fehlgefalteten Proteinen möglicherweise eine Rolle (92). Diese besitzt strukturelle Ähnlichkeit zu MHC Proteinen (85), was eine Protein-bindende Funktion nahelegt. Auch eine Sauerstoffabhängige Inhibition (ähnlich zu der von hypoxia-inducible-factor-1 (HiF1)) unter Ruhebedingungen wird diskutiert (93). Des Weiteren ist bekannt, dass PERK Moleküle sich zu einem Dimer zusammenlagern können, und durch Autophosphorylierung die Kinaseaktivität aktiviert wird (94). Neuerdings wurde entdeckt, dass PERK Moleküle auch tetramerisieren können (92, 95). Die im weiteren Ablauf stattfindende Autophosphorylierung läuft in der tetramerischen Konformation besonders effizient ab (95).

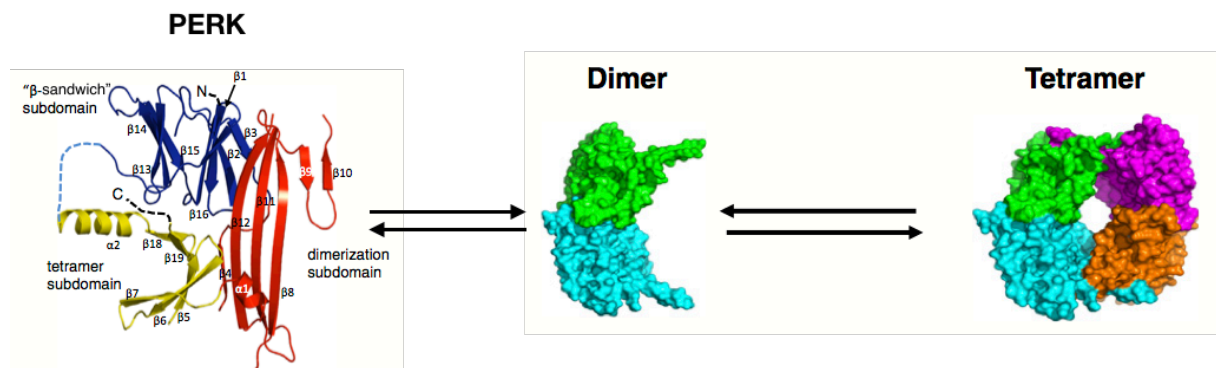


Abbildung 7 Struktur von PERK als Monomer, Dimer und Tetramer. Modifiziert nach (95).

Substrat des Kinaseanteils von PERK ist der eukaryotische Initiationsfaktor 2 alpha (eIF2 α), der in seinem phosphorylierten Zustand die Translation von mRNA in Proteine global hemmt (84). Diese Reaktion soll ER-Stress verringern, da infolge global verringerter Translation zwangsläufig weniger fehlgefaltete Proteine entstehen. Interessanterweise werden jedoch gleichzeitig bestimmte Proteine vermehrt exprimiert, welchen sowohl pro- als auch antiapoptotische Wirkungen zugeschrieben werden (87). Durch Phosphorylierung von eIF2 α wird der Transkriptionsfaktor ATF4 (activating transcription factor 4) vermehrt exprimiert, was einerseits zu vermehrter Expression von Chaperonen führt, die die Proteinfaltungskapazitäten verbessern sollen, andererseits aber auch die Expression von CHOP (C/EBP homologous protein) fördert, welches wiederum proapoptotisch wirkt (83, 87). Wie genau reguliert wird, welcher Pfad letztendlich überwiegt, ist noch nicht abschließend geklärt.

Des Weiteren wurde in den letzten Jahren zunehmend gezeigt, dass PERK neben der Wirkung auf die Translation direkte Interaktionen mit weiteren Substraten eingehen kann. Ein Zusammenhang zwischen phosphoryliertem PERK und erhöhter enzymatischer Aktivität des Calcineurins konnte bereits hergestellt werden (96, 97). Ferner konnte in einem Co-Immunopräzipitationsassay gezeigt werden, dass aktives PERK Calcineurin direkt bindet (98). Calcineurin erleichtert die Dissoziation von FKBP12.6, was die Öffnungswahrscheinlichkeit von Typ 2 Ryanodinrezeptoren erhöht und zu einem Kalziumeinstrom ins Zytosol führt (96, 99, 100). Dieser Kalziumeinstrom kann über ein Öffnen der mPTP zur Apoptose der Zelle führen (101). In Abbildung 8 sind der PERK/Calcineurin Weg und weitere Substrate von PERK im Kontext mit Apoptose aufgeführt.

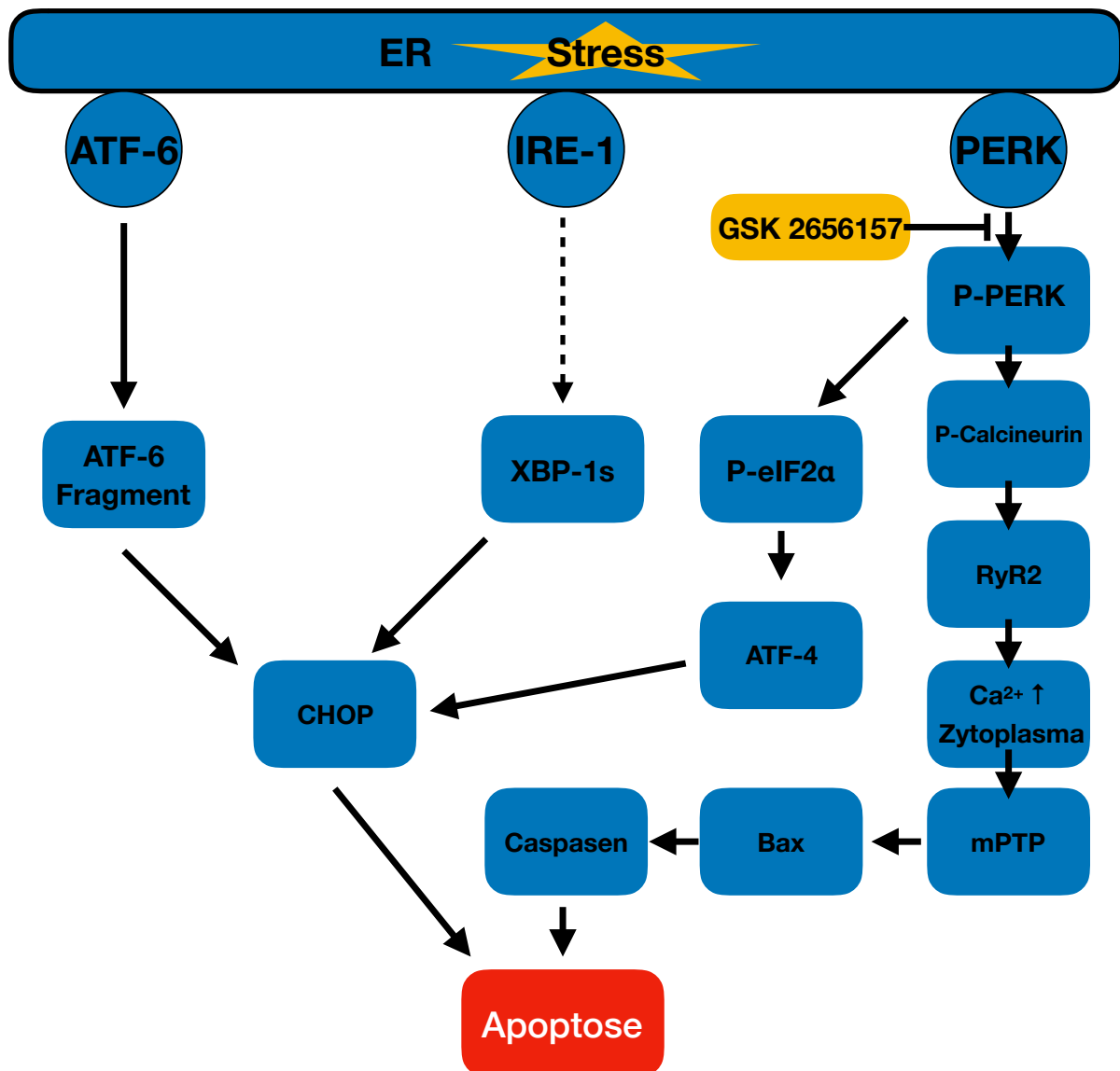


Abbildung 8 – Schematische Signalkaskade zu ER-Stress induzierter Apoptose mit Fokus auf PERK.

In Anlehnung an (99).

1.6.2. IRE1

Inositol requiring enzyme 1 (IRE1) ist wie PERK ein Transmembranprotein des ER (102). Seine luminale Domäne enthält auch eine MHC-ähnliche Bindungsstelle, die mit Proteinketten interagieren kann und möglicherweise den Aktivierungsmechanismus unter ER Stress darstellt (102). Die zytoplasmatische Domäne besitzt neben einer Kinaseaktivität auch eine Endoribonukleaseaktivität (87, 103). Nach luminaler Aktivierung kommt es zur Homodimerisierung und Autophosphorylierung von IRE1 mit anschließender Konformationsänderung, welche die Endoribonuklease aktiviert (87). Substrat der Endonuklease ist die X-Box-Binding-Protein (XBP1) mRNA, welche durch Splicing in den Transkriptionsfaktor XBP-1s umgewandelt wird (104). Dieser fördert unter anderem die Expression von Chaperonen (83), welche bei der Proteinfaltung assistieren und somit ER-Stress lindern sollen.

1.6.3. ATF6

Das Protein activating transcription factor 6 (ATF6) wird konstitutiv als 90 kDa großes ER Transmembranprotein exprimiert (105). ATF6 besitzt analog zu PERK und IRE1 eine luminale „Stresssensordomäne“ (83). Unter ER-Stress kommt es zum Transport in den Golgi-Apparat, wo durch die Proteasen S1P und S2P der eigentliche Transkriptionsfaktor, ATF6f (ATF6 Fragment) abgespalten wird (83). Dieser nukleäre Faktor steigert die Expression von Chaperonen, sowie den ER-assoziierten Proteinabbau (ERAD) (106).

1.7. Zielsetzung

Zielsetzung dieser Arbeit ist es, durch Testen des neuartigen PERK-Inhibitors GSK2656157, der möglicherweise klinisch eingesetzt werden könnte, Aspekte der Bedeutung von PERK für den zellulären Schaden infolge der Reoxygenierung nach Hypoxie (H/R) an isolierten Herzmuskelzellen zu untersuchen. Hierzu wurden folgende Hypothesen überprüft:

In isolierten Herzmuskelzellen kommt es nach Hypoxie/Reoxygenierung zu einer zytosolischen und mitochondrialen Kalziumüberladung.

Eine PERK Inhibition mit GSK2656157 vermindert diese H/R-vermittelte Kalziumüberladung.

Die PERK Inhibition mit GSK2656157 reduziert die H/R-vermittelte Apoptoserate in isolierten Herzmuskelzellen.

Um die erste Hypothese zu überprüfen wurde die zytosolische und mitochondriale Ca^{2+} -Konzentration mit den Fluoreszenzfarbstoffen Fluo-4 beziehungsweise Rhod-2 per konfokaler Lasermikroskopie nach Durchlaufen des H/R Protokolls gemessen. Hierbei wurden einmal Frame Scans und Transienten (siehe Material und Methoden) in den unterschiedlichen Gruppen abgeleitet. Zusätzlich wurden lichtmikroskopische Bilder angefertigt, in denen vitale beziehungsweise hyperkontraktile Zellen gezählt wurden, als Indiz für eine stattgefundene Kalziumüberladung.

Um zu überprüfen, ob eine PERK Inhibition diese Kalziumüberladung verringert wurden manche Gruppen mit dem PERK Inhibitor GSK2656157 in einer Konzentration von 2 μM inkubiert, die anderen entsprechend mit Vehikel. Anschließend wurden auch hier wieder Kalziummessungen per konfokale Lasermikroskopie durchgeführt.

Obwohl Rhod-2 per se schon ein mitochondrialer Kalziumfarbstoff ist, wurde die Anreicherung in den Kardiomyozyten per Kolokalisationanalyse mit Mitotracker Green FM überprüft, um ein möglichst mitochondriales Beladungsmuster sicherzustellen.

Um die letzte Hypothese zu überprüfen wurde die Apoptoserate nach H/R fluoreszenzmikroskopisch per TUNEL bestimmt.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten männliche Sprague-Dawley Ratten (Charles River Laboratories). Das jeweilige Versuchstier wurde vor Organentnahme in einer Narkosekammer mit Isofluran narkotisiert. Eine suffiziente Narkose kennzeichnete sich durch eine stark verlangsamte Atemfrequenz der Ratte, sowie Regungs- und Reflexlosigkeit. Letztere wurde durch einen starken Druck zwischen die Zehen überprüft. Anschließend wurde das Versuchstier zügig mittels einer Guillotine getötet.

2.2. Isolation ventrikulärer Rattenkardiomyozyten

Die Vorderseite des Tieres wurde mit einer 70% (v/v) Ethanollösung eingesprüht. Mit einer großen OP-Schere wurde das Abdomen knapp unterhalb des Zwerchfells durch einen Querschnitt eröffnet. Das Zwerchfell wurde durchtrennt, und eine 10 mL eisgekühlte, isotone NaCl Lösung in den Thorax gespült. Hierdurch sollte die Stoffwechselaktivität des Herzens heruntergefahren werden und die Kardiomyozyten geschont werden. Während eine Hand das Thoraxfell spannte, wurden die Rippen durchtrennt und das Thoraxfell als Lappen nach oben geklappt. Bei freier Sicht auf das Herz wurde in den linken Ventrikel 0,4 mL einer 1:1 Mischung aus Isolationstyrode (Tabelle 1) und Heparin (Rotexmedica, 25000 IE/5 mL) injiziert. Hierfür wurde eine 1 mL Plastikspritze und eine 30G Kanüle verwendet. Die Gerinnselbildung in den Koronarien konnte somit verhindert werden.

Substanz	Konzentration (mmol/l)	Gelöst in ddH ₂ O pH 7,40 bei 37°C mit NaOH
NaCl	113	
KCl	4,7	
KH ₂ PO ₄	0,6	
Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O	0,6	
MgSO ₄ * 7H ₂ O	1,2	
NaHCO ₃	12	
KHCO ₃	10	
HEPES	10	
Taurin	30	
Glukose	5,5	
2,3-Butanedionmonoxim	10	

Tabelle 1 - Isolationstyrode, ddH₂O = zweifach destilliertes Wasser

Anschließend wurde mit einer Pinzette ein Faden (Ethicon Vicryl® Polyglactin 910) unter der Aorta hindurchgezogen und ein doppelter Maschinenknoten locker vorgelegt. Die Aorta wurde mit einer Gefäßschere von oben angeschnitten, und in das Lumen eine Kanüle bis kurz oberhalb der Koronarienabgänge eingeführt. Die Kanüle wurde zuvor mit einem Kanülenhalter sowie einem Infusionssystem gefüllt mit Isolationstyrode verbunden, sodass sie blasenfrei entlüftet blieb.

Der vorgelegte Knoten wurde zugezogen, und das Herz durch einen weiteren Knoten in Gegenrichtung an der Kanüle gesichert. Durch diese Methode der in-situ Kanülierung konnte eine kürzere Dauer von Beginn der Explantation bis zum Beginn der Perfusion gewährleistet werden. Gebliebene Verbindungen des Herzens zum Thorax wurden durchtrennt und das Herz an eine Langendorff-Perfusionsanlage (Langendorff 1895, Abbildung 9) überführt. Mit einer Flussgeschwindigkeit von 2,6 mL/min wurde die Enzymlösung (Tabelle 2) retrograd in die Aorta und somit in die Koronarien befördert.

Trypsin 2,5% (Gibco)	200 μ L	Gelöst auf 40 mL Zielvolumen in Isolationstyrode
Liberase™ TM Research Grade (Roche) 50 mg gelöst in 10 mL ddH ₂ O	300 μ L	
CaCl ₂ 10 mM	50 μ L	

Tabelle 2 Enzymlösung

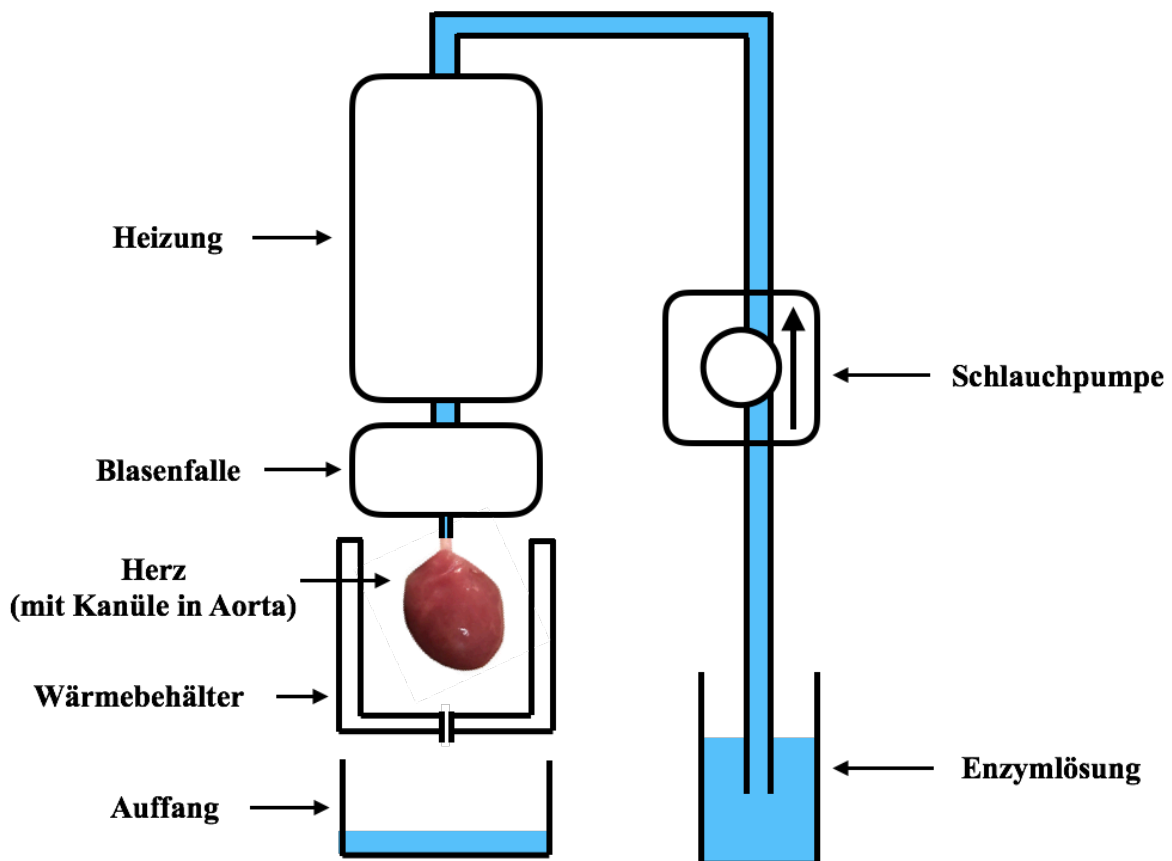


Abbildung 9 Schematischer Aufbau des Langendorff Perfusionsapparates

Nach vollständigem Durchlaufen der Enzymlösung wurden die Ventrikel von dem kanülierten Herzen abgetrennt und in eine Petrischale mit Stopplösung (Tabelle 3) überführt. Das Herz hatte durch den enzymatischen Verdau nun eine weiche Konsistenz. Die Mischung aus Kollagenasen und Proteasen in der Enzymlösung löst interzelluläre Verbindungen und ermöglicht die schonende Gewinnung isolierter Zellen aus Gewebe. Durch sanftes Auseinanderziehen wurde das Herz zerkleinert. Übrige Gewebestücke wurden langsam auf- und abpipettiert, um weitere Zellen aus dem Verband zu lösen. Die Stopplösung samt Zellen wurde anschließend durch ein Zellsieb (Porengröße 200 μ m) gefiltert. Die Zellsuspension wurde alle 7 Minuten schrittweise

steigenden Kalziumkonzentrationen ausgesetzt, um kalziumtolerante Kardiomyozyten zu erhalten. Zwischen den Schritten wurde der Überstand verworfen.

FBS	1 mL	Gelöst auf 10 mL Zielvolumen in Isolationstyrode
CaCl ₂ 10 mM	12,5 µL	

Tabelle 3 Stopplösung

Schritt	CaCl ₂ Konzentration	Volumen CaCl ₂ 100 mM	Jeweils auf 10 mL Zielvolumen in Isolationstyrode mit 10% (v/v) BCS gelöst
1	0,1 mM	10 µL	
2	0,2 mM	20 µL	
3	0,4 mM	40 µL	
4	0,8 mM	80 µL	
5	1,2 mM	120 µL	

Tabelle 4 Kalziumaufbaulösungen

2.3. Normoxische und hypoxische Kultur der Primärzellen

Das im letzten Schritt der Isolation erhaltene Pellet wurde mit 1 mL Kulturmedium I (Tabelle 6) resuspendiert, und hiervon 300 µL in eine Zellkulturflasche (Cellstar® Cat.-No.: 690175) mit den restlichen 9 mL vorgewärmten Kulturmedium I überführt. Anschließend wurden je 200 µL Zellsuspension auf die Messkammern pipettiert. Diese wurden zuvor mit jeweils 2,5 µL unverdünntem Laminin (L2020, Sigma-Aldrich) pro Kammer mit einer Pipette möglichst gleichmäßig beschichtet. Als natürlicher Bestandteil von Basalmembranen ermöglicht das Glykoprotein Laminin ein Anhaften der Zellen an der Messkammer.

Damit sich die Kardiomyozyten aus der Suspension absetzen konnten, wurden die Messkammern 20 Minuten lang bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach erfolgte ein Mediumwechsel in den Normoxiegruppen auf 400 µL Kulturmedium II (Tabelle 7) ± den PERK Inhibitor GSK2656157 (2 µM) beziehungsweise DMSO, mit weiterer Kultur bei 37°C und 5% CO₂. Die Hypoxiegruppen wurden in eine Hypoxiekammer (H35 Hypoxystation, Don Whitley Scientific) bei 0,5% O₂, 94,5% N₂, 5% CO₂ geschleust. In der Kammer erfolgte ein Mediumwechsel auf 400 µL Hypoxietyrode pro Messkammer

(Tabelle 5) ± GSK2656157 (2 µM) beziehungsweise DMSO. Die Hypoxietyrode wurde bereits 24h vorher in einer Zellkulturflasche (CellStar® Culture Flask 690175) eingeschleust, damit gelöster Sauerstoff entweichen kann. Nach zwei Stunden hypoxischer Inkubation wurden die Hypoxiegruppen wieder ausgeschleust und sofort einem Mediumwechsel auf Kulturmedium II ± Inhibitor beziehungsweise Vehikel unterzogen. Diese zügige Reoxygenierung simulierte die Reperfusion durch PCI. Nach weiteren 15 min normoxischer Inkubation folgte die Farbstoffbeladung mit den Fluoreszenzfarbstoffen. Für die TUNEL Methode wurden entsprechend längere Reoxygenierungsdauern verwendet, auf die in dem Abschnitt 3.7 näher eingegangen wird.

Substanz	Molarität (mM)	Gelöst in ddH ₂ O pH 6,40 bei 37°C mit NaOH
NaCl	130	
KCL	5	
CaCl ₂	1,8	
MgCl ₂	1	
2-Deoxyglukose	20	
Penicillin-Streptomycin 100x	1% v/v	

Tabelle 5 Hypoxietyrode

Medium 199	9,8 mL
Insulin-Transferrin- Selenium 100x	0,1 mL
Penicillin-Streptomycin 100x	0,1 mL

Tabelle 6 Kulturmedium I

Medium 199	9,9 mL
Penicillin-Streptomycin 100x	0,1 mL

Tabelle 7 Kulturmedium II

2.4. Der PERK-Inhibitor GSK2656157

Für die PERK-Inhibition wurde der selektive Inhibitor GSK2656157 (Selleck Chemicals, Catalog No.S7033) in einer Konzentration von 2 μM verwendet. Er wirkt als ATP kompetitiver Inhibitor, der die Autophosphorylierung und somit Aktivierung von PERK zu Phospho-PERK (P-PERK) und die Substratphosphorylierung von eIF2a hemmt (107). Da die Hemmung eIF2a unabhängig geschieht und die Autophosphorylierung von PERK verhindert, könnte der Inhibitor auch eIF2a unabhängige Effekte von P-PERK hemmen. In einem Aktivitätsassay von Atkins et al., das 300 weitere Kinasen untersuchte zeigt sich eine IC_{50} von PERK bei einer Konzentration von nur 0,9 nM GSK2656157 (107). Die IC_{50} ist somit >100 Mal niedriger als für andere Kinasen aus dem genannten Assay. Ferner wurde in dem selbigen Assay bei 10 μM Inhibitorkonzentration die prozentuale Inhibition der Kinasen gemessen. Aus supplementären Daten ist zu entnehmen, dass auch die Kalzium-Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CAMKII), welche eine große Rolle in der Kalziumhomöostase der Kardiomyozyten spielt, untersucht wurde. Im Herzen werden primär die Isoformen CAMKII δ und CAMKII γ exprimiert (108). Selbst in einer hohen Konzentration von 10 μM in direkter Kinasenumgebung wurde die Aktivität nur um 17,69% (CAMKII γ) beziehungsweise 19,61% (CAMKII δ) gegenüber einer Kontrolle mit DMSO reduziert (107).

GSK2656157		IC₅₀ (nmol/l)	Kinase	IC₅₀ (nmol/l)
	EIF2AK3 (PERK)	0.9	JAK2	24,547
	EIF2AK1 (HRI)	460	ACK1	>10,000
	BRK	822	MLK3	>10,000
	EIF2AK2 (PKR)	905	TRKA	>10,000
	MEKK2	954	MLK1	>10,000
	Aurora B	1,259	FLT1	>10,000
	KHS	1,764	KDR	>10,000
	LCK	2,344	JNK1	>16,595
	MLK2	2,796	RIPK2	>25,000
	MEKK3	2,847	ASK1	>27,500
	ALK5	3,020	BTK	>27,500
	MLCK2	3,039	EGFR	>27,500
	EIF2AK4 (GCN2)	3,162	GSK3B	>27,500
	c-MER	3,431	IKK1	>27,500
	PI3K γ	3,802	IKK2	>27,500
	WNK3	5,951	ITK	>27,500
	LRRK2	6,918	JAK1, 3	>27,500
	ROCK1	7,244	JNK3	>27,500
	MSK1	8,985	p38 α	>27,500
	NEK1	9,807	PI3K α , β , δ	>27,500
AXL	9,808	Aurora A	>27,500	

Abbildung 10 Strukturformel des PERK Inhibitors GSK2656157 und IC₅₀ Werte einiger Kinasen.

Modifiziert nach (107).

Da die intrazelluläre Konzentration des Inhibitors in diesem Fall jedoch entscheidend ist, werden für das Arbeiten in Zellkultur deutlich höhere Konzentrationen im Medium benötigt. Atkins et al. konnten zeigen, dass eine für die Expression UPR-induzierter Gene wie z.B. CHOP relevante PERK Inhibitorin in pankreatischen Tumorzellen der Linie BxPC3 bereits mit einer Konzentration von 1 μ M extrazellulär vorliegt (107). Aufgrund der Effektstärke des simulierten Ischämie-Reperfusionsschadens und der Präinkubationsdauer von zwei Stunden während der Hypoxie sowie der anderen Zellart wurde die doppelte Konzentration (2 μ M) für die Inhibitionsgruppen ausgewählt.

2.5. Technik der selektiven mitochondrialen Beladung mit Rhod-2-AM

Für die mitochondriale Kalziummessung wurde der Kalziumfluoreszenzfarbstoff Rhod-2-AM (CA707-50023, Promokine) gewählt. Dieser liegt als Acetoxymethylester vor, und kann somit die Zellmembran (und mitochondriale Membran) der Kardiomyozyten leichter passieren. Durch intrazelluläre Esterasen wird nach passieren der Zellmembran die Estergruppe abgespalten, und es bleibt der Fluoreszenzfarbstoff Rhod-2 übrig. Obwohl Rhod-2 per se eine Affinität zu Mitochondrien besitzt, wurden in dieser Arbeit weitere Schritte unternommen, um die Spezifität der Beladung zu erhöhen (109). Hierzu wurde eine „kalte Beladung“ bei 4°C durchgeführt. Diese Technik der kalten Beladung wurde in abgewandelter Form nach Trollinger et al. durchgeführt (109). Bei dieser Temperatur ist die Aktivität der zellulären Esterasen stark herabgesetzt, und der Farbstoff kann ungehindert bis durch die mitochondriale Membran diffundieren, was ein mitochondriales Beladungsmuster favorisiert (109). Durch anschließende Erwärmung auf 25°C wird der Ester durch nun wieder aktive Esterasen gespalten und verbleibt in polarer, membranundurchdringlicher Form hauptsächlich in den Mitochondrien (Abbildung 11). Um für die Diffusion in die Mitochondrien ausreichend Zeit zu lassen, wurde eine Beladungsdauer von 2 Stunden gewählt. Damit sich während dieser Zeit kein Farbstoff absetzt, wurden die Messkammern auf einer mechanischen Schwenkplatte gelagert, die mit 60 rpm Kreisbewegungen ausführte. Um eine ausreichende Viabilität der Kardiomyozyten während dieses Prozesses zu gewährleisten erfolgten Temperaturanpassungen stets mit einer Anpassungsdauer von 2-3 min erst auf Raumtemperatur, und danach in einem Kühlraum auf 4°C, bevor ein Mediumwechsel der Messkammern mit der bereits vorgekühlten Farbstofflösung erfolgte. Dasselbe gilt für die Wiedererwärmung auf Raumtemperatur nach Ende der Beladungsdauer.

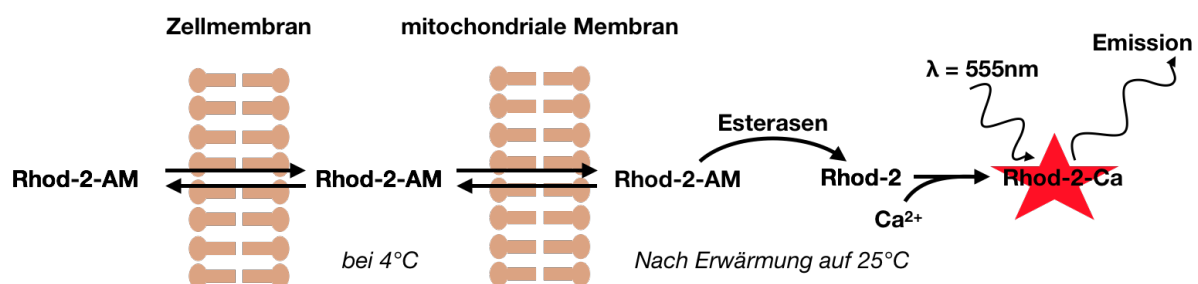


Abbildung 11 Beladung eines Kardiomyozyten mit Rhod-2-AM (schematisch)

2.5.1. Herstellung der Beladungslösung mit Rhod-2-AM

Das Farbstoffpulver (100 µg) wurde mit 88 µL DMSO aufgelöst, sodass sich eine Stockkonzentration von 1 mM ergab. Dieser wurde bei -20°C lichtgeschützt aufbewahrt. Zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit der Esterform des Farbstoffes wurde Pluronic-F127 (20% w/v in DMSO), ein Detergens, in der späteren Beladungslösung verwendet. Um den Farbstoff ausreichend mit Pluronic zu vermischen und eine Mizellenbildung des Detergens zu begünstigen, wurden zuerst diese zwei Stoffe in einem lichtgeschütztem Eppendorf Cup durch 50-maliges Auf- und Abpipettieren vermischt. Durch Zugabe von Messpuffer mit BCS (wichtig: pH 7,40 bei 4°C) ergab sich schließlich die Zielkonzentration von 5 µM Rhod-2-AM in der Beladungslösung. Zusätzlich wurde für die entsprechenden Gruppen eine separate Beladungslösung hergestellt, in die noch der PERK Inhibitor GSK2656157 (2 µM) zugegeben wurde. Die Beladungslösung (Tabelle 9) wurde täglich frisch und unter Lichtausschluss hergestellt. Des Weiteren erfolgten alle Arbeiten mit allen Fluoreszenzfarbstoffen unter Lichtausschluss beziehungsweise schwachem Rotlicht, um ein Ausbleichen des Farbstoffs zu vermeiden.

Substanz	Molarität (mM)	Gelöst in ddH ₂ O pH 7,40 bei 37°C mit NaOH
NaCl	140	
KCL	5	
CaCl ₂	1	
MgCl ₂	1	
HEPES	10	
Glukose	10	

Tabelle 8 Messtyrode

Rhod-2-AM Stock (1 mM)	7,5 µL	Gelöst in Messtyrode + 10% (v/v) BCS auf 1,5 mL Zielvolumen Tyrode mit BCS: pH 7,40 bei 4°C mit HCl
Pluronic-F127 (20% w/v in DMSO)	1 µL	

Tabelle 9 Beladungslösung Rhod-2-AM

2.6. Zytosolische Beladung mit Fluo-4-AM

Für die zytosolische Kalziummessung wurde der Kalziumfluoreszenzfarbstoff Fluo-4-AM (Invitrogen™, F14201) gewählt, welcher auch als Acetoxymethylester vorliegt. Wie oben beschrieben gelangt er durch die Zellmembran und verbleibt dort nach Spaltung durch intrazelluläre Esterasen. Die Beladung wurde für 12 ½ min bei Raumtemperatur (25°C) durchgeführt.

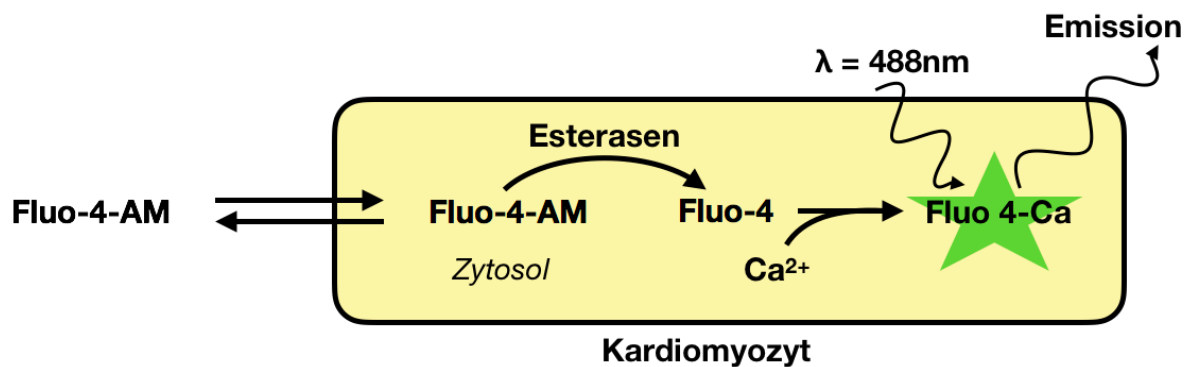


Abbildung 12 Beladung eines Kardiomyozyten mit Fluo-4-AM (schematisch)

2.6.1. Herstellung der Beladungslösung mit Fluo-4-AM

Das Farbstoffpulver (50 µg) wurde mit 45 µL DMSO aufgelöst, sodass sich eine Stockkonzentration von 1 mM ergab. Dieser wurde bei -20°C lichtgeschützt aufbewahrt. Für die Herstellung der Beladungslösung wurde wie für Rhod-2-AM beschrieben zuerst Fluo-4-AM Stock mit Pluronic vermengt. Durch Zugabe von Messpuffer (pH 7,40 bei 25°C) ergab sich schließlich die Zielkonzentration von 10 µM Fluo-4-AM in der Beladungslösung. Zusätzlich wurde für die entsprechenden Gruppen eine separate Beladungslösung hergestellt, in die noch der PERK Inhibitor GSK2656157 (2 µM) zugegeben wurde. Die Beladungslösung (Tabelle 10) wurde täglich frisch und unter Lichtausschluss hergestellt.

Fluo-4-AM Stock (1 mM)	5 µL	Gelöst in Messtyrode (pH 7,40 bei 25°C) auf 0,5 mL Zielvolumen
Pluronic-F127 (20% w/v in DMSO)	1 µL	

Tabelle 10 Beladungslösung Fluo-4-AM

2.7. Anfärben der Mitochondrien mit Mitotracker™ Green FM

Mitotracker™ Green FM ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der selektiv Mitochondrien anfärbt. Aufgrund seines Absorptionsmaximums bei 490 nm und Emissionsmaximums bei 516 nm lässt er sich parallel zu Rhod-2 verwenden. Im Anschluss an die zweistündige kalte Beladung mit Rhod-2-AM und eine kurze Anpassung an Raumtemperatur (unter Lichtausschluss) wurde die Rhod-2-Beladungslösung gegen vorgewärmte Mitotracker™ Green FM Beladungslösung getauscht und anschließend 30 min in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.7.1. Herstellung der Beladungslösung mit Mitotracker™ Green FM

Das Farbstoffpulver (50 µg) wurde mit 74 µL DMSO aufgelöst, sodass sich eine Stockkonzentration von 1 mM ergab. Es erfolgte eine Zwischenverdünnung auf 20 µM in DMSO, da die benötigte Endkonzentration nur sehr gering war. Der Stock und die Zwischenverdünnung wurden bei -20°C lichtgeschützt aufbewahrt. Die Beladungslösung wurde am Tag der Messung frisch angesetzt und bestand aus 5 µL Zwischenverdünnung (20 µM), 1 µL Pluronic, und 494 µL Medium 199, was einer Mitotracker Green™ FM Endkonzentration von 200 nM entspricht. Diese Konzentration liegt innerhalb des Bereiches, in dem die Herstellerfirma Invitrogen noch eine selektive Anfärbung der Mitochondrien gewährleistet. Der Farbstoff wurde mit Pluronic zuerst durch Auf- und Abpipettieren vermischt, und nach Mediumzugabe auf 37°C vorgewärmt.

2.8. Konfokalmikroskopie

2.8.1. Grundlagen der konfokalen Lasermikroskopie

Die Konfokalmikroskopie unterscheidet sich von der konventionellen Lichtmikroskopie dadurch, dass immer nur eine gewisse Schichtdicke eines Präparates betrachtet wird. Dies wird durch den Einbau einer Lochblende (englisch Pinhole) in den Lichtstrahl vom Präparat zum Objektiv/Detektor erreicht. Das Licht, welches sich außerhalb der Fokusebene befindet, trifft auf die Lochblende und wird ausblendet (siehe Abbildung

14). Bei der CLSM (Abkürzung, englisch: confocal laser scanning microscopy) Technik, die auch das Zeiss LSM 700 verwendet, ist ein Laserstrahl durch eine Anordnung an Spiegeln in zwei Richtungen ablenkbar, sodass sich eine Ebene „abtasten“ lässt. Zu einem gewissen Zeitpunkt wird immer nur ein Punkt beleuchtet, und hiervon das Emissionslicht gemessen. Durch Zusammenfügen dieser Information lässt sich in der Mikroskopsoftware ein Bild des Präparates generieren. Photomultiplier detektieren per se nur Grauwerte, dessen Anzahl durch die Bittiefe der Aufnahme bestimmt wird. Bei der hier verwendeten maximalen Einstellung von 16bit sind es $2^{16} = 65536$ verschiedene Helligkeitsstufen. Zur besseren Veranschaulichung werden die Bilder jedoch mit einer dem Emissionslicht entsprechenden Farbe künstlich eingefärbt.

2.8.2. Erläuterung zur Wahl der Farbstoffe und zum Mikroskop-Setup

Um parallel zytosolisches und mitochondriales Kalzium in derselben Zelle zu messen müssen einige Bedingungen erfüllt sein. Es werden zwei Fluoreszenzfarbstoffe benötigt, die deutlich unterschiedliche Emissionsspektren aufweisen, um später eine klare Signaltrennung zu haben. Hierfür eignen sich beispielweise Fluo-4 und Rhod-2, wobei Fluo-4 Kalzium im Zytosol bindet, und Rhod-2 sich tendenziell eher in die Mitochondrien verteilt (110), wobei diese Verteilung durch die Technik der kalten Beladung (oben beschrieben) weiter verstärkt wird. Fluo-4 besitzt sein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 494$ nm, Rhod-2 dagegen bei $\lambda = 556$ nm. Dies erfordert eine parallele Anregung mit zwei unterschiedlichen Lasern, hier durchgeführt mit 488 nm und 555 nm. Die relative Absorption als Prozentzahl des Maximalwertes ist in Abbildung 13 dargestellt.

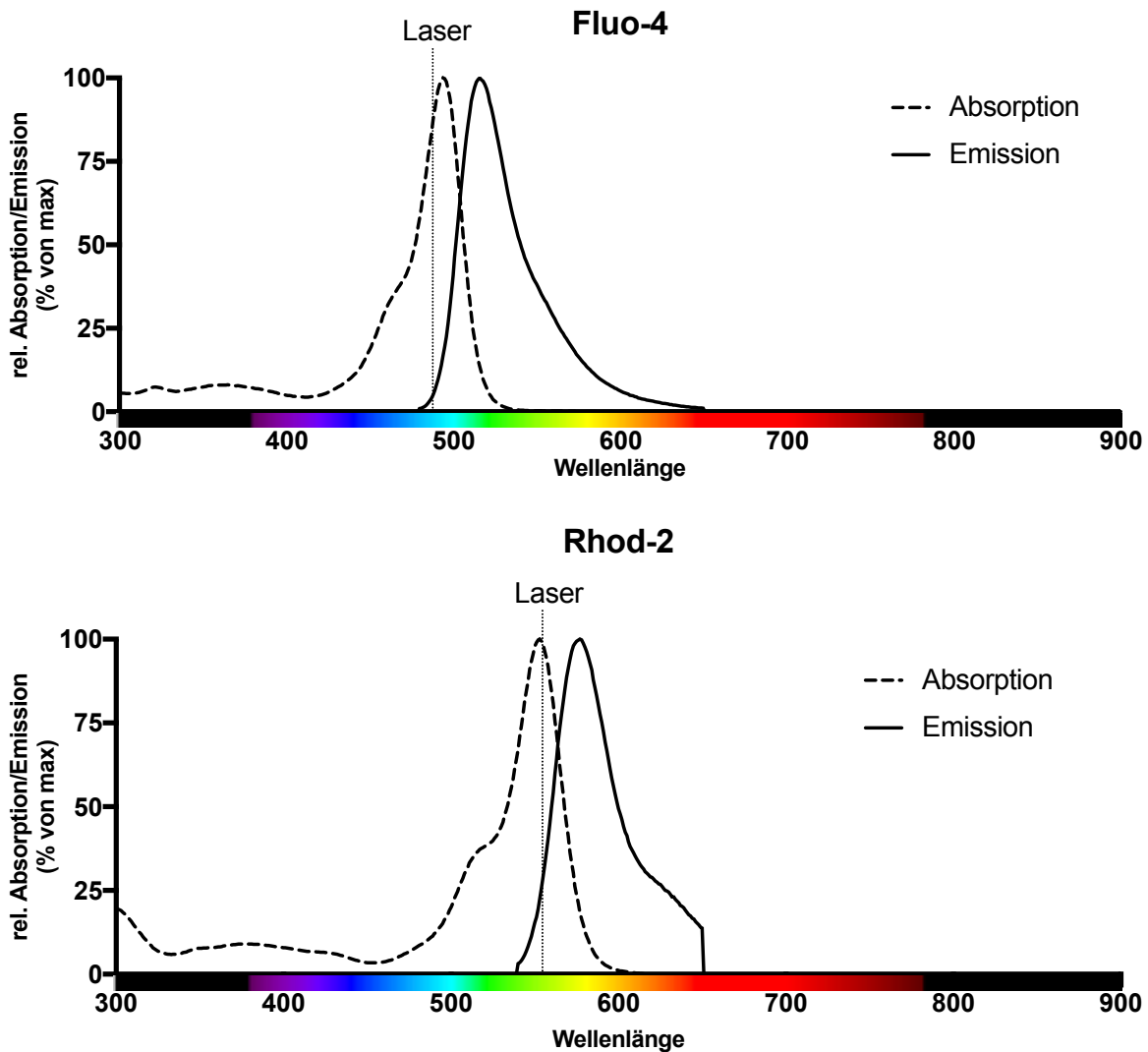


Abbildung 13 Relative Absorption und Emission von Fluo-4 und Rhod-2.

Tabellenwerte für die Absorption/Emission von Thermofischer Fluorescence Spectraviewer (111).

Hieraus lässt sich erkennen, dass eine Anregung bei den genannten Wellenlängen dicht am jeweiligen Absorptionsmaximum ist. Die kombinierten Emissionskurven sind in Abbildung 15 dargestellt. Um letztendlich das Emissionslicht aufzuteilen, wurde ein variabler sekundärer dichrotischer Spiegel (VSD) verwendet, welcher auf eine Trennung bei 555 nm eingestellt wurde. Ein dichrotischer Spiegel reflektiert Licht mit gewissen Wellenlängen und lässt anderes hindurch, wobei ein VSD entsprechend eingestellt werden kann (siehe Abbildung 14). Licht, welches eine Wellenlänge unter 555 nm hat wird zu dem ersten Photomultiplier geleitet, längerwelligeres Licht zu dem zweiten Photomultiplier. Ein Photomultiplier (PMT) ist ein Gerät, welches schwache Lichtsignale verstärkt und in ein elektrisches Signal umwandelt. Zusätzlich wurde der Lichtstrahl zu dem ersten PMT durch einen optischen Filter vom Typ „short pass 555 nm“ geleitet, das heißt, nur Licht mit einer kürzeren Wellenlänge kann passieren. Licht

zum zweiten PMT wurde durch einen „Long Pass 560 nm“ Filter geleitet, es kann also nur Licht mit $\lambda > 560$ nm passieren. Es wurde jeweils ein 40x Objektiv (Ölimmersion) verwendet.

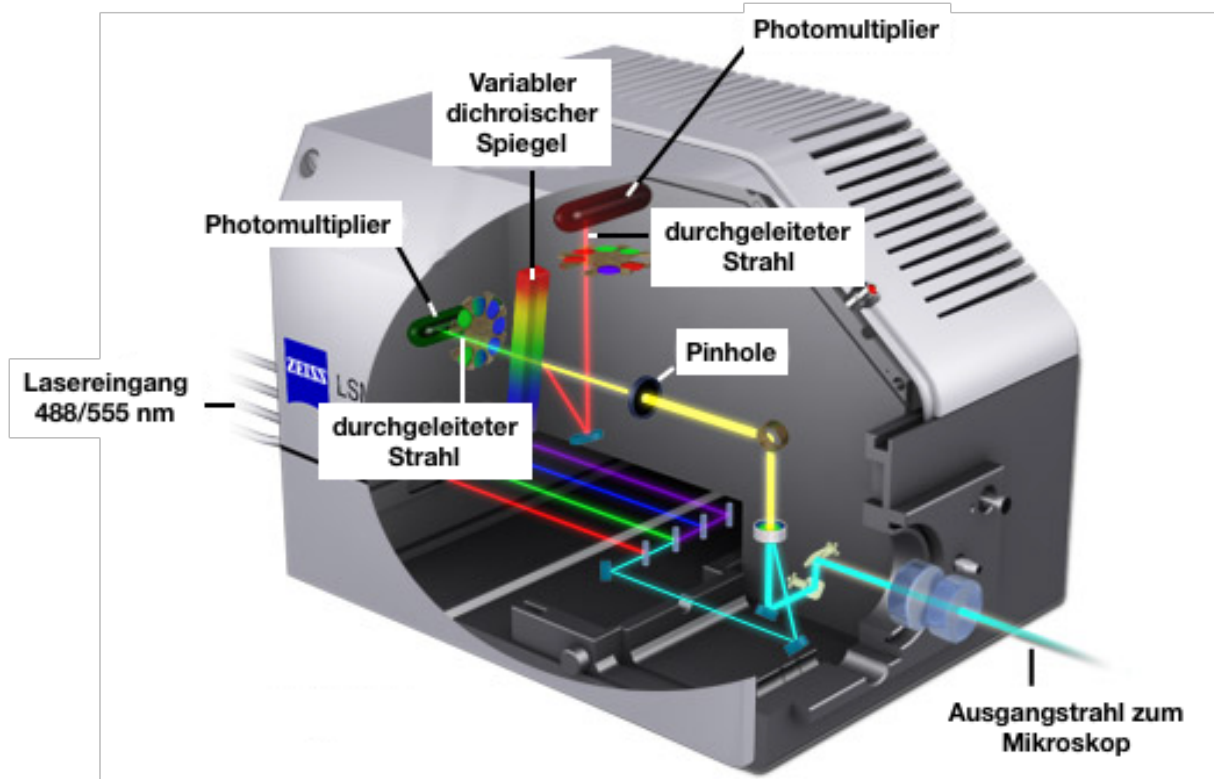


Abbildung 14 Lichtwege im Zeiss LSM 700 konfokalem Lasermikroskop.

Durch vertikale Verschiebung des VSD lässt sich festlegen, bis zu welcher Wellenlänge des Emissionslichts der erste beziehungsweise ab welcher Wellenlänge der zweite PMT Licht empfangen. Der VSD lässt sich auf $\Delta\lambda=1$ nm einstellen, es lassen sich jedoch noch weitere optische Filter nachschalten. Durch eine Verengung der Lochblende (pinhole) lässt sich die betrachtete Schichtdicke verringern. (Bildquelle: Carl Zeiss, modifiziert nach (112))

Um Schwankungen der Fluoreszenzintensität zwischen Messtagen zu vermeiden wurde immer das gleiche Beladungsprotokoll durchgeführt und die gleichen Aufnahmeeinstellungen verwendet.

Für die Aufnahme der Bilder (Framescans) wurden folgende Einstellungen verwendet:

Lasertransmission = 2,0 (in Prozent, beide Laser)

Pinhole 1,99 AU (Airy Units), entspricht einer Schichtdicke von 1,6 μm

Signalverstärkung (beide PMT): Master Gain = 600

Auflösung = 512x512 Pixel bei 16 Bit Tiefe, mit maximaler Abtastgeschwindigkeit

Aufnahmeeinstellungen Line Scans:

Lasertransmission = 2,0 (in Prozent, beide Laser)

Pinhole 1,99AU (Airy Units), entspricht einer Schichtdicke von 1,6 μ m

Signalverstärkung PMT1 (Fluo-4): Master Gain = 450

Signalverstärkung PMT2 (Rhod-2): Master Gain = 500

Auflösung = 512x1 Pixel bei 16bit Tiefe

Zyklusdauer 945,54 μ s, 8000 Zyklen, keine Intervallpause

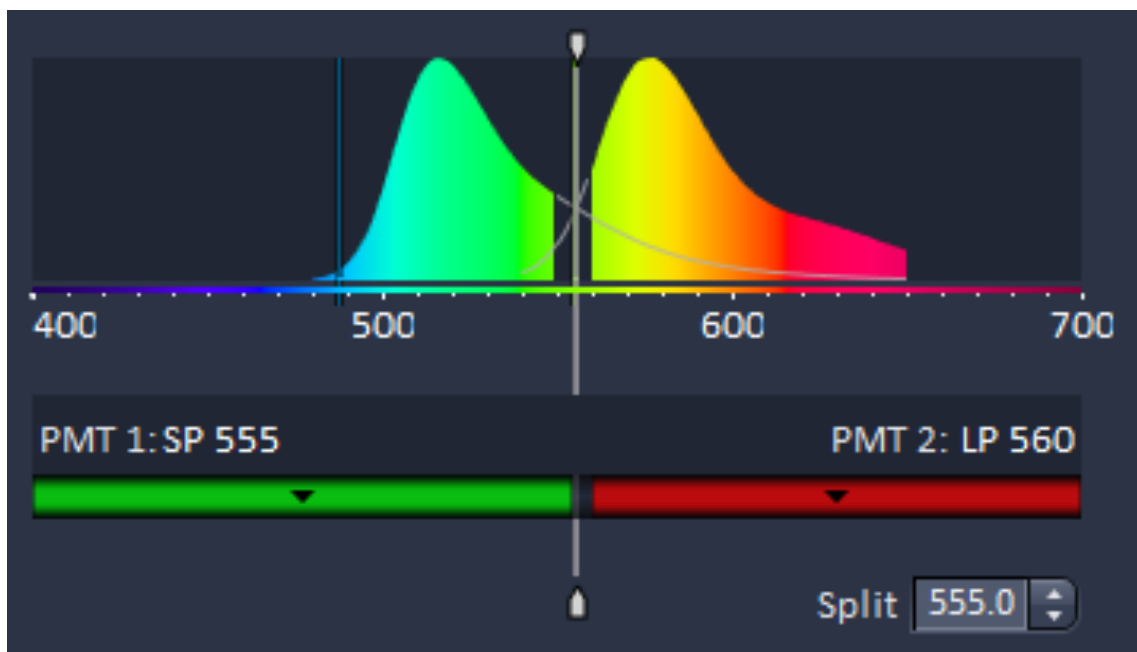


Abbildung 15 Emissionsspektren von Fluo-4 und Rhod-2 bei paralleler Anregung.

Bildschirmfotoausschnitt aus Zen 2012 Black Software (Zeiss)

2.8.3. Ablauf einer Messung

Nach Ablauf der Rhod-2-AM Beladungszeit und kurzer Aufwärmphase erfolgte ein Mediumwechsel der Messkammern auf Messpuffer, um eine weitere Aufnahme des Farbstoffes zu verhindern. Eine zufällig ausgewählte Messkammer wurde anschließend mit Fluo-4-AM beladen, indem ein zügiger Mediumwechsel auf die Beladungslösung erfolgte (für Details zu der Beladung siehe die Abschnitte 2.5 bis 2.7). Im weiteren Verlauf erfolgte die Fluo-4 Beladung der weiteren Kammern in gestaffelter Reihenfolge. Zuerst wurden pro Kammer von ca. fünf Zellen Framescans erstellt, um ein basales Kalziumniveau nach Hypoxie/Reoxygenierung zu ermitteln. Ein Framescan wird als Bild aus mehreren parallelen Linien erstellt, die der Laser abtastet.

Anschließend wurden die Kardiomyozyten elektrisch stimuliert. Hierfür wurde ein Stimulatorendraht in die Messkammer eingesetzt, der mit dem Stimulator (IonOptics Myopacer Cell Stimulator, 20 V, 1 Hz) verbunden wurde. Um einen Zustand gleichmäßiger Kalziumtransientenamplitude zu erreichen, den sogenannten „steady state“, wurde zwei Minuten gewartet, bevor die Messung der Transienten begann (das „Einschlagen“).

Hierfür wurde auf die Aufnahmeeinstellung „Line Scan“ gewechselt. Die Filtereinstellungen blieben gegenüber den Framescans unverändert.

Eine Linie wurde durch die zu messende Zelle gelegt, entlang derer der Laser dann anregt. Alle 945,54 μs war ein Zyklus vollendet, es wurden 8000 Zyklen hintereinander gemessen. Die hohe Abtastrate ist notwendig um die Transienten, besonders den Anstieg, in ausreichender zeitlicher Auflösung abzubilden. Eine beispielhafte Originalaufnahme ist in Abbildung 16 dargestellt.

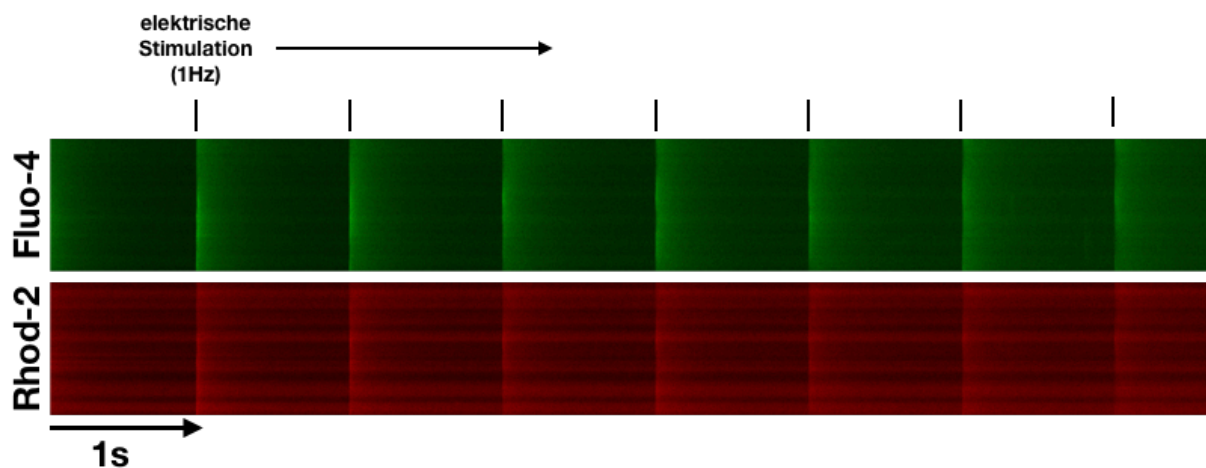


Abbildung 16 – Beispiel eines Linescans mit paralleler Registrierung von Fluo-4 und Rhod-2

2.9. Auszählen hyperkontraktiler Zellen

Ein gesunder Kardiomyozyt kennzeichnet sich lichtmikroskopisch erfahrungsgemäß durch eine rechteckige Stabform mit klar begrenzten Zellenden und Membran, sichtbarer Querstreifung und ohne spontane Kontraktionen. Durch den (simulierten) Ischämie-Reperfusionsschaden gerät ein Kardiomyozyt in einen dysregulierten Zustand, der sich unter anderem kennzeichnet durch zytosolische und mitochondriale Kalziumüberladung (101).

Lichtmikroskopisch wirkt sich eine zytosolische Kalziumüberladung auf die Form eines Kardiomyozyten aus. Es entstehen spontane Kontraktionen, die in einer Hyperkontraktur der Zelle enden (113).

Für diesen Versuch wurden die Zellen ohne Lamininadhäsion kultiviert. Die Zellsuspension des letzten Kalziumaufbauschnittes wurde auf vier Falcons aufgeteilt und nach 7 min jeweils der Überstand verworfen. Die stabförmigen Kardiomyozyten befinden sich nun in einem Pellet am Boden des Falcons. Die Pellets der Kontrollgruppen wurden mit Kulturmedium II \pm GSK2656157 (2 μ M) beziehungsweise DMSO resuspendiert, die Hypoxiegruppen in die Hypoxiekammer eingeschleust und mit entgaster Hypoxietyrode \pm GSK2656157 (2 μ M) beziehungsweise DMSO resuspendiert und die Suspensionen jeweils in eine eigene Kulturflasche (CellStar® Culture Flask 690175) überführt. 10 min vor Abschluss der zweistündigen Hypoxiekultur wurden die Kardiomyozyten in den Kulturflaschen durch leichtes schwenken wieder resuspendiert und die Lösung in einen 15 mL Falcon zum Absetzen gegeben. Sobald sich hier wieder ein Pellet gebildet hat, erfolgte die Reoxygenierung durch ausschleusen aus der Kammer sowie Resuspension der Pellets in Kulturflaschen mit Kulturmedium II \pm GSK2656157 (2 μ M) beziehungsweise DMSO. Nach einer halben Stunde Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden 1 mL pro Gruppe probeweise in eine 6 Well Platte transferiert. Der Deckel der Platte wurde nun mit den Zahlen 1-4 für die entsprechende Gruppe beschriftet, und die Legende auf einem Blatt notiert.

Das Überführen der Zellen sowie notieren der Gruppen geschah ohne meine Anwesenheit durch eine weitere Person, um so eine Verblindung für das spätere Auszählen zu gewährleisten. Mit einem Lichtmikroskop mit Kamera (Zeiss Observer Z1, AxioCam ERc5s) wurden dann Aufnahmen zur späteren Auswertung gemacht

(Objektiv 10x, Phasenkontrast aktiv). Nach den Kriterien in Tabelle 11 wurde eine Zelle entweder als stabförmig/vital eingestuft oder als hyperkontraktil/apoptosisch/tot.

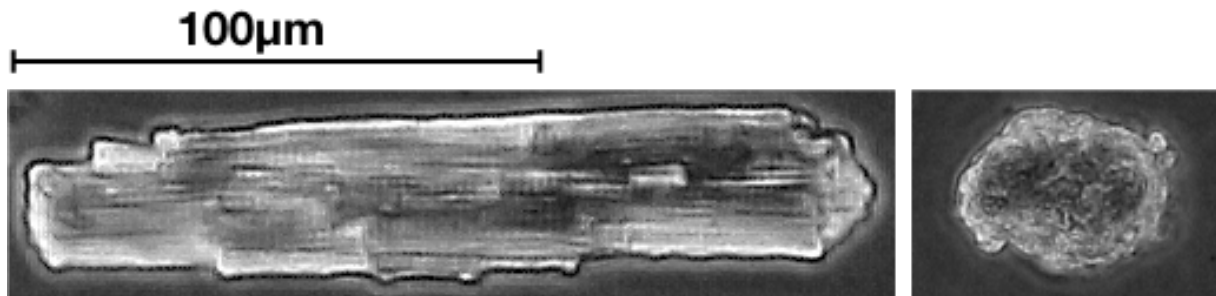


Abbildung 17 Aussehen von Kardiomyozyten (links stabförmig, rechts hyperkontraktil)

Vital	Hyperkontraktil
längliches, stabförmiges Aussehen	verkürzte, runde Form
rechteckige Zellenden	abgerundete/blumenkohlartige Zellenden
klar begrenzte Membran	Blasenbildung, Ausstülpungen
gut sichtbare Querstreifung	keine Sichtbare Querstreifung
keine/seltene Spontankontraktionen	evtl. noch spontane Kontraktionen

Tabelle 11 Kriterien für die Klassifizierung als stabförmig oder hyperkontraktil

2.10. Fluoreszenztechnische Bestimmung der Apoptose

Zur Detektion apoptotischer Kardiomyozyten wurde das DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega) verwendet. Dieses Assay detektiert DNA-Strangbrüche, die in dem Spätstadium der Apoptose durch Caspasen entstehen (114). TUNEL steht hierbei für TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling. Das im Reaktionskit enthaltene Enzym terminale Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT) katalysiert den Anbau von Nukleotiden an freie 3'OH Enden der DNA, die bei Strangbrüchen entstehen. Das Besondere an diesem Enzym ist, dass es im Gegensatz zu anderen Polymerasen keine DNA oder RNA Matrize benötigt. So können mit Fluorescein (grün emittierender Fluoreszenzfarbstoff) markierte Nukleotide (Fluorescein-12-dUTP) in die Kern-DNA inkorporiert werden und später durch entsprechende Anregung nachgewiesen werden. Durch eine Gegenfärbung mit Hoechst 33342, ein blau emittierender Fluoreszenzfarbstoff mit hoher Affinität zu DNA, lässt sich die Kernlokalisierung bestimmen. Die Anregung erfolgte mit einer Halogen-Metalldampflampe als Fluoreszenzlichtquelle (Zeiss HXP 120 C). Die Aufnahme der beiden Farbstoffe erfolgte sequentiell in getrennten Kanälen, wofür der jeweilige Filtersatz eingestellt wurde: Fluorescein=Zeiss 44 (FITC), Hoechst 33342=Zeiss 49 (DAPI). Als Mikroskop diente das Zeiss Observer Z1, mit ApoTome.2 Detektor.

Die Reaktionsschritte wurden nach Herstellerprotokoll zur Färbung adhärenter Zellen durchgeführt und sollen hier kurz dargestellt werden. Die Kultur mit Hypoxie/Reoxygenierung wurde wie oben beschrieben durchgeführt, jedoch erfordert die TUNEL Reaktion eine Kultur auf Objektträgern, wofür ein Träger mit 2x4 aufgeklebten Kammern (x-well Zellkulturkammern, 8-Well auf Glas ablösbar, Sarstedt) verwendet wurde. Zuerst wurden die aufgeklebten Kammern von den Objektträgern getrennt. Für die folgenden Schritte wurden die Objektträger jeweils in Glasküvetten (50 ml) überführt, und ab der Fixierung wurden Waschschrte bei 50 rpm auf einer Schüttelplatte durchgeführt, damit die Flüssigkeiten ausreichend zirkulieren.

25 min Fixierung in 4°C kalter 4%iger Formaldehydlösung in PBS

5 min in PBS waschen (1x wiederholen)

Kammern mit Fettstift umranden

5 min mit 0.2% Triton® X-100 in PBS permeabilisieren

5 min in PBS waschen (1x wiederholen)

100 μL „Equilibration Buffer“ pro 4 Kammern verteilen, 10 min warten

50 μL „TdT reaction Mix“ pro 4 Kammern verteilen, mit zurechtgeschnittener Plastikfolie abdecken und für 60 min bei 37°C inkubieren. Ab hier erfolgen Arbeiten unter Lichtausschluss

Plastikabdeckung entfernen, in 2XSSC in PBS überführen, 15 min waschen

5 min in PBS waschen (2x wiederholen)

Mit Hoechst 33342 (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in PBS gegenfärben für 2 min

5 min in PBS waschen (2x wiederholen)

Fluorescent Mounting Medium (Dako) auf Objektträger verteilen, ca. 100 μL pro 4 Kammern

Deckglas (24x36 mm) auflegen und Rand mit klarem Nagellack fixieren

2.11. Datenauswertung und Statistik

2.11.1. Auswertung der Anteile hyperkontraktiler Zellen

Für jede Gruppe wurde die Anzahl an hyperkontraktilen und stabförmigen Zellen ermittelt. Der Anteil an hyperkontraktilen Zellen in einer Gruppe zu einem jeweiligen Zeitpunkt definiert sich somit als:

$$\frac{\text{Anzahl hyperkontraktiler Zellen}}{\text{Anzahl hyperkontraktiler Zellen} + \text{Anzahl stabförmiger Zellen}}$$

Formel 1

Da jedoch bereits zu Beginn des Experiments hyperkontraktile Zellen vorliegen, lässt sich der eigentliche Effekt des Hypoxie/Reoxygenierungsschadens mit folgender Gleichung bereinigt darstellen:

$$\frac{\text{Anteil hyperkontraktiler Zellen} - \text{Anteil hyperkontraktiler Zellen (basal)}}{1 - \text{Anteil hyperkontraktiler Zellen (basal)}}$$

Formel 2

2.11.2. Auswertung der Framescans

Die mittlere Fluoreszenzintensität eines Framescans wurde mit der Software ImageJ (Version 1.51r) ermittelt. Hierfür wurde ein Polygon um die Zelle gezeichnet, sodass möglichst die ganze Zelle enthalten ist aber keine schwarze Hintergrundfläche. Danach wurde per Befehl „Measure“ (⌘+M) die mittlere Fluoreszenzintensität als Zahlenwert (ohne Einheit) gemessen. Dieser Vorgang wurde für den zweiten Kanal, in dem der andere Farbstoff registriert wurde, wiederholt. Die Werte der Kardiomyozyten wurden in Microsoft Excel (2016 for Mac) pro Gruppe pro Tag gemittelt, und in Prism zur Analyse übertragen.

2.11.3. Auswertung der Linescans

Die Datei wurde in ImageJ geöffnet, wo sie erstmal als Rechteck erscheint. Die vom Laser abgetastete Linie (512x1 Pixel) wird horizontal dargestellt und jeder neue Zyklus darunter. Mit dem Tastenbefehl ⌘+⇧+K wird eine Kurve erstellt, in dem die Daten entlang senkrechter Richtung gemittelt wurden (mittlere Intensität der Linie jedes Laserscans gegen die Zeit aufgetragen). Dieser Vorgang wurde für den zweiten Kanal,

in dem der andere Farbstoff registriert wurde, wiederholt. Die Werte dieser Kurven wurden in eine Excelvorlage kopiert, in der zum Beispiel schon die Zeitwerte (Intervalle von 0,94554 s) fortlaufend eingetragen waren. Diese Vorlage wurde so modifiziert, dass automatisch Werte wie die Baseline, Maximalwert (Peak), Amplitude, time to peak, und die Relaxationszeiten (RT 50%, 80% etc.) ermittelt wurden.

2.11.4. Auswertung TUNEL

Für die Auswertung der Aufnahmen der Objektträger wurden die beiden Kanäle (FITC und DAPI) in der Mikroskopsoftware (Zeiss Axiovision 4.8) als getrennte JPEG Dateien abgespeichert, und die Gesamtanzahl an Kernen sowie die Anzahl positiv gefärbter Kerne mit dem Multi-Point Tool in ImageJ markiert und gezählt.

2.11.5. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Tagesmittelwerte der Gruppen erfolgte mit GraphPad Prism 7. Alle Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes dargestellt. Der Standardfehler berechnet sich wie folgt:

$$\sigma(\bar{X}) = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

Formel 3 – Berechnung des Standardfehlers (Stichprobenfehlers), σ = Standardabweichung der Stichprobe, n = Anzahl der Messwerte in der Stichprobe

Zur Überprüfung, ob sich die Stichproben signifikant voneinander unterscheiden, wurden die im folgenden genannten Testverfahren durchgeführt. Dabei wurde immer ein zweiseitiger Test angewendet. Normalverteilung der Variablen wurde visuell in einem Histogramm überprüft, da sich für n Zahlen kleiner 30 die gängigen Normalitätstests aufgrund von geringer Power schlecht eignen (115). Für normalverteilte kontinuierliche Variablen wurde ein Student's T-Test mit Welsch's correction durchgeführt. Bei wiederholt gemessenen Variablen erfolgte eine Varianzanalyse „Repeated Measures Analysis of Variance“ (RM-ANOVA) sowie ein Posthoc Vergleich der einzelnen Untergruppen mittels Sidaks Post-hoc Korrektur zur Kontrolle der Falschpositivrate. Ein Gruppenvergleich mit einem P-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen. Für einige Gruppenvergleiche erfolgte eine automatisierte Elimination von Ausreißern nach Rout mit einer Ausreißerschwelle (ROUT Q) von 2 % und anschließender Analysis of Variance (ANOVA) mit der bereits genannten Post-hoc Korrektur.

3. Ergebnisse

Um die Fragestellung zu beantworten, ob es in isolierten Herzmuskelzellen durch Hypoxie/Reoxygenierung zu einer Ca^{2+} Überladung kommt, wurden diastolisches zytosolisches Ca^{2+} mit Fluo-4 sowie mitochondriales Ca^{2+} mit Rhod-2 nach H/R gemessen (Details siehe Methoden). Zusätzlich wurden Transienten abgeleitet, um zu analysieren, ob H/R beziehungsweise die PERK Inhibition Effekte auf die t to peak (reflektiert die gekoppelte Aktivierung der L-Typ Ca^{2+} Kanäle und RyR2 Rezeptoren) oder die Relaxationsgeschwindigkeiten (Funktion der SR Ca^{2+} ATPase und des NCX) haben.

Um den Effekt der PERK-Inhibition auf diese Ca^{2+} Überladung zu analysieren, wurde in allen Experimenten eine Konzentration des PERK-Inhibitors GSK2656157 von 2 μM (in DMSO gelöst) beziehungsweise einer entsprechenden Menge DMSO in der „Vehikel“ Gruppe eingesetzt. Um auch einen Effekt der Inhibition unter basalen Bedingungen zu untersuchen, erfolgten gleichzeitig Experimente unter Kontrollbedingungen (Normoxie). Alle Kardiomyozyten aus den unterschiedlichen Gruppen stammen an einem Tag immer aus derselben Isolation, und sind somit „gepaart“. In aller Regel Betrag die n Zahl pro Gruppe und Isolation n=5 Zellen. In den Abbildungen denotiert n die Anzahl an Isolationen, wenn nicht anders beschrieben. Zahlen im Text werden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Fluoreszenzintensitäten sind in A.U. (engl. arbitrary units) angegeben.

3.1. Verifizierung der mitochondrialen Rhod-2 Beladung mit Mitotracker Green FM

Um zu verifizieren, ob sich Rhod-2 mitochondrial anreichert, wurden isolierte ventrikuläre Kardiomyozyten mit Rhod-2 und anschließend Mitotracker Green FM beladen (eine Isolation, n=10 Zellen pro Gruppe) und anschließend mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Hierbei zeigte sich ein typisch mitochondriales Beladungsmuster für Rhod-2, gekennzeichnet durch eine streifen- und paketförmige Anreicherung. In der Überlagerung der beiden Fluoreszenz-emissions-Kanäle für Rhod-2 und Mitotracker Green (siehe Abb. 18) kennzeichnete dabei die häufige gelbe Farbe eine starke Kollokalisierung der beiden Farbstoffe in Bereich der Mitochondrien. Als Vergleich wurden n=10 Kardiomyozyten mit Rhod-2 und Fluo-4 beladen.

3.2. Korrelationsanalyse der Beladungsmuster

Um die visuell starke mitochondriale Anreicherung des Kalziumfarbstoffes Rhod-2 weiter zu quantifizieren wurden 10 Zellen, die wie oben beladen wurden, jede einzeln der integrierten Kollokalisationsanalyse der Zen Black Software unterzogen. Diese vergleicht die Intensität der von beiden Kanälen (entspricht Farbstoffen) registrierten Signale in jedem Bildpunkt, indem es diese in einem Koordinatensystem darstellt (x = Intensität Kanal 1, y = Intensität Kanal 2, jeder Datenpunkt entspricht einem Bildpunkt der Aufnahme) und dann eine Korrelationsgerade errechnet. Bei starker Übereinstimmung würde somit das Signal der beiden Farbstoffe in einem jeweiligen Bildpunkt gut korrelieren. Es zeigte sich beim Vergleich von Rhod-2 mit Mitotracker Green FM ein mittlerer Korrelationskoeffizient von $R=0,833\pm 0,012$ ($n=10$) zwischen den beiden Farbstoffen (siehe Abbildung 19), welcher für eine sehr starke Korrelation spricht.

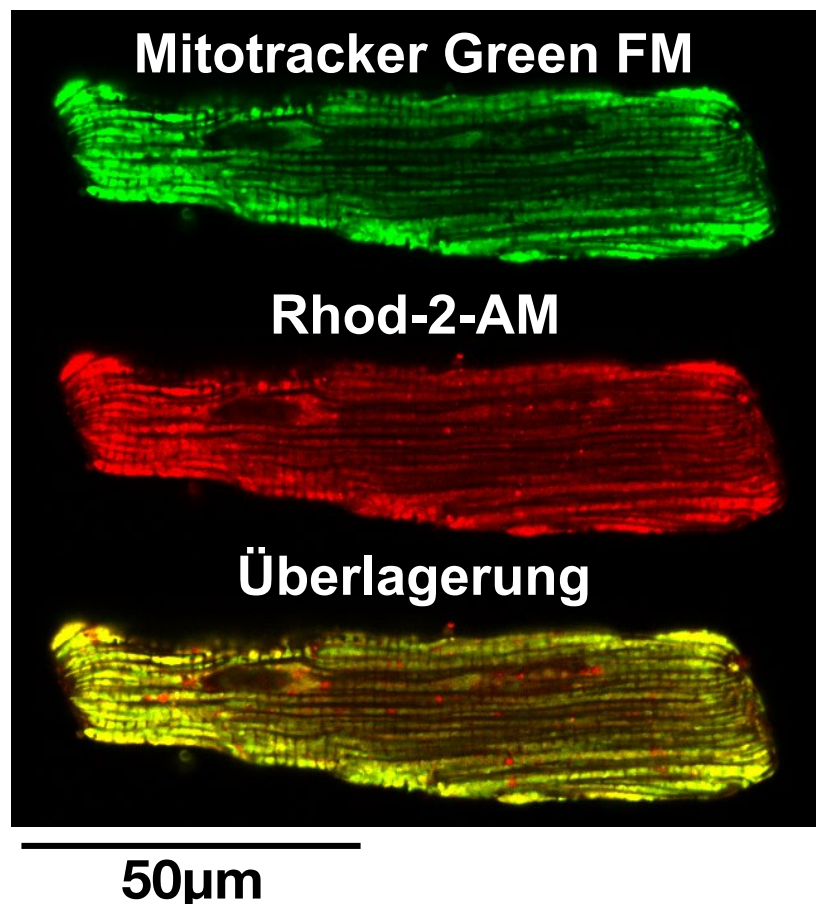


Abbildung 18 - Originalaufnahmen (Frame Scans) einer Zelle beladen mit Mitotracker Green FM und Rhod-2 AM. Die Überlagerung der Mitotracker Green und Rhod-2 Kanäle zeigt eine hohe Anreicherung von Rhod-2 in Mitochondrien.

Im Gegensatz dazu ergab die Kolokalisationsanalyse von Rhod-2 mit dem zytosolischen Farbstoff Fluo-4 nur einen mittleren Korrelationskoeffizienten von $R=0,172\pm 0,01482$ ($n=10$), welcher für eine sehr schwache Korrelation vereinbar mit einer getrennten Lokalisation von Mitotracker Green in den Mitochondrien und Fluo-4 im Zytosol spricht. Ein ungepaarter T-Test mit Welch's Correction ergab einen signifikanten Unterschied der Mittelwerte beider Gruppen ($p<0,05$). Somit bestätigt sich die Hypothese, dass sich Rhod-2 mit diesem Beladungsprotokoll vorwiegend mitochondrial anreichert.

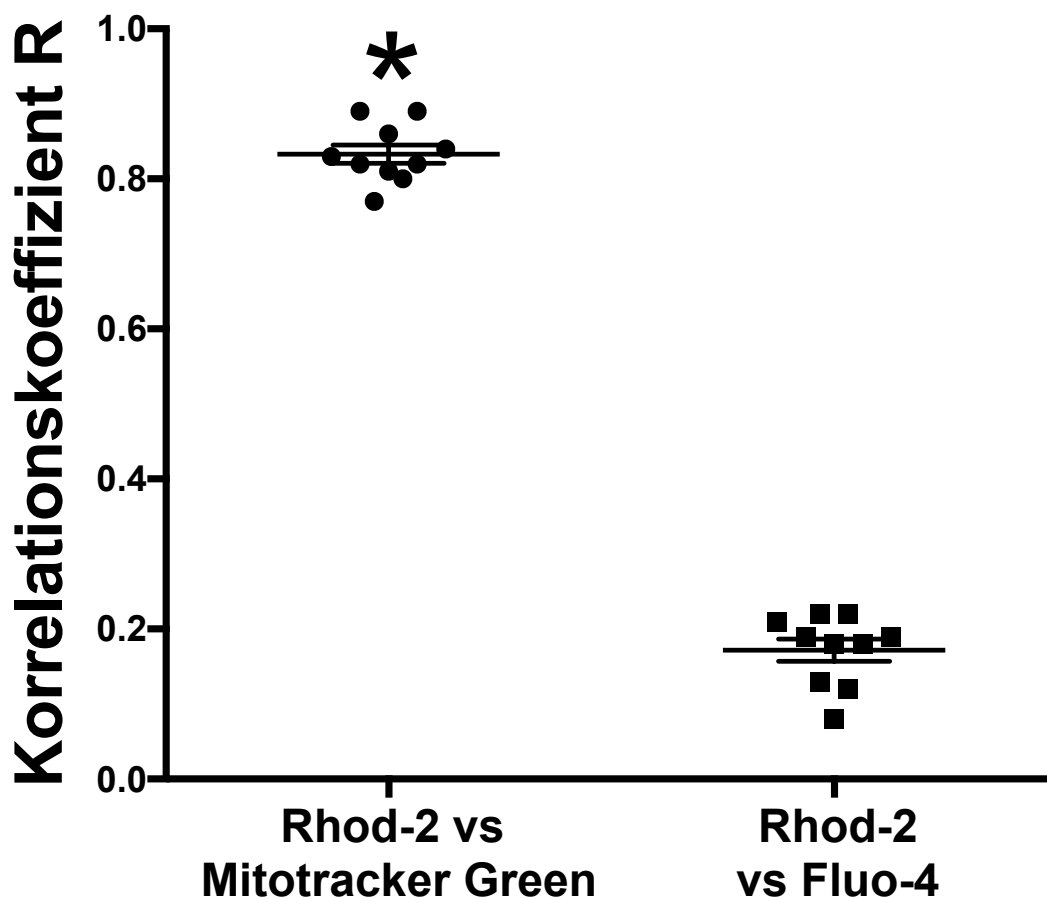


Abbildung 19 – Ergebnisse der Kolokalisationsanalyse mit Zen Black

Dargestellt sind die Korrelationskoeffizienten R von jeweils $n=10$ Zellen pro Gruppe. * kennzeichnet $p<0,05$, ungepaarter t-Test mit Welch's Correction.

3.3. Messung des basalen Kalziumniveaus

Um zu quantifizieren, wie sich das hier angewandte Hypoxie/Reoxygenierungsmodell auf das basale zytosolische und mitochondriale Kalzium auswirkt, wurden Frame Scans von isolierten Kardiomyozyten aufgenommen (512x512 Pixel, für genaue Einstellungen siehe 2.8.2). Kurz zusammengefasst durchliefen die Zellen entweder 135 min Kultur unter Kontrollbedingungen (37°C, Raumluft, 5% CO₂), oder 120 min Hypoxie (37°C, 0,5% O₂, 5% CO₂, 94,5% N₂) mit anschließenden 15 min Reoxygenierung (37°C, Raumluft, 5% CO₂) (für eine detailliertere Erläuterung des Modells siehe bitte 2.3). Anschließend wurden die Kardiomyozyten mit Rhod-2 und Fluo-4 beladen (siehe Methodenteil).

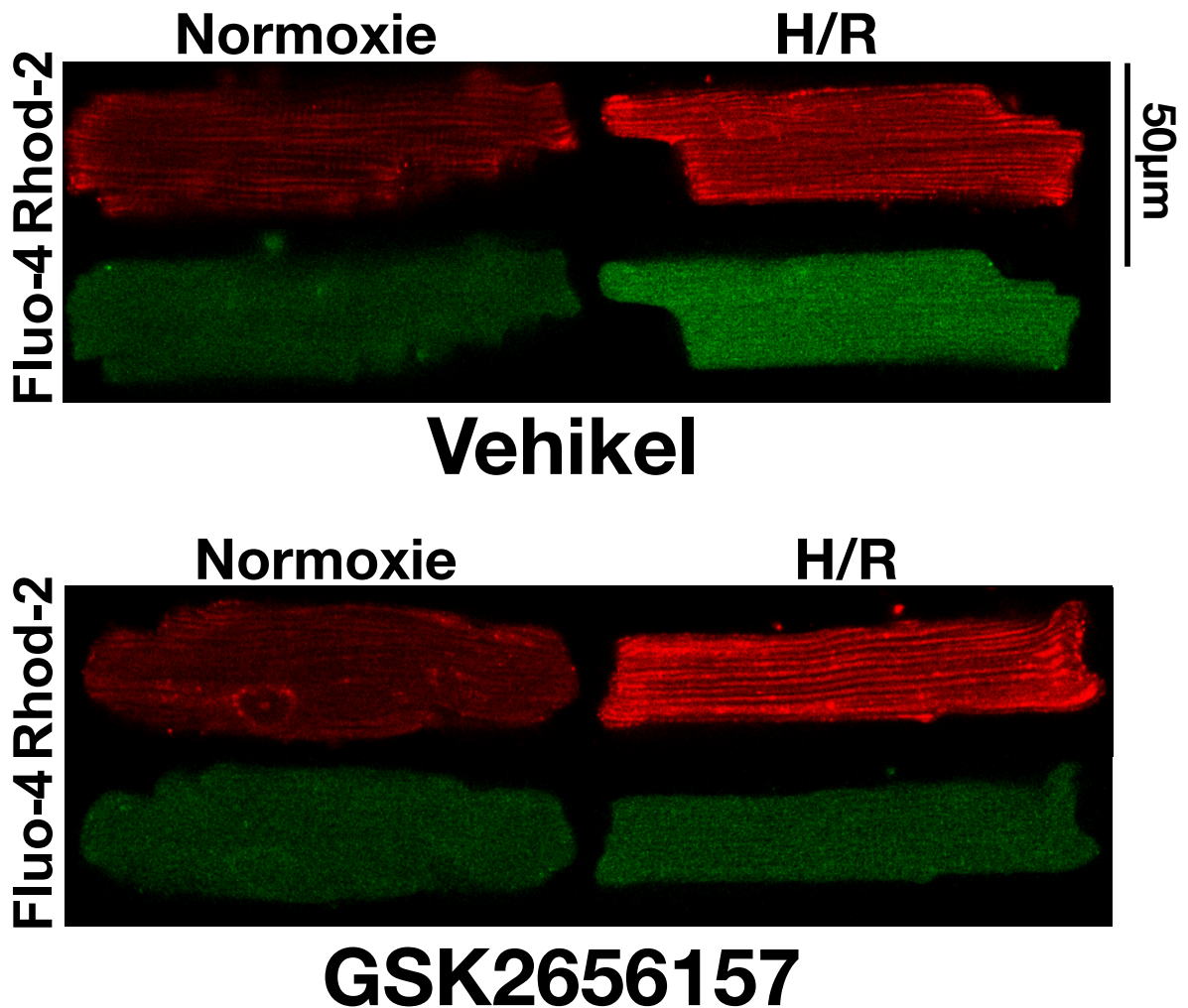


Abbildung 20 – Originalaufnahmen (Frame Scans) von Kardiomyozyten ± PERK Inhibition ± Hypoxie/Reoxygenierung

Wie in den Originalaufnahmen aus Abbildung 20 ersichtlich kam es durch Hypoxie/Reoxygenierung zu einem signifikanten Anstieg der mittleren Fluoreszenz sowohl von Fluo-4 ($10558 \pm 902,3$ A.U. auf $13802 \pm 111,5$ A.U., $p < 0,05$, $n=7$ Isolationen) als auch Rhod-2 (10830 ± 1083 A.U. auf 19531 ± 1922 A.U., $p < 0,05$, $n=7$ Isolationen). Dies kennzeichnet einen Anstieg zytosolischen und mitochondrialen Kalziums durch H/R. Unter GSK2656157 bleibt der Anstieg in Fluo-4 Intensität unter H/R vollständig aus ($10478 \pm 765,9$ A.U. vs. H/R Vehikel: $13802 \pm 111,5$ A.U., $p < 0,05$, $n=7$ Isolationen). Der PERK-Inhibitor führte aber zu keiner signifikanten Verringerung des Anstiegs der Rhod-2 Fluoreszenzintensität (18683 ± 2650 A.U. vs. H/R Vehikel: 19531 ± 1922 A.U., $p=0,97$, $n=7$ Isolationen). Interessanterweise kam es unter GSK2656157 zu einem signifikanten Anstieg der basalen Rhod-2 Fluoreszenz gegenüber der Vehikelgruppe (13188 ± 1604 A.U. vs. 10830 ± 1083 A.U., $p < 0,05$, $n=7$ Isolationen). Originalabbildungen (Frame Scans) sind in Abbildung 20 dargestellt. Die Fluoreszenzmittelwerte pro Isolation sind in Abbildung 21 dargestellt, ein Datenpunkt wird aus ca. 5 Zellen gebildet.

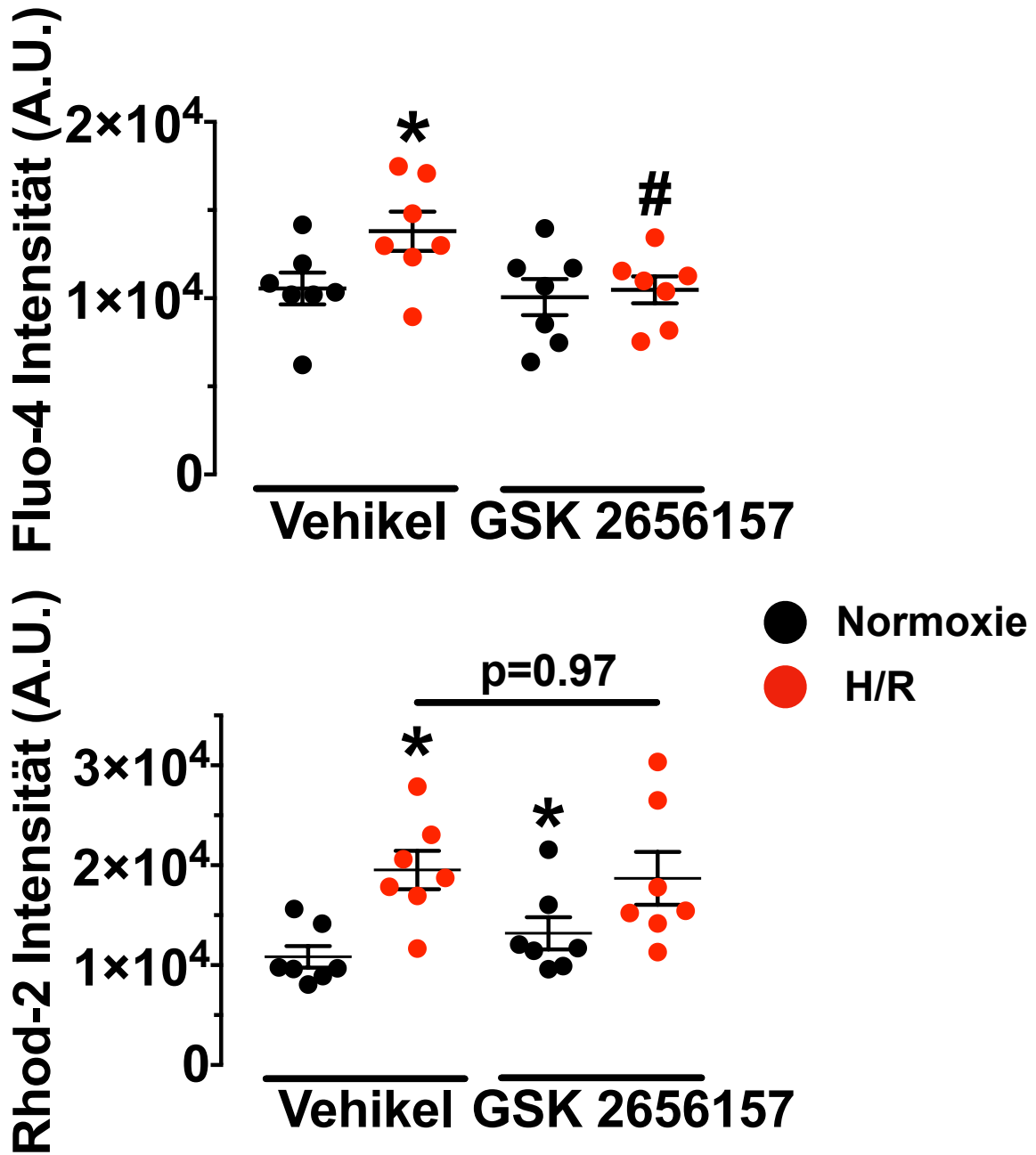


Abbildung 21 Fluoreszenzwerte der Framescans, gemittelt pro Isolation
 n=7 Isolationen für alle Gruppen. * kennzeichnet p<0,05 vs. Normoxie Vehikel, # kennzeichnet p<0,05 vs. H/R Vehikel.

3.4. Zytosolische Kalziumtransientenmessung mit Fluo-4

Um die in den Framescans detektierte Ca^{2+} Überladung weiter zu analysieren, wurden an isolierten, mit Rhod-2 und Fluo-4 beladenen Kardiomyozyten \pm H/R \pm PERK Inhibition zytosolische Kalziumtransienten abgeleitet. Neben Baseline und Amplitude wurden noch folgende weitere Parameter erfasst: Peak (Maximum), t to peak (Zeit bis zum Maximum), sowie die Relaxationswerte $\text{rt}50\%$, $\text{rt}80\%$, und $\text{rt}90\%$ (geben jeweils die Zeit an, die der Transient benötigt um den prozentual genannten Unterschied vom Maximum zum Anfangswert zurückzulegen). Die t to peak reflektiert die gekoppelte Aktivierung der L-Typ Ca^{2+} Kanäle und RyR2 Rezeptoren, während die Relaxationsgeschwindigkeiten die Funktion der SR Ca^{2+} ATPase und des NCX integrieren. Die Werte sind als Mittelwerte pro Isolation \pm Standardfehler des Mittelwerts in Tabelle 12 angegeben.

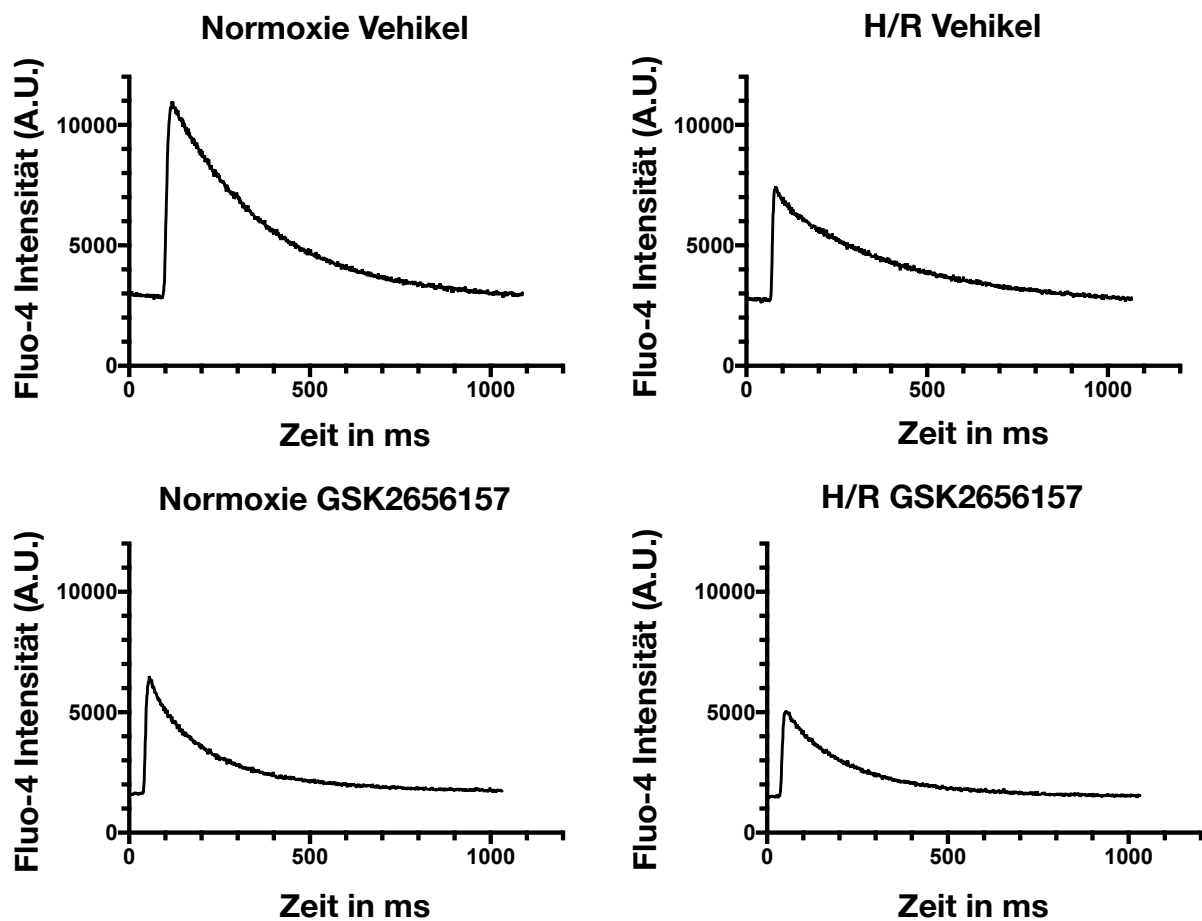
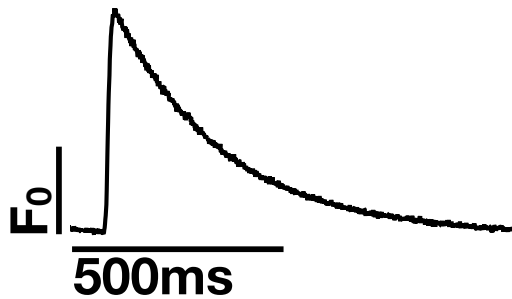


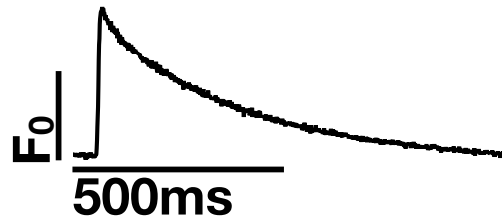
Abbildung 22 Originalregistrierungen von zytosolischen Kalziumtransienten (Fluo-4) als Rohdaten

Fluo 4

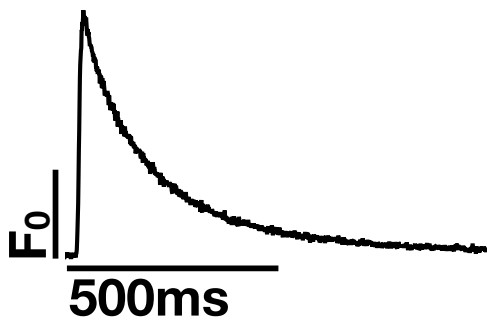
Normoxie Vehikel



H/R Vehikel



Normoxie GSK2656157



H/R GSK2656157

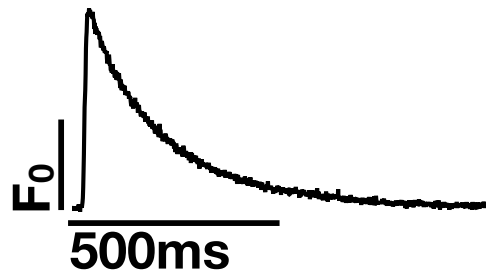


Abbildung 23 – Originalregistrierungen von zytosolischen Kalziumtransienten (Fluo-4), jeweils auf F_0 normalisiert.

Bei den zytosolischen Kalziumtransienten, gemessen mit Fluo-4, zeigte sich eine signifikante Reduktion des diastolischen Kalziums nach H/R durch GSK2656157 (in Abb. 24 dargestellt). Originalregistrierungen der Transienten sind in Abbildung 22 als Rohdaten, in Abbildung 23 normalisiert auf F_0 dargestellt.

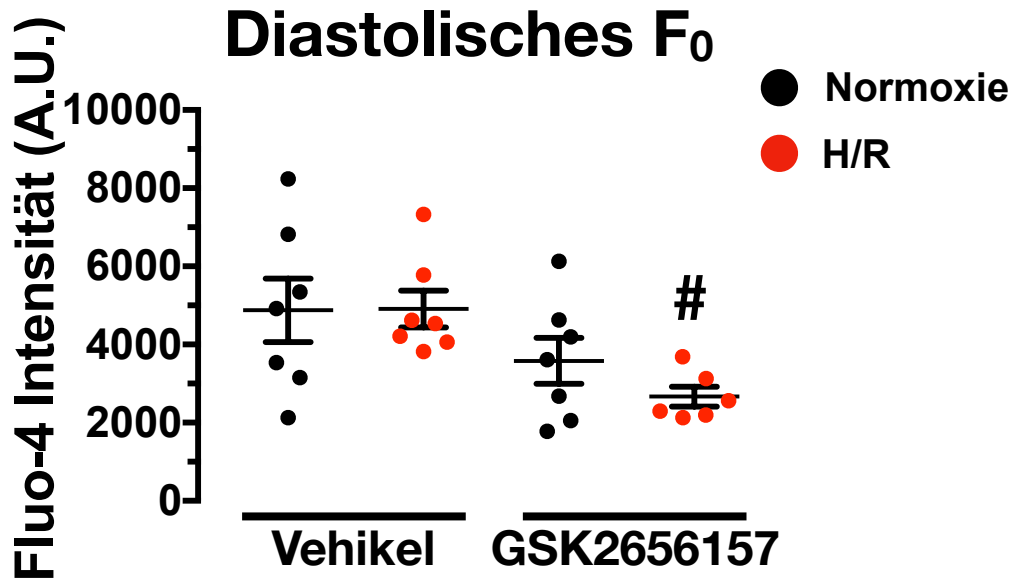


Abbildung 24 Diastolisches F_0 (baseline) der zytosolischen Transienten.

Dargestellt sind Tagesmittelwerte. # kennzeichnet $p < 0,05$ vs Hypoxie Vehikel. Es wurde ein ROUT Test ($Q=2\%$) angewendet. Aufgrund ungleicher n -Zahlen in den Gruppen wurde ein Ordinary One-Way ANOVA verwendet.

Ferner zeigte sich ein globaler Trend zur Abnahme der Amplitude der Kalziumtransienten nach H/R, der jedoch nicht signifikant war. Die Transientenamplitude ist in Abbildung 25 auf den Anfangswert normalisiert angegeben ($\Delta F/F_0$), was eventuelle Unterschiede in der Farbstoffbeladung kompensiert (116).

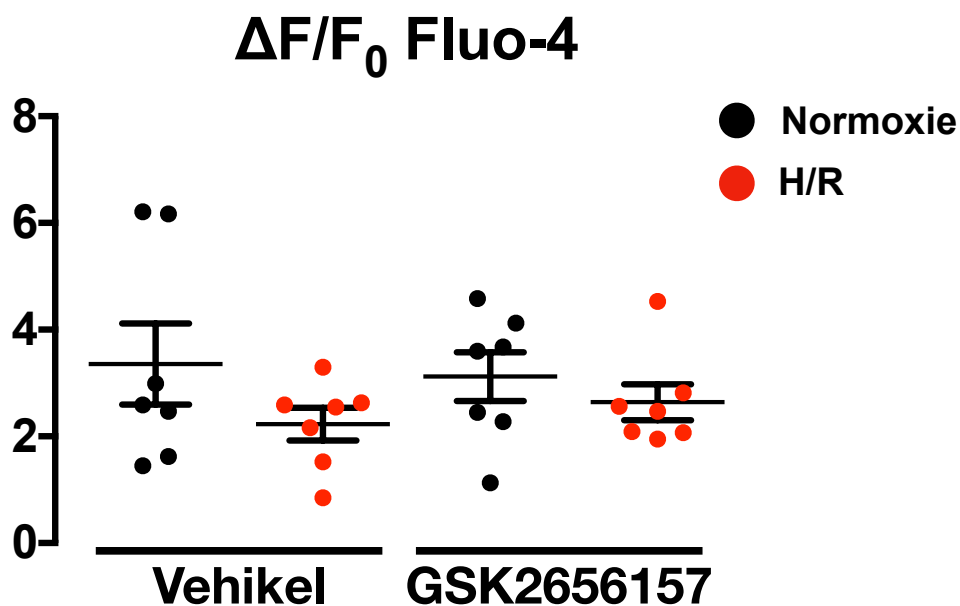


Abbildung 25 Die Amplitude der Transienten, normalisiert auf die Baseline (F_0). $n=7$ Tagesmittelwerte pro Gruppe

Fluo-4				
	Normoxie		H/R	
	Vehikel	GSK2656157	Vehikel	GSK2656157
Baseline (A.U.)	4878±811,3	3582±584,5	4908±468,6	2667±252,4
Peak (A.U.)	17801±1900	13191±1621	14994±1738	11489±2118
Amplitude (A.U.)	12923±1730	9608±1502	10085±1442	8271±1610
t to peak (ms)	30,96±3,422	28,44±2,446	26,54±4,22	24,35±3,088
rt50 (ms)	198,1±12,89	160,7±8,185	171,3±8,886	161,9±5,144
rt80 (ms)	442,9±38,47	380,1±26,46	416,4±33,76	389,6±14,94
rt90 (ms)	615,6±46,05	577,5±50,52	627,4±57,28	576,7±22,78
F/F0	4,357±0,7593	4,12±0,4575	3,229±0,3067	3,641±0,3361
ΔF/F0	3,357±0,7593	3,12±0,4575	2,229±0,3067	2,641±0,3361

Tabelle 12 Synopsis der Parameter zytosolischer Transienten.

Werte sind als Mittelwert ±SEM dargestellt.

3.5. Mitochondriale Kalziumtransientenmessung mit Rhod-2

Analog zu Fluo-4 wurden für die mitochondrialen Kalziumtransienten, gemessen mit Rhod-2, die gleichen Parameter ermittelt, um eine potenzielle Kalziumüberladung nachzuweisen und dessen Kinetik zu analysieren. Originalabbildungen der mitochondrialen Ca^{2+} -Transienten sind in Abbildung 26 als Rohdaten dargestellt, beziehungsweise in Abbildung 27 normalisiert auf F_0 .

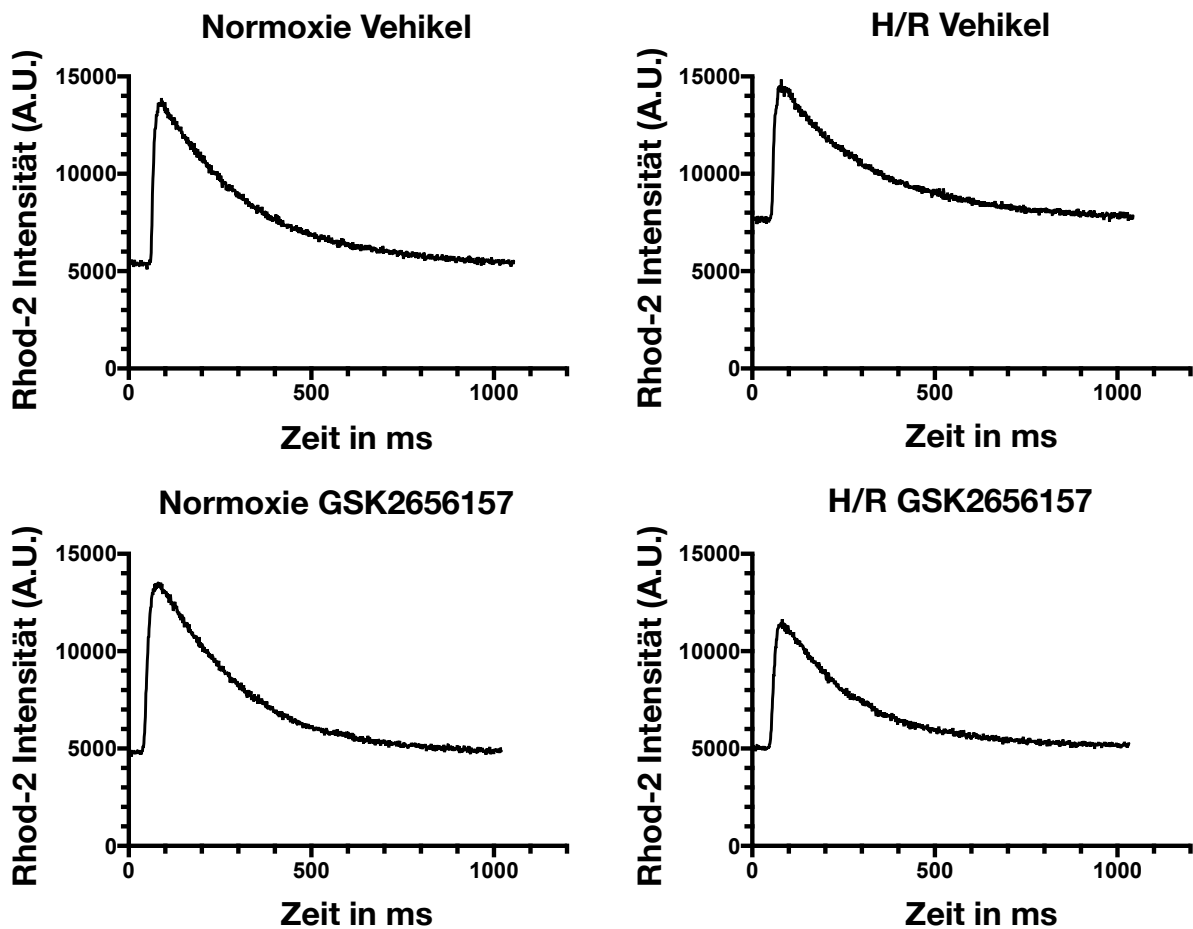


Abbildung 26 – Originalregistrierungen von mitochondrialen Kalziumtransienten (Rhod-2) als Rohdaten.

Rhod 2

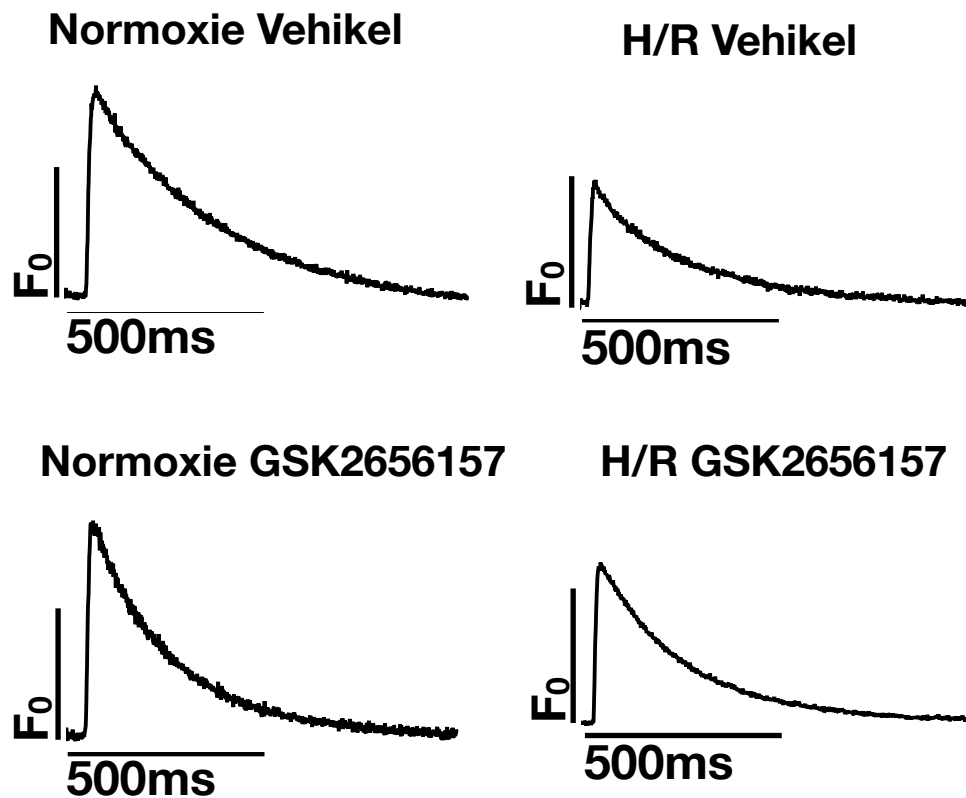


Abbildung 27 - Originalregistrierungen von mitochondrialen Kalziumtransienten (Rhod-2), jeweils auf F_0 normalisiert.

Es zeigte sich eine Tendenz zur Zunahme des diastolischen, mitochondrialen Kalziums nach H/R ($p=0,10$ vs. Normoxie Vehikel, Tagesmittelwerte in Abb. 28 dargestellt). GSK2656157 verhinderte den Anstieg mitochondrialen Kalziums signifikant ($p<0,05$, Ordinary One-Way ANOVA).

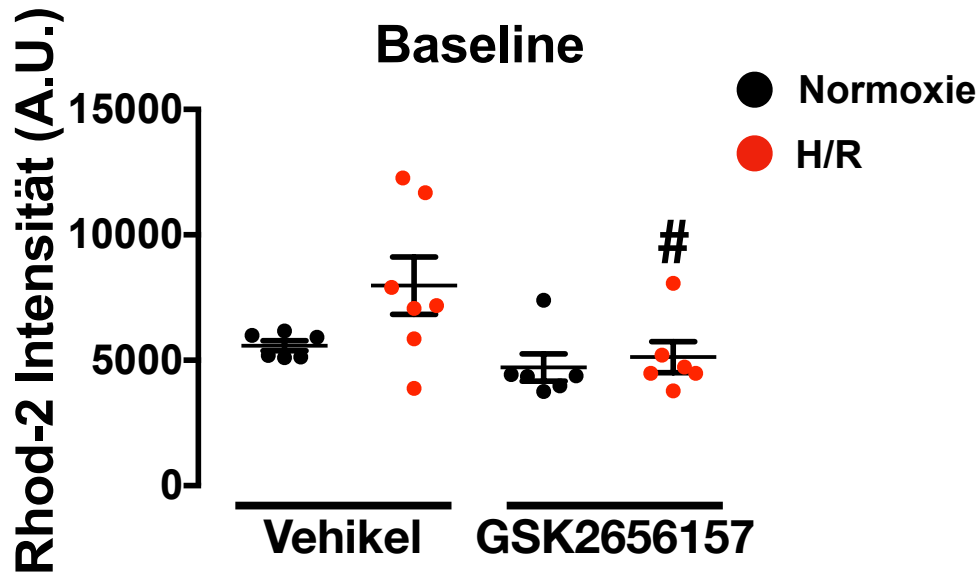


Abbildung 28 F_0 (baseline) der mitochondrialen Transienten

Dargestellt sind Tagesmittelwerte. # kennzeichnet $p < 0,05$ vs Hypoxie Vehikel. Es wurde ein ROUT Test ($Q=2\%$) angewendet. Aufgrund ungleicher n -Zahlen in den Gruppen wurde ein Ordinary One-Way ANOVA verwendet.

Ferner zeigte sich ähnlich zu den zytosolischen Transienten eine globale Tendenz zur Abnahme der Transientenamplitude ($\Delta F/F_0$) nach H/R, die jedoch nicht signifikant war (siehe Abb. 29).

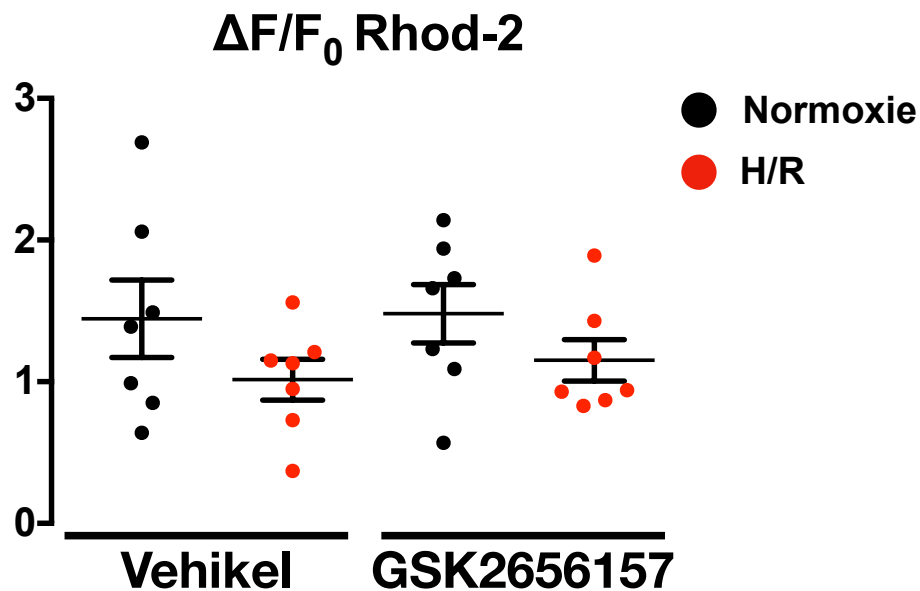


Abbildung 29 Die Amplitude der Transienten, normalisiert auf die Baseline (F_0). $n=7$ Tagesmittelwerte pro Gruppe

Neben der Baseline und Amplitude wurden analog zu Fluo-4 noch die t-to-peak sowie Relaxationszeiten bestimmt, bei denen sich kein signifikanter Unterschied ergab (siehe Tabelle 13).

Rhod-2				
	Normoxie		H/R	
	Vehikel	GSK2656157	Vehikel	GSK2656157
Baseline (A.U.)	5586±200,1	4715±545,7	7978±1142	5127±618,8
Peak (A.U.)	14747±1506	13492±1449	15477±2233	15191±4738
Amplitude (A.U.)	8329±1330	7441±588,9	7499±1251	8261±2900
t to peak (ms)	31,73±3,952	27,34±2,734	25,51±4,472	24,01±2,766
rt50 (ms)	197,6±13,56	159,7±8,052	174,2±11,75	167±6,754
rt80 (ms)	456,4±45,84	389,5±32,7	460,6±52,65	422,9±23,93
rt90 (ms)	618,6±45,97	593,1±60,23	641,1±61,41	657,6±39,52
F/F0	2,444±0,2735	2,48±0,2061	2,014±0,1438	2,151±0,1464
ΔF/F0	1,444±0,2735	1,48±0,2061	1,014±0,1438	1,151±0,1464

Tabelle 13 Synopsis der Parameter mitochondrialer Transienten.

Werte sind als Mittelwert ±SEM dargestellt.

3.6. Analyse der Hyperkontraktilität

Um die Fragestellung zu beantworten, ob die Ca^{2+} Überladung nach H/R sich auch in einem höheren Anteil an hyperkontraktilen Kardiomyozyten widerspiegelt, sowie ob sich durch PERK Inhibition eine Reduktion der Hyperkontraktilität erzielen lässt, wurde der Anteil hyperkontraktiler Kardiomyozyten einmal basal und 30 sowie 60 min nach H/R in den Gruppen mit PERK-Inhibition beziehungsweise Vehikel ermittelt.

Ein Tagesmittelwert pro Gruppe entstand aus den kumulierten Daten von 5 Bildern. In Abbildung 30 sind beispielhafte lichtmikroskopische Originalaufnahmen zu sehen. Diese spiegeln den deutlichen Anstieg hyperkontraktiler Zellen durch H/R wider.

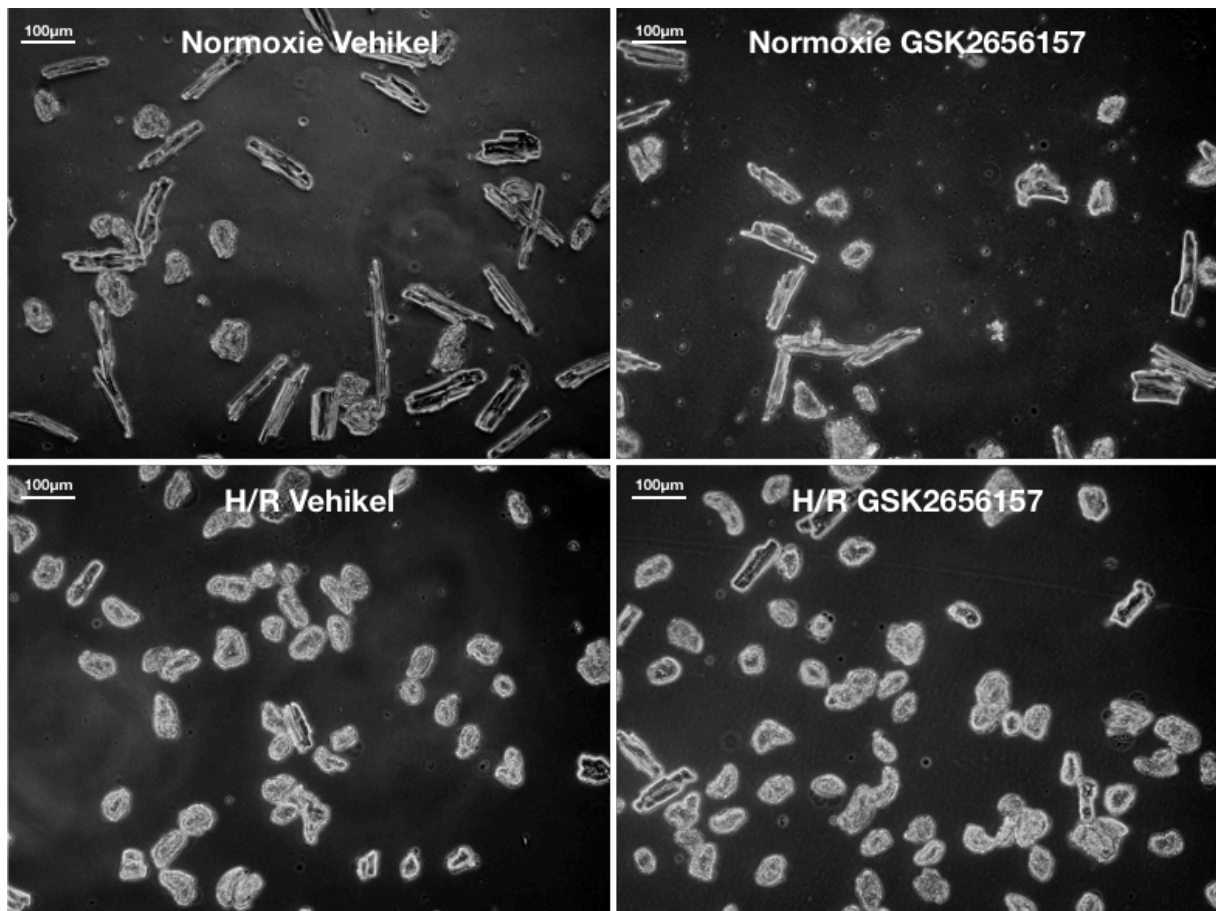


Abbildung 30 – Lichtmikroskopische Originalaufnahmen 60 min post-Reoxygenierung

Wie aus den Mittelwerten für den Anteil hyperkontrahierten Zellen ersichtlich, führte Hypoxie/Reoxygenierung zu einem signifikant höherem Anteil hyperkontraktiler Zellen bereits nach 30 min Reoxygenierung (Normoxie Vehikel: $44,63 \pm 1,985\%$, H/R Vehikel: $77,06 \pm 1,147\%$, $p < 0,05$, siehe Abb. 31) sowie nach 60 min Reoxygenierung (Normoxie Vehikel: $51,76 \pm 5,383\%$, H/R Vehikel: $80,81 \pm 3,201\%$, $p < 0,05$, siehe Abb. 32).

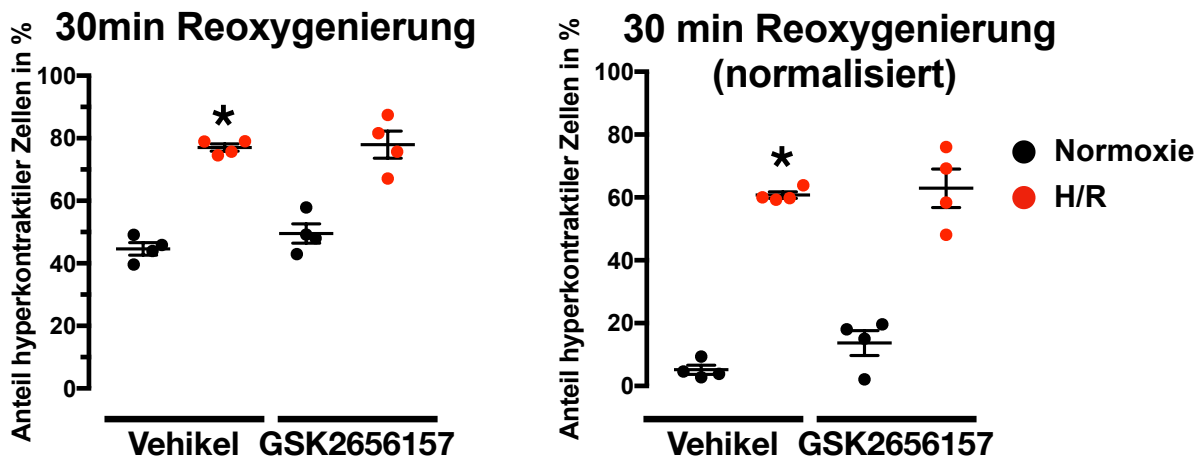


Abbildung 31 - Anteil hyperkontraktiler Zellen nach 30 min Reoxygenierung in Prozent

Dargestellt sind Tagesmittelwerte aus 5 Aufnahmen (Objektiv 10x) pro Gruppe, links als Rohwerte, rechts nach Formel 2 korrigiert für den Anteil zu dem jeweiligen Versuchsbeginn bereits hyperkontraktile Zellen (Baseline). * kennzeichnet $p < 0,05$ gegenüber Normoxie+Vehikel.

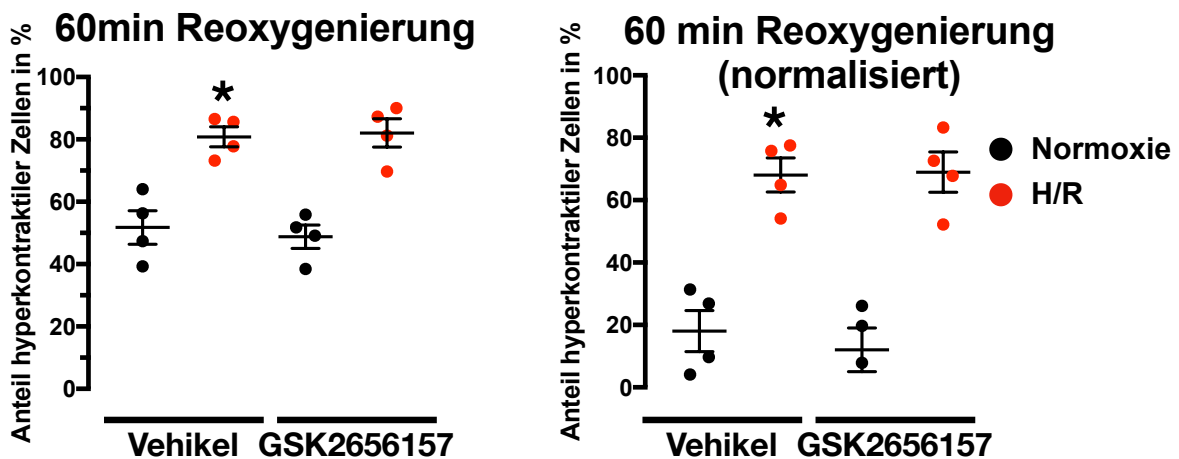


Abbildung 32 Anteil hyperkontraktiler Zellen nach 60 min Reoxygenierung in Prozent

Dargestellt sind Tagesmittelwerte aus 5 Aufnahmen (Objektiv 10x) pro Gruppe, links als Rohwerte, rechts nach Formel 2 korrigiert für den Anteil zu dem jeweiligen Versuchsbeginn bereits hyperkontraktile Zellen (Baseline). * kennzeichnet $p < 0,05$ gegenüber Normoxie+Vehikel.

Die Ergebnisse sind einmal als Rohdaten, sowie die nach Formel 2 (siehe Methoden, entspricht dem Anteil hyperkontraktile Zellen aus der zu Beginn des Experiments noch viablen Zellpopulation) ermittelte Hyperkontraktilität mit Korrektur für die jeweilige Baseline in Abbildung 31 für die Werte nach 30-minütiger Reoxygenierung, sowie in Abbildung 32 nach 60-minütiger Reoxygenierung dargestellt. Der Anstieg der Hyperkontraktilität ließ sich nicht durch Präinkubation mit GSK2656157 verringern.

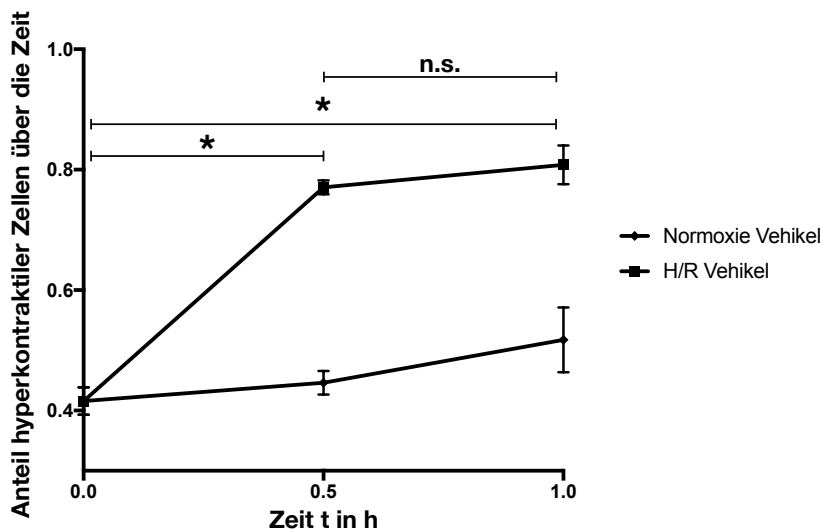


Abbildung 33 – Anteil hyperkontraktile Zellen über die Zeit (Vehikelgruppen).

Ein Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert aus $n=4$ Isolationen mit SEM. * kennzeichnet $p<0,05$, n.s. = nicht signifikant, (One-Way ANOVA).

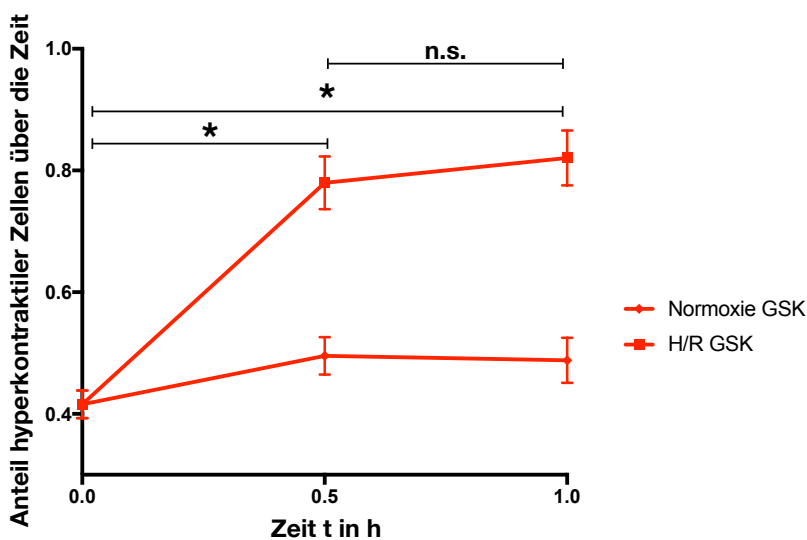


Abbildung 34 - Anteil hyperkontraktile Zellen über die Zeit (GSK2656157).

Ein Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert aus $n=4$ Isolationen mit SEM. * kennzeichnet $p<0,05$, n.s. = nicht signifikant, (One-Way ANOVA).

Der zeitliche Verlauf der Hyperkontraktilität ist in Abbildung 33 für die Vehikelgruppen, in Abbildung 34 für die PERK Inhibition mit GSK2656517, und in Abbildung 35 für alle Gruppen überlappend dargestellt.

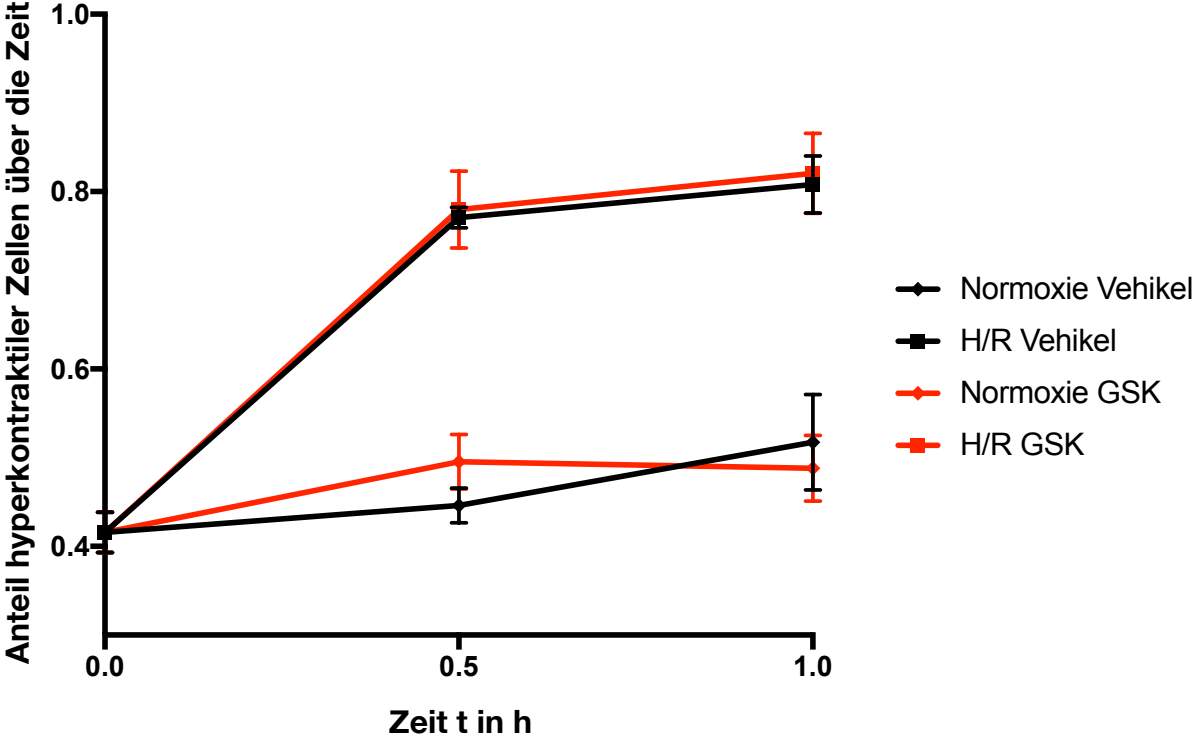


Abbildung 35 –Zusammenführung von Abbildung 33 und Abbildung 34.

3.7. Fluoreszenztechnische Bestimmung der Apoptose

Um die Fragestellung zu beantworten, ob eine PERK Inhibition die Apoptoserate der Kardiomyozyten nach H/R beeinflussen kann wurde nach H/R eine TUNEL Färbung zur Apoptosequantifizierung durchgeführt (Details siehe Methoden).

Mit dem TUNEL Assay sollten Zellen, die nach der Hypoxie/Reoxygenierung die Apoptose einleiten, durch Markierung der Zellkerne identifiziert werden. In Pilotversuchen wurden Reoxygenierungsdauern von 2 h bis 16 h gewählt, um ausreichend Zeit für die Induktion der Apoptose zu lassen. Beispielhafte Aufnahmen sind in Abbildung 36 dargestellt.

Alle Zellkerne sind mit blau markiert, die für DNA-Strangbrüche positiven Kerne zusätzlich grün. In den Positivkontrollen, die 10 min mit DNase inkubiert wurden, zeigten sich stets grün (in der Überlagerung türkis) fluoreszierende, positiv markierte Kerne.

Die Auswertung von über 10 TUNEL Experimenten ergab jedoch in den Hypoxie/Reoxygenierungsgruppen keine Markierung apoptotischer Zellen. Auffälliger Weise waren auch keine runden, hyperkontraktilen Kardiomyozyten zu sehen, obwohl diese lichtmikroskopisch gehäuft in den H/R Gruppen zu sehen waren. Gründe für ein Fehlen positiver Kerne werden in der Diskussion näher behandelt.

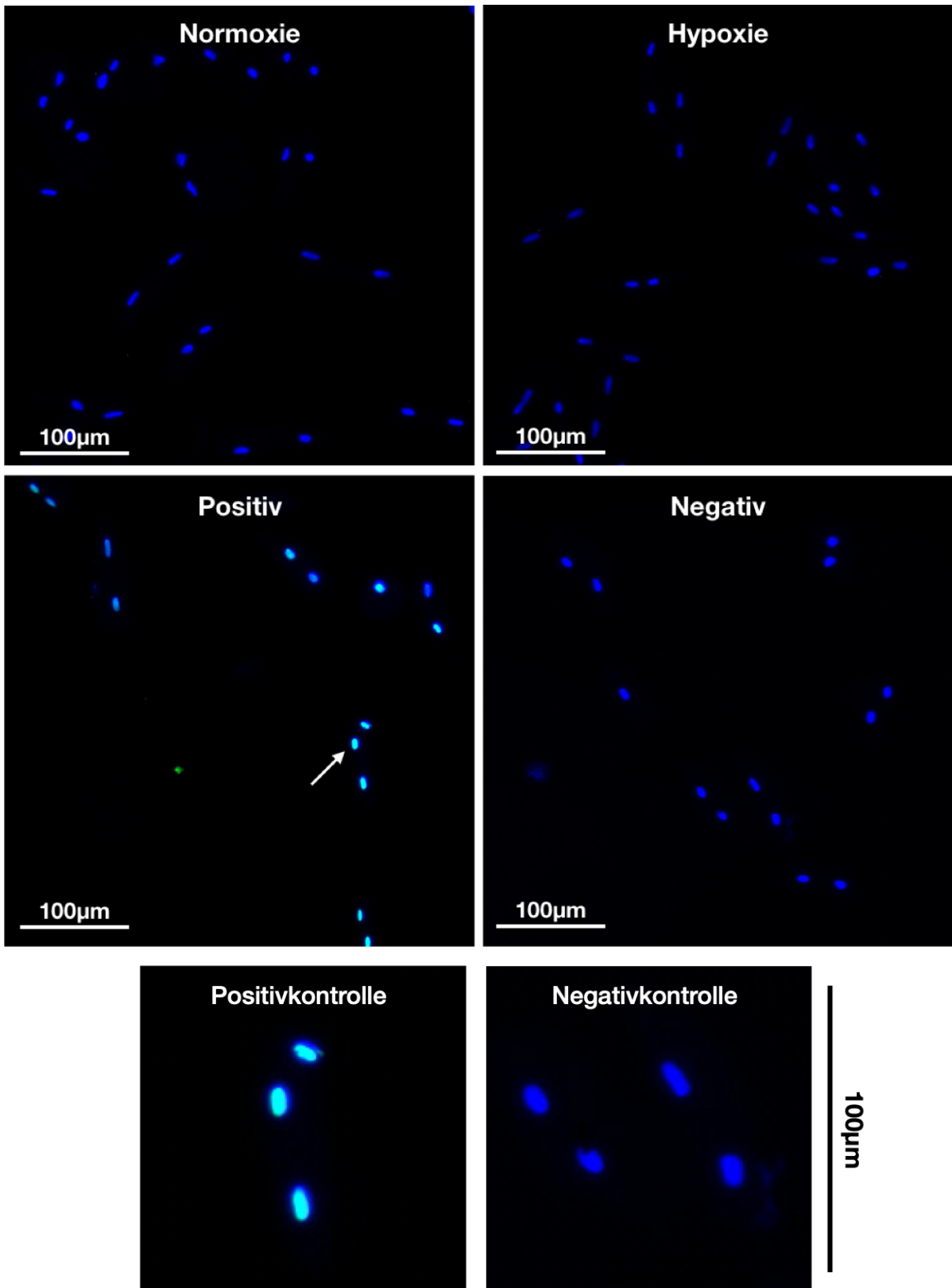


Abbildung 36 - Originalaufnahmen von Kardiomyozyten nach TUNEL mit Hoechst 33342 Kerngegenfärbung.

In der Positivkontrolle ist exemplarisch ein positiver Kern gekennzeichnet. Während humane Kardiomyozyten meist mononukleär sind, besitzen Rattenkardiomyozyten zwei Kerne. Die unteren Abbildungen stellen vergrößerte Ausschnitte dar.

4. Diskussion

Ich habe mich in der vorliegenden Arbeit mit der Frage beschäftigt, ob das hier verwendete H/R Protokoll eine zytoplasmatische und mitochondriale Ca^{2+} Überladung in Kardiomyozyten induzieren kann. Weiterhin habe ich analysiert, ob sich diese Ca^{2+} Überladung durch selektive PERK Inhibition mit GSK 2656157 inhibieren lässt. Ferner habe ich analysiert, ob eine PERK Inhibition die Apoptoserate der Kardiomyozyten nach H/R reduzieren kann.

Zentrale Ergebnisse meiner Arbeit sind:

Das hier verwendete H/R Modell induziert erfolgreich eine zytoplasmatische und mitochondriale Ca^{2+} Überladung in den isolierten Kardiomyozyten.

Die zytoplasmatische Ca^{2+} Überladung nach H/R lässt sich durch PERK Inhibition mit GSK2656157 reduzieren, die mitochondriale Ca^{2+} Überladung nach H/R nicht.

Zur Quantifizierung der Apoptoserate isolierter Kardiomyozyten nach H/R ist die TUNEL Methode unzureichend geeignet (siehe Diskussion).

Neben seiner schon länger bekannten, inhibierenden Wirkung auf die Translation zeigt diese Arbeit weitere Facetten der ER Kinase PERK auf. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch PERK Inhibition der zytoplasmatische Kalziumanstieg nach H/R deutlich reduziert werden konnte. Diese Abnahme deutet darauf hin, dass PERK an der Kalziumhomöostase beziehungsweise dessen Dysregulation bei Ischämie-Reperfusion beteiligt ist. Eine Abnahme mitochondrialen Kalziums nach H/R und PERK Inhibition konnte nicht gezeigt werden, weshalb hier der SR-Mitochondrien-Kalziumaustausch entgegen der anfänglichen Hypothese möglicherweise ohne großen Einfluss von PERK reguliert wird, beziehungsweise PERK nur eine strukturelle Funktion einnimmt. Die in diesen Experimenten gefundene basale Erhöhung des mitochondrialen Kalziums unter Normoxie und PERK Inhibition schließt deshalb eine PERK-Beteiligung an der mitochondrialen Kalziumhomöostase jedoch nicht völlig aus.

4.1. Das H/R Modell simuliert erfolgreich einen I/R Schaden in vitro

Aus den vorliegenden Daten lässt sich eindeutig ableiten, dass das verwendete *in-vitro* Hypoxie-Reoxygenierungsmodell zur Studie des Ischämie-Reperfusionsschadens an isolierten Kardiomyozyten geeignet ist. Während der Ischämiephase eines Myokardinfarktes kommt es durch mangelnde Perfusion des betroffenen Gewebeabschnittes zu einem Sauerstoffentzug, Nährstoffentzug und einer Azidose. Dieser Zustand normalisiert sich jedoch durch die Reperfusion rasch, wodurch paradoxerweise ein Reperfusionsschaden entsteht (117). Diese Charakteristika des I/R Schadens *in vivo* wurden in dem hier verwendeten Modell weitestgehend übernommen: Die Hypoxie wurde durch zweistündige Inkubation bei 0,5% O₂ realisiert, die Azidose und der Nährstoffentzug durch einen Mediumwechsel zu Beginn der Hypoxie auf eine glukosefreie Tyrode mit pH 6,4. Der Tyrode wurde zusätzlich 20 mM 2-Deoxyglukose zugesetzt, um die Glykolyse zu reduzieren und durch verminderte Nachbildung den freien ATP Verbrauch zu erhöhen, da die Kardiomyozyten in Kultur im Gegensatz zur Situation *in-vivo* nicht stimuliert wurden und zwangsläufig einen niedrigeren ATP-Bedarf haben. Ähnliche *in-vitro* Protokolle um den I/R Schaden zu untersuchen sind in der Literatur bereits beschrieben (118, 119). 2-Deoxyglukose wird intrazellulär aufgenommen und phosphoryliert, kann jedoch durch die Phosphoglukoisomerase nicht weiterverarbeitet werden und inhibiert diese kompetitiv, wodurch die Glykolyse gehemmt wird (120).

Der Ischämie-Reperfusionsschaden geht neben den oben regulierten Parametern bekanntermaßen mit einer Kalziumüberladung einher, die bis zur Hyperkontraktilität des Kardiomyozyten führen kann. Als anfängliche Orientierung für den Reperfusionsschaden dieses Modells diente deshalb eine Untersuchung der Anteile hyperkontraktiler Zellen nach H/R. Hier zeigte sich eine signifikante Zunahme des Anteils hyperkontraktiler Zellen nach zweistündiger Hypoxie und 30- sowie 60-minütiger Reoxygenierung.

In den Messungen am konfokalen Lasermikroskop zeigte sich in den Framescans eine signifikante Erhöhung des zytosolischen Kalziums nach H/R, gemessen mit Fluo-4. Neben einer Erhöhung des zytosolischen Kalziums ist nach der Reoxygenierung in diesem Modell auch das mitochondriale Kalzium, gemessen mit Rhod-2, signifikant erhöht.

Diese Parallelen zu einem I/R Schaden *in vivo* bestätigen die Validität dieses zellulären Modells zur Studie des Reoxygenierungsschadens.

4.2. Rhod-2 verteilt sich vorwiegend mitochondrial

Rhod-2 wird als mitochondrialer Kalziumfluoreszenzfarbstoff beschrieben, da es sich per se bevorzugt in Mitochondrien anreichert. Diese Anreicherung kann jedoch durch die kalte Beladungsmethode nach Trollinger et. al. weiter verstärkt werden, welche hier abgewandelt verwendet wird. Für eine mitochondriale Anreicherung spricht ein streifenförmiges Beladungsmuster, im Gegensatz zu einer diffusen Verteilung bei zytosolischer Lokalisation. (109)

Um die Lokalisation von Rhod-2 zu beurteilen wurden Zellen zusätzlich mit Mitotracker Green beladen, welcher ein selektiver Marker für Mitochondrien darstellt. In der Überlagerung der Mitotracker Green und Rhod-2 Kanäle zeigte sich bereits eine starke Kolokalisation beider Farbstoffe, was für eine mitochondriale Rhod-2 Verteilung spricht. Um diese Kolokalisation zu quantifizieren wurde die integrierte Kolokalisationsanalyse von Zen Black verwendet. Hierbei wurden die Hintergrundpixel, welche nahezu keine Fluoreszenz besitzen, durch Gating nicht miteinbezogen. Die Analyse ergab einen mittleren Korrelationskoeffizienten der beiden Farbstoffe von $R=0.83$, was eine starke Korrelation kennzeichnet. Der mittlere Korrelationskoeffizient von Rhod-2 vs. Mitotracker Green war signifikant erhöht gegenüber Rhod-2 vs. Fluo-4, welcher mit $R=0.172$ nur eine schwache Korrelation kennzeichnet. Somit bestätigte sich objektiv eine hohe Anreicherung von Rhod-2 in den Mitochondrien.

4.3. PERK Inhibition reduziert H/R-vermittelte zytosolische und mitochondriale Kalziumüberladung

In myokardialen sowie renalen Ischämie/Reperfusionsmodellen konnte bereits gezeigt werden, dass es zu einer vermehrten PERK Aktivierung und Phosphorylierung des PERK Substrates eIF2a kommt (121-123). Auch in *in-vitro* H/R Modellen konnte eine vermehrte PERK-Aktivierung und Phosphorylierung von eIF2a festgestellt werden (124, 125). Somit ist auch in diesem zellulären H/R Modell davon auszugehen, dass PERK vermehrt aktiviert wird.

Die vorliegende Arbeit stellt nicht die gut untersuchte Regulation der Proteintranslation und Genexpression durch Aktivierung von PERK in den Mittelpunkt, sondern fokussiert sich auf die Regulation des zellulären Kalziums während Ischämie/Reperfusion. In den Kalziummessungen per Frame Scans zeigte sich eine signifikante Reduktion des zytosolischen Kalziums nach Hypoxie/Reoxygenierung durch PERK Inhibition mit GSK2656157. Dieses Ergebnis knüpft an bisher publizierte Versuche an, in denen gezeigt werden konnte, dass eine Erhöhung des zytosolischen Kalziums unter gewissen Bedingungen PERK-abhängig verläuft: In humanen sowie murinen pankreatischen β -Zellen fanden Wang et. al., dass sich unter pharmakologischer PERK-Inhibition der Anstieg des zytosolischen Kalziums als Reaktion auf Glukoseerhöhung reduzierte, welcher für die Insulinsekretion notwendig ist (97).

Ferner konnten Liu et. al. weitere Zusammenhänge zwischen PERK und zytosolischer Kalziumregulation herstellen. Ziel der Arbeit von Liu et. al. war es, die Entstehung von Arrhythmien in diabetischer Kardiomyopathie zu untersuchen. Das hierfür verwendete Modell waren Ratten mit diabetischer Kardiomyopathie durch Streptozotocin-induzierten Diabetes. In der Proteinanalyse per Western Blot ergab sich eine erhöhte Phosphorylierung von PERK in den Gruppen mit diabetischer Kardiomyopathie. Interessanterweise zeigte sich unter pharmakologischer PERK Inhibition *in vivo* eine signifikante Reduktion ventrikulärer Arrhythmien im EKG. Zusätzlich dazu wurden *in vitro* Untersuchungen an isolierten Kardiomyozyten durchgeführt, um den Mechanismus weiter zu charakterisieren. In einem PERK-Knockdown mit small interfering RNA kam es zu einer Reduktion des zytosolischen Kalziums durch geringere RyR2 Aktivität. (96)

Somit stellt sich die Frage, wie PERK Aktivierung zu einer Regulation von RyR führen kann. Bollo et. al. konnten eine Interaktion von PERK mit Calcineurin in einem Co-immunopräzipitationsassay nachweisen, die unter ER Stress anstieg und die zytosolische Domäne von PERK involvierte (98). Für Calcineurin ist schon länger bekannt, dass es eine Protein-Protein Interaktion mit Ryanodinrezeptoren und FKBP12 Isoformen eingeht (100). FKBP12 ist ein Protein, das die Aktivität der Ryanodinrezeptoren moduliert (126, 127). Die Dissoziation von FKBP12.6 (einer FKBP 12 Isoform) führt hierbei zu einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR im Herzen und einem erhöhten SR Kalziumleck ins Zytosol (128). Zusammengenommen kann somit PERK Aktivierung zu einem Calcineurin und FKBP12.6 vermittelten zytosolischen Kalziumanstieg kommen.

Während sich in den Frame Scan Messungen eine signifikante Reduktion des zytosolischen Kalziums durch PERK Inhibition zeigte, ergab sich durch PERK Inhibition kein Unterschied in der Rate an hyperkontraktilen Zellen. Auf den ersten Blick womöglich ein Widerspruch, gibt es hierfür jedoch mehrere mögliche Gründe. Bleibt über einen längeren Zeitraum das zytosolische Kalzium in Kardiomyozyten stark erhöht, führt dies zur Hyperkontraktur (113). Nach H/R kam es zu einem signifikanten Anstieg der Hyperkontraktilitätsrate der Kardiomyozyten in Kultur, was für einen starken Anstieg des zytosolischen Kalziums durch dieses H/R Modell spricht. Jedoch verblieben immer noch einige Zellen am Ende der Reoxygenierung stabförmig, manche aber mit sichtbaren Spontankontraktionen im Lichtmikroskop, welche auch Indikatoren einer zytosolischen Kalziumüberladung sind (129). Obwohl nach zweistündiger Hypoxie und 30-minütiger Reoxygenierung bereits über 60% der noch zu Beginn des Versuches stabförmigen Zellen in die Hyperkontraktur gegangen sind, ist in 40% der Zellen die Kalziumhomöostase nicht soweit entgleist, dass es letztendlich zur Hyperkontraktur kommt. Diese heterogene Reaktion der Kardiomyozyten ist bereits in der Literatur beschrieben, wobei die genauen Ursachen nicht bekannt sind (130). Mit den stabförmigen Zellen wurden auch die Kalziummessungen durchgeführt. Aus der nicht signifikant unterschiedlichen Hyperkontraktilitätsrate in den H/R Gruppen \pm PERK Inhibition lässt sich somit ableiten, dass PERK Inhibition in gewissen stark geschädigten Zellen die Kalziumüberladung nicht soweit verhindern konnte, dass es nicht zur Hyperkontraktur kommt. Die Zellen, die in Hyperkontraktur verfallen, können durch den mechanischen Schaden nekrotisch werden (51). Andererseits kann eine prolongierte Kalziumüberladung im Ischämie/Reperfusionsschaden neben Nekrose auch zur Apoptose der Zelle führen (75, 131). Sollte die Kalziumüberladung demnach noch nicht so stark sein, dass die Herzmuskelzelle irreversibel hyperkontraktil und nekrotisch wird, aber dennoch durch erhöhtes zytosolisches und mitochondriales Kalzium dem Risiko der Apoptose ausgesetzt ist, kann die PERK Inhibition sich möglicherweise protektiv auswirken.

Durch PERK Inhibition ließ sich zwar das zytosolische Kalzium nach H/R senken, nicht aber das mitochondriale Kalzium. Hierfür gibt es jedoch mehrere mögliche Gründe. Mitochondrien kommt in Kardiomyozyten eine Pufferfunktion für erhöhte zytosolische Kalziumspiegel zu (132). Somit ist generell von einem erhöhten mitochondrialen Kalzium nach H/R auszugehen. Aufgrund der engen räumlichen Nähe von

Mitochondrien zu dem SR sind sie per se lokal höheren Kalziumkonzentrationen als im zytosolischen Zelldurchschnitt ausgesetzt (133). Somit könnte trotz einer globalen Reduktion des zytosolischen Calciums, wie sie mit der mittleren zellulären Fluoreszenz des Fluo-4 gemessen wurde, weiterhin aufgrund der räumlichen Nähe der Mitochondrien zu potenziellen Kalziumfreisetzungen ein erhöhter mitochondrialer Kalziumspiegel bestehen. Weitere Gründe ergeben sich aus der Literatur: In Kardiomyozyten ist bisher nur eine Wirkung von PERK auf RyR beschrieben (96, 99). Somit ist davon auszugehen, dass weiterhin eine Kalziumfreisetzung aus dem ER über IP3 Rezeptoren gewährleistet ist, welche eine enge räumliche Nähe zu Mitochondrien besitzen (134). In Neuronen führte PERK Inhibition sogar zu einer vermehrten Kalziumfreisetzung aus IP3 Rezeptoren (135), wobei unsicher ist, inwiefern dies auch in Kardiomyozyten geschieht. Eine starke globale zytosolische Kalziumerhöhung nach H/R kann womöglich durch PERK Inhibition in einigen Zellen verhindert werden, nicht aber die IP3 vermittelte mitochondriale Kalziumaufnahme.

Verfaillie et. al. konnten zwar zeigen, dass in PERK $-/-$ embryonalen Fibroblasten aus Mäusen die ER/Mitochondrien Kontaktstellen und mitochondriale Kalziumaufnahme gestört waren, allerdings war dieser Effekt in Zellen, in denen nur die Kinasefunktion von PERK entfernt wurde (PERK ΔC) nicht mehr vorhanden (136), was auf eine rein strukturelle Funktion von PERK in der Regulation der mitochondrialen Kalziumaufnahme hinweist.

In den gemessenen Transienten zeigte sich nach H/R mit PERK Inhibition zytosolisch eine signifikante Reduktion der basalen Fluoreszenz, welche das diastolische Kalzium abbildet (137). Dieses Ergebnis verhält sich konkordant zu der Reduktion der Fluo-4 Intensität in den Frame Scans. Im Gegensatz zu den Frame Scans ergab sich in den Transienten zusätzlich eine signifikante Reduktion der basalen Rhod-2 Fluoreszenz nach H/R mit PERK Inhibition, welche für ein reduziertes (diastolisches) mitochondriales Kalzium spricht. Diese unterschiedlichen Ergebnisse können dadurch bedingt sein, dass die Frame Scans ohne vorherige Stimulation ermittelt wurden, und somit ein zytosolisches und mitochondriales Ruhekalziumniveau aufzeigen, welches von der Diastole zu unterscheiden ist (21). Durch elektrische Stimulation erfolgt zwischen Stimuli die Kalziumwiederaufnahme in das SR, wodurch sich mit der Zeit ein neues Gleichgewicht zwischen SR, Zytosol und Mitochondrien ergibt, was so zu einer Reduktion des mitochondrialen Kalziums führen könnte.

Systolisch (gemessen mit $\Delta F/F_0$) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

4.4. Physiologische Notwendigkeit von PERK

Obwohl die Fragestellung dieser Arbeit sich damit befasst, ob durch Inhibition von PERK möglicherweise ein protektiver Effekt induzierbar ist, sollte berücksichtigt werden, dass es diverse Indizien für eine physiologische Notwendigkeit von PERK unter normalen Bedingungen gibt. Eine seltene, autosomal rezessiv vererbte genetische Erkrankung, das Wollcott Rallison Syndrome (WRS), wird durch homozygote loss-of-function Mutationen des PERK-Gens EIF2AK3 verursacht (138). Erstmals wurde es 1972 beschrieben (139), und bis 2013 sind weltweit nur 83 Fälle bekannt (140). Charakteristisch für das WRS sind permanenter neonataler Diabetes, epiphysiale Dysplasie, verzögerte Entwicklung (138, 139) sowie auch eine ZNS-, Herz-, Leber- und Nierenbeteiligung der Erkrankung (141). Durch einen funktionellen Ausfall von PERK sind demnach mehrere Organe in ihrer Funktion und Entwicklung gestört. Eine PERK Inhibition zur Therapie des I/R Schadens sollte vor diesem Hintergrund möglichst kardioselektiv sein.

4.5. Einschränkungen der Messungen und des Modells

An dieser Stelle soll auf die Limitationen der hier verwendeten Techniken eingegangen werden. Da sowohl Fluo-4 als auch Rhod-2 keine ratiometrischen Kalziumfluoreszenzfarbstoffe sind, lässt sich bezüglich der gefundenen Unterschiede der Fluoreszenzintensität nur eine qualitative Aussage treffen. Ein ratiometrischer Kalziumfluoreszenzfarbstoff besitzt nicht nur ein Absorptions- und Emissionsmaximum, sondern unterschiedliche Absorptions- oder Emissionsmaxima in Abhängigkeit davon, ob er an Kalzium gebunden ist oder nicht (116). Durch den Quotienten der Fluoreszenzintensität, gemessen an den beiden Maxima, lässt sich eine quantitative Aussage über Kalziumkonzentrationen geben, die unempfindlicher gegenüber unterschiedlichen Farbstoffkonzentrationen ist (116). Warum wurde in dieser Arbeit dennoch auf einen ratiometrischen Farbstoff verzichtet? Zuerst ist das verwendete Setup aus Laserkonfokalmikroskop und Detektor nicht für ratiometrische Farbstoffe geeignet. Ferner war es durch die Kombination aus einem nicht-ratiometrischen zytosolischen und mitochondrialen Kalziumfluoreszenzfarbstoff möglich, mit dualer Exzitation und Emissionsmessung simultan zytosolisches und mitochondriales Kalzium zu messen. Durch ein standardisiertes Beladungsprotokoll, striktes einhalten der Beladungszeiten und eine gleichbleibende Zellqualität nach Isolation sollte in diesen Versuchen dennoch möglichst eine annähernd gleiche Anreicherung von Fluo-4 und Rhod-2 gewährleistet werden.

Wie sich aus den Originalaufnahmen der fluoreszenztechnischen Bestimmung der Apoptose per TUNEL bereits ergibt, erwies sich diese Technik nicht als geeignet, um in adulten Kardiomyozyten Apoptose nach Hypoxie/Reoxygenierung zu detektieren. Obwohl es in der Literatur mehrere Beispiele gibt, die eine erhöhte Apoptoserate in Kardiomyozyten nach H/R erfolgreich per TUNEL detektieren konnten (142-144), wurden in diesen Studien keine adulten Kardiomyozyten verwendet. Neonatale und embryonische Kardiomyozyten weisen jedoch grundlegende Unterschiede zu adulten Kardiomyozyten auf, wie z.B. eine noch vorhandene Fähigkeit zur Zellteilung, andere elektrophysiologische Eigenschaften sowie unterschiedliche Morphologie, und erschweren somit eine Translation der Ergebnisse auf den adulten Organismus (145). Da es in-vivo Ergebnisse gibt, in denen in Gewebsschnitten eine erhöhte Apoptoserate nachgewiesen werden konnte (146), scheint in dieser Arbeit bezüglich der TUNEL Messung eher ein methodisches Problem vorzuliegen. Auffälliger Weise waren keine

runden, hyperkontraktilen Kardiomyozyten in der Fluoreszenzmikroskopie zu sehen, obwohl diese lichtmikroskopisch gehäuft in den H/R Gruppen zu sehen waren. Vermutlich haben sich Zellen infolge einer Kalziumüberladung im Rahmen der Apoptose durch Spontankontraktionen gelöst oder irreversibel hyperkontrahiert, und hatten anschließend nicht mehr eine ausreichend große Adhäsionsfläche um über das Laminin an dem Objektträger zu haften. Aufgrund der Vielzahl zwingend notwendiger Wasch- und Färbeschritte der TUNEL Methode lösten sich die apoptotischen Zellen ab, und dieser systematische Fehler ließ sich nicht beheben. Alternativ wurde deshalb das verblindete Auszählen hyperkontraktiler Zellen als proof-of-principle verwendet. Aus diesen Erkenntnissen lässt sich schließen, dass eine Apoptosebestimmung in adulten Kardiomyozyten eher in Gewebsschnitten als mit isolierten Zellen angestrebt werden sollte.

Das hier verwendete *in-vitro* H/R Modell soll den *in-vivo* I/R Prozess möglichst getreu abbilden, jedoch bleiben gewisse Unterschiede bestehen. Die durch den Infarkt entstehende Hypoxie, Azidose, Nährstoffentzug und Energiedepletion wurden in diesem H/R Modell berücksichtigt. Ferner stellen zwei Stunden eine Praxisnahe Ischämiezeit dar. Während *in-vivo* jedoch zusätzlich noch die mikrovaskuläre Obstruktion, Entzündung, Ödembildung, und zirkulierenden Immunzellen einen Beitrag zum Reperfusionsschaden leisten, fehlen diese Mediatoren im zellulären H/R Modell. Außerdem wird das Myokard *in-vivo* durchgehend stimuliert, was mit einem erheblichen Energieverbrauch einhergeht und den ischämischen Schaden aggraviert. Trotz der hohen Spezifität des PERK Inhibitors GSK2656157, belegt durch niedrige IC₅₀ Werte für andere exemplarische Kinasen, ist eine gewisse pleiotrope Wirkung des Inhibitors nicht auszuschließen. Um die genauen Effekte einer PERK Inhibition während I/R noch besser zu beurteilen, sollten Versuche mit einem PERK Knockout Modell erfolgen. Einerseits ließe sich in einem (murinen) PERK Knockout die von Verfaillie et. al. beschriebene strukturelle Funktion von PERK untersuchen (136), sowie durch einen PERK ΔC Knockout die Kinasefunktion noch spezifischer inhibieren. Zu beachten bleibt hierbei jedoch die erschwerte Übertragbarkeit von Ergebnissen aus murinen *in-vivo* I/R Versuchen auf den Menschen. Diese wird mitunter bedingt durch die grundsätzlich höhere Herzfrequenz von Mäusen und Ratten, die geringere Herzgröße, welche unter Umständen eine subendokardiale Sauerstoff- und Nährstoffversorgung durch kürzere Diffusionsstrecken ermöglicht, sowie genetisch bedingte unterschiedliche Reaktionen auf I/R zwischen

Mäusestämmen (147). Ferner sollte berücksichtigt werden, dass in der klinischen Situation die Inhibition von einem einzigen Mechanismus möglicherweise nicht ausreichend ist um einen Effekt mit ausreichender Stärke zu erzeugen, da hier viele unkontrollierte Kovariablen existieren, die Einfluss auf den Verlauf nehmen (148).

5. Zusammenfassung

Die ischämische Herzerkrankung und dessen Folgen stellen global eine zunehmende Belastung für Gesundheitssysteme dar. Insbesondere der Reperfusionsschaden, der nach einem Myokardinfarkt auftritt, rückt hier zunehmend in den Fokus. Während sich in der Therapie des STEMI die Strategien zur Reduktion der Infarktgröße und somit späteren Auswirkungen wie Herzinsuffizienz bisher ausschließlich auf das Verkürzen der Ischämiephase konzentriert haben, bietet die Therapie des Reperfusionsschadens noch viel Potenzial. Eine zeitnahe Reperfusion erweist sich als unerlässlich, da sonst das betroffene Myokardareal zwangsläufig verstirbt. In tierischen Modellen konnte jedoch gezeigt werden, dass der durch Reperfusion bedingte Infarktschaden einen beträchtlichen Anteil am Gesamtfarktschaden ausmacht. Deshalb sollte ein STEMI primär als Ischämie/Reperfusionereignis betrachtet werden. Trotz zahlreicher erfolgreicher (tier-) experimenteller Ansätze, sowie mehreren Patientenstudien zu pharmakologischer oder anderweitiger Reduktion des Reperfusionsschadens erweist sich die Translation in die Klinik als schleppend und diffizil.

In dieser Arbeit sollte ein neuer, möglicherweise therapeutischer, Ansatz zur Reduktion des Reperfusionsschadens untersucht werden. Hierzu dienten die pharmakologische Inhibition der „PKR-like endoplasmic reticulum kinase“ (PERK) in einem Hypoxie/Reoxygenierungsmodell an isolierten Kardiomyozyten aus Ratten. PERK wird durch Ischämie/Reperfusion aber auch in zellulären Hypoxie/Reoxygenierungsmodellen aktiviert. Neben einem Einfluss auf die Apoptoseinduktion, welcher eine beträchtliche Rolle in der Entstehung des Reperfusionsschadens zukommt, ist eine Einflussnahme von PERK auf zytosolisches Kalzium bekannt. Als Endpunkte in dieser Arbeit wurden zytosolisches und mitochondriales Kalzium laserkonfokalmikroskopisch gemessen sowie die Hyperkontraktilität der Kardiomyozyten betrachtet. Das Quantifizieren der Apoptose erwies sich hingegen mit den verwendeten Methoden als frustan.

Durch PERK Inhibition mit GSK2656157 konnte in dieser Arbeit eine Reduktion des zytosolischen Kalziums nach Hypoxie/Reoxygenierung nachgewiesen werden. Ferner zeigte sich unter Normoxie eine basale Erhöhung des mitochondrialen Kalziums durch Anwendung von GSK2656157. Eine Reduktion des mitochondrialen Kalziums nach Hypoxie/Reoxygenierung konnte unter PERK Inhibition nicht festgestellt werden. Der genaue Mechanismus, über den die Reduktion des zytosolischen Kalziums zustande

kommt, ist noch unklar. Möglich und in dieser Arbeit diskutiert wäre eine Wirkung von PERK auf Ryanodinrezeptoren. Zur tiefergreifenden Evaluation dieses Effekts und des Mechanismus sind weitere Versuche notwendig. Wünschenswert hierfür wäre zudem ein genetisches PERK Knockout Modell. Ferner wurden die Versuche in dieser Arbeit an isolierten Kardiomyozyten durchgeführt, aussagekräftiger sollte die Analyse in einem in-vivo Ischämie/Reperfusionsmodell sein.

6. Literaturverzeichnis

1. Naghavi M, Abajobir AA, Abbafati C, Abbas KM, Abd-Allah F, Abera SF, et al. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet*. 2017;390(10100):1151-210. doi: 10.1016/s0140-6736(17)32152-9.
2. Herold G. *Innere Medizin*. Köln 2016. p. 240.
3. *Harrisons Innere Medizin*. 2. 19 ed. Berlin: deutsche Ausgabe von ABW Wissenschaftsverlag GmbH; 2016. p. 1920-68.
4. Pepine CJ, Nichols WW. The pathophysiology of chronic ischemic heart disease. *Clin Cardiol*. 2007;30(2 Suppl 1):I4-9. Epub 2007/02/01. doi: 10.1002/clc.20048. PubMed PMID: 18373328.
5. Gourdie RG, Dimmeler S, Kohl P. Novel therapeutic strategies targeting fibroblasts and fibrosis in heart disease. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2016;15(9):620-38. doi: 10.1038/nrd.2016.89.
6. Olivetti G, Cigola E, Maestri R, Corradi D, Lagrasta C, Gambert SR, et al. Aging, cardiac hypertrophy and ischemic cardiomyopathy do not affect the proportion of mononucleated and multinucleated myocytes in the human heart. *J Mol Cell Cardiol*. 1996;28(7):1463-77. Epub 1996/07/01. doi: 10.1006/jmcc.1996.0137. PubMed PMID: 8841934.
7. Severs NJ. The cardiac muscle cell. *BioEssays*. 2000;22(2):188-99. doi: 10.1002/(sici)1521-1878(200002)22:2<188::Aid-bies10>3.0.Co;2-t.
8. Bensley JG, De Matteo R, Harding R, Black MJ. Three-dimensional direct measurement of cardiomyocyte volume, nuclearity, and ploidy in thick histological sections. *Sci Rep*. 2016;6:23756. Epub 2016/04/07. doi: 10.1038/srep23756. PubMed PMID: 27048757; PubMed Central PMCID: PMC4822151.
9. De Mello WC. Intercellular communication in cardiac muscle. *Circ Res*. 1982;51(1):1-9. Epub 1982/07/01. PubMed PMID: 6282496.
10. Green CR, Severs NJ. Gap junction connexon configuration in rapidly frozen myocardium and isolated intercalated disks. *J Cell Biol*. 1984;99(2):453-63. Epub 1984/08/01. doi: 10.1083/jcb.99.2.453. PubMed PMID: 6086670; PubMed Central PMCID: PMC2113286.
11. Page E, Shibata Y. Permeable junctions between cardiac cells. *Annu Rev Physiol*. 1981;43:431-41. Epub 1981/01/01. doi: 10.1146/annurev.ph.43.030181.002243. PubMed PMID: 7011194.
12. Welsch U, Deller T. *Lehrbuch Histologie*. 3 ed. München: Urban & Fischer; 2010. p. 124-39.
13. Huxley AF, Niedergerke R. Structural Changes in Muscle During Contraction: Interference Microscopy of Living Muscle Fibres. *Nature*. 1954;173(4412):971-3. doi: 10.1038/173971a0.
14. Huxley HE. The Mechanism of Muscular Contraction. *Science*. 1969;164(3886):1356-66.
15. Yanagida T, Arata T, Oosawa F. Sliding distance of actin filament induced by a myosin crossbridge during one ATP hydrolysis cycle. *Nature*. 1985;316(6026):366-9. doi: 10.1038/316366a0.
16. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002;415(6868):198-205. Epub 2002/01/24. doi: 10.1038/415198a. PubMed PMID: 11805843.

17. Ter Keurs HE, Boyden PA. Calcium and arrhythmogenesis. *Physiol Rev.* 2007;87(2):457-506. Epub 2007/04/13. doi: 10.1152/physrev.00011.2006. PubMed PMID: 17429038; PubMed Central PMCID: PMC4332537.
18. Sham JS, Cleemann L, Morad M. Gating of the cardiac Ca²⁺ release channel: the role of Na⁺ current and Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchange. *Science.* 1992;255(5046):850-3. Epub 1992/02/14. PubMed PMID: 1311127.
19. Stern MD. Theory of excitation-contraction coupling in cardiac muscle. *Biophys J.* 1992;63(2):497-517. Epub 1992/08/01. doi: 10.1016/S0006-3495(92)81615-6. PubMed PMID: 1330031; PubMed Central PMCID: PMC4332537.
20. Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol.* 1983;245(1):C1-14. Epub 1983/07/01. doi: 10.1152/ajpcell.1983.245.1.C1. PubMed PMID: 6346892.
21. Eisner DA, Caldwell JL, Kistamás K, Trafford AW. Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. *Circulation Research.* 2017;121(2):181-95. doi: 10.1161/circresaha.117.310230.
22. Wescott AP, Jafri MS, Lederer WJ, Williams GS. Ryanodine receptor sensitivity governs the stability and synchrony of local calcium release during cardiac excitation-contraction coupling. *J Mol Cell Cardiol.* 2016;92:82-92. Epub 2016/02/02. doi: 10.1016/j.yjmcc.2016.01.024. PubMed PMID: 26827896; PubMed Central PMCID: PMC4807626.
23. Gordon AM, Regnier M, Homsher E. Skeletal and cardiac muscle contractile activation: tropomyosin "rocks and rolls". *News Physiol Sci.* 2001;16:49-55. Epub 2001/06/08. PubMed PMID: 11390948.
24. Bremel RD, Weber A. Cooperation within Actin Filament in Vertebrate Skeletal Muscle. *Nature New Biology.* 1972;238(82):97-101. doi: 10.1038/newbio238097a0.
25. Shattock MJ, Ottolia M, Bers DM, Blaustein MP, Boguslavskyi A, Bossuyt J, et al. Na⁺/Ca²⁺ exchange and Na⁺/K⁺-ATPase in the heart. *J Physiol.* 2015;593(6):1361-82. Epub 2015/03/17. doi: 10.1113/jphysiol.2014.282319. PubMed PMID: 25772291; PubMed Central PMCID: PMC4376416.
26. Davies MJ, Thomas A. Thrombosis and Acute Coronary-Artery Lesions in Sudden Cardiac Ischemic Death. *New England Journal of Medicine.* 1984;310(18):1137-40. doi: 10.1056/nejm198405033101801. PubMed PMID: 6709008.
27. Zhou J, Chew M, Ravn HB, Falk E. Plaque pathology and coronary thrombosis in the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation.* 1999;59(sup230):3-11. doi: 10.1080/00365519909168321.
28. Bertrand ME, LaBlanche JM, Tilmant PY, Thieuleux FA, Delforge MR, Carre AG, et al. Frequency of provoked coronary arterial spasm in 1089 consecutive patients undergoing coronary arteriography. *Circulation.* 1982;65(7):1299-306. Epub 1982/06/01. PubMed PMID: 7200405.
29. Ware JA, Simons M. Angiogenesis in ischemic heart disease. *Nature Medicine.* 1997;3(2):158-64. doi: 10.1038/nm0297-158.
30. Ardissino D, Merlini PA, Ariëns R, Coppola R, Bramucci E, Mannucci PM. Tissue-factor antigen and activity in human coronary atherosclerotic plaques. *The Lancet.* 1997;349(9054):769-71. doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)11189-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)11189-2).
31. Zucker MB, Nachmias VT. Platelet activation. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex).* 1985;5(1):2-18. Epub 1985/01/01. PubMed PMID: 2981527.

32. Lopez JA, Armstrong ML, Piegors DJ, Heistad DD. Effect of early and advanced atherosclerosis on vascular responses to serotonin, thromboxane A₂, and ADP. *Circulation*. 1989;79(3):698-705. doi: doi:10.1161/01.CIR.79.3.698.
33. Nemerson Y. Tissue factor and hemostasis [published erratum appears in *Blood* 1988 Apr;71(4):1178]. *Blood*. 1988;71(1):1.
34. Schröder M, Möckel M. Perkutane koronare Intervention und andere interventionelle Verfahren. 2016. In: *Harrisons Innere Medizin* [Internet]. ABW Wissenschaftsverlag. Available from: www.Harrison19.de.
35. Moses JW, Leon MB, Popma JJ, Fitzgerald PJ, Holmes DR, O'Shaughnessy C, et al. Sirolimus-Eluting Stents versus Standard Stents in Patients with Stenosis in a Native Coronary Artery. *New England Journal of Medicine*. 2003;349(14):1315-23. doi: 10.1056/NEJMoa035071.
36. Serruys PW, Ong ATL, Piek JJ, Neumann F-J, van der Giessen WJ, Wiemer M, et al. A randomized comparison of a durable polymer Everolimus-eluting stent with a bare metal coronary stent: The SPIRIT first trial. *EuroIntervention*. 2005;1(1):58-65. PubMed PMID: 19758878.
37. Maisel WH. Unanswered Questions — Drug-Eluting Stents and the Risk of Late Thrombosis. *New England Journal of Medicine*. 2007;356(10):981-4. doi: 10.1056/NEJMp068305.
38. Piper HM, Garcia-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovascular Research*. 1998;38(2):291-300. doi: Doi 10.1016/S0008-6363(98)00033-9. PubMed PMID: WOS:000074585800003.
39. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. 2007;357(11):1121-35. Epub 2007/09/15. doi: 10.1056/NEJMra071667. PubMed PMID: 17855673.
40. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest*. 2013;123(1):92-100. Epub 2013/01/03. doi: 10.1172/JCI62874. PubMed PMID: 23281415; PubMed Central PMCID: PMC3533275.
41. Li X, Liu M, Sun R, Zeng Y, Chen S, Zhang P. Protective approaches against myocardial ischemia reperfusion injury. *Exp Ther Med*. 2016;12(6):3823-9. Epub 2017/01/20. doi: 10.3892/etm.2016.3877. PubMed PMID: 28101167; PubMed Central PMCID: PMC35228114.
42. Pike MM, Luo CS, Clark MD, Kirk KA, Kitakaze M, Madden MC, et al. NMR measurements of Na⁺ and cellular energy in ischemic rat heart: role of Na⁽⁺⁾-H⁺ exchange. *Am J Physiol*. 1993;265(6 Pt 2):H2017-26. Epub 1993/12/11. doi: 10.1152/ajpheart.1993.265.6.H2017. PubMed PMID: 8285240.
43. Schafer C, Ladilov Y, Inserte J, Schafer M, Haffner S, Garcia-Dorado D, et al. Role of the reverse mode of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. *Cardiovasc Res*. 2001;51(2):241-50. Epub 2001/07/27. PubMed PMID: 11470463.
44. Inserte J, Barba I, Poncelas-Nozal M, Hernando V, Agullo L, Ruiz-Meana M, et al. cGMP/PKG pathway mediates myocardial postconditioning protection in rat hearts by delaying normalization of intracellular acidosis during reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;50(5):903-9. Epub 2011/03/03. doi: 10.1016/j.yjmcc.2011.02.013. PubMed PMID: 21362429.
45. Crompton M, Costi A. A heart mitochondrial Ca²⁺(+)-dependent pore of possible relevance to re-perfusion-induced injury. Evidence that ADP facilitates pore interconversion between the closed and open states. *Biochem J*. 1990;266(1):33-9. Epub 1990/02/15. PubMed PMID: 2106875; PubMed Central PMCID: PMC351131092.

46. Halestrap AP. A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection. *Biochem Soc Trans.* 2010;38(4):841-60. Epub 2010/07/28. doi: 10.1042/BST0380841. PubMed PMID: 20658967.
47. Pizzo SV, Zhang C, Tang Y, Li Y, Xie L, Zhuang W, et al. Unfolded protein response plays a critical role in heart damage after myocardial ischemia/reperfusion in rats. *Plos One.* 2017;12(6). doi: 10.1371/journal.pone.0179042.
48. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Ischemia/Reperfusion. *Compr Physiol.* 2016;7(1):113-70. Epub 2017/01/31. doi: 10.1002/cphy.c160006. PubMed PMID: 28135002; PubMed Central PMCID: PMC5648017.
49. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology.* 2001;94(6):1133-8. Epub 2001/07/24. PubMed PMID: 11465607.
50. Ventura-Clapier R, Veksler V. Myocardial ischemic contracture. Metabolites affect rigor tension development and stiffness. *Circ Res.* 1994;74(5):920-9. Epub 1994/05/01. doi: 10.1161/01.res.74.5.920. PubMed PMID: 8156639.
51. Siegmund B, Schluter KD, Piper HM. Calcium and the oxygen paradox. *Cardiovasc Res.* 1993;27(10):1778-83. Epub 1993/10/01. doi: 10.1093/cvr/27.10.1778. PubMed PMID: 8275523.
52. Zweier JL, Flaherty JT, Weisfeldt ML. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(5):1404-7. Epub 1987/03/01. PubMed PMID: 3029779; PubMed Central PMCID: PMC304438.
53. Xu L, Eu JP, Meissner G, Stamler JS. Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science.* 1998;279(5348):234-7. Epub 1998/01/31. doi: 10.1126/science.279.5348.234. PubMed PMID: 9422697.
54. Kim JS, Wang JH, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in rat hepatocytes after anoxia/reoxygenation: role of Ca²⁺-dependent mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012;302(7):G723-31. Epub 2012/01/14. doi: 10.1152/ajpgi.00082.2011. PubMed PMID: 22241863; PubMed Central PMCID: PMC3330780.
55. Crompton M, Costi A. Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca²⁺, inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca²⁺ overload. *Eur J Biochem.* 1988;178(2):489-501. Epub 1988/12/15. PubMed PMID: 2850179.
56. Zorov DB, Filburn CR, Klotz LO, Zweier JL, Sollott SJ. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *J Exp Med.* 2000;192(7):1001-14. Epub 2000/10/04. doi: 10.1084/jem.192.7.1001. PubMed PMID: 11015441; PubMed Central PMCID: PMC2193314.
57. Chen YR, Zweier JL. Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation. *Circ Res.* 2014;114(3):524-37. Epub 2014/02/01. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.300559. PubMed PMID: 24481843; PubMed Central PMCID: PMC4118662.
58. Jaffe R, Charron T, Puley G, Dick A, Strauss BH. Microvascular obstruction and the no-reflow phenomenon after percutaneous coronary intervention. *Circulation.* 2008;117(24):3152-6. Epub 2008/06/19. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.742312. PubMed PMID: 18559715.
59. Heusch G, Kleinbongard P, Bose D, Levkau B, Haude M, Schulz R, et al. Coronary microembolization: from bedside to bench and back to bedside. *Circulation.*

- 2009;120(18):1822-36. Epub 2009/11/04. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.888784. PubMed PMID: 19884481.
60. Morishima I, Sone T, Okumura K, Tsuboi H, Kondo J, Mukawa H, et al. Angiographic no-reflow phenomenon as a predictor of adverse long-term outcome in patients treated with percutaneous transluminal coronary angioplasty for first acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2000;36(4):1202-9. Epub 2000/10/12. PubMed PMID: 11028471.
61. O'Farrell FM, Mastitskaya S, Hammond-Haley M, Freitas F, Wah WR, Attwell D. Capillary pericytes mediate coronary no-reflow after myocardial ischaemia. *eLife.* 2017;6. doi: 10.7554/eLife.29280.
62. Costa MA, Paiva AE, Andreotti JP, Cardoso MV, Cardoso CD, Mintz A, et al. Pericytes constrict blood vessels after myocardial ischemia. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 2018;116:1-4. doi: 10.1016/j.yjmcc.2018.01.014.
63. Szocs K. Endothelial dysfunction and reactive oxygen species production in ischemia/reperfusion and nitrate tolerance. *Gen Physiol Biophys.* 2004;23(3):265-95. Epub 2005/01/11. PubMed PMID: 15638116.
64. Peters SC, Piper HM. Reoxygenation-induced Ca²⁺ rise is mediated via Ca²⁺ influx and Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum in cardiac endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 2007;73(1):164-71. Epub 2006/11/14. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.09.015. PubMed PMID: 17097624.
65. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26(4):239-57. Epub 1972/08/01. doi: 10.1038/bjc.1972.33. PubMed PMID: 4561027; PubMed Central PMCID: PMC2008650.
66. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516. Epub 2007/06/15. doi: 10.1080/01926230701320337. PubMed PMID: 17562483; PubMed Central PMCID: PMC2117903.
67. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000;407(6805):770-6. Epub 2000/10/26. doi: 10.1038/35037710. PubMed PMID: 11048727.
68. Fliss H, Gattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res.* 1996;79(5):949-56. Epub 1996/11/01. PubMed PMID: 8888687.
69. James TN. Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart: from postnatal morphogenesis to paroxysmal arrhythmias. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 1994;105:145-77; discussion 77-8. Epub 1993/01/01. PubMed PMID: 7974966; PubMed Central PMCID: PMC2376730.
70. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. *Biochemie.* 4 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2016. p. 379-85; 533-7.
71. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 1998;281(5381):1309-12. Epub 1998/08/28. PubMed PMID: 9721092.
72. Halestrap A. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion—a target for cardioprotection. *Cardiovascular Research.* 2004;61(3):372-85. doi: 10.1016/s0008-6363(03)00533-9.
73. Halestrap AP. What is the mitochondrial permeability transition pore? *J Mol Cell Cardiol.* 2009;46(6):821-31. Epub 2009/03/07. doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.02.021. PubMed PMID: 19265700.
74. Halestrap AP, Richardson AP. The mitochondrial permeability transition: a current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;78:129-41. Epub 2014/09/03. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.08.018. PubMed PMID: 25179911.

75. Weiss JN, Korge P, Honda HM, Ping P. Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease. *Circ Res.* 2003;93(4):292-301. Epub 2003/08/23. doi: 10.1161/01.RES.0000087542.26971.D4. PubMed PMID: 12933700.
76. Boersma E, Maas AC, Deckers JW, Simoons ML. Early thrombolytic treatment in acute myocardial infarction: reappraisal of the golden hour. *Lancet.* 1996;348(9030):771-5. Epub 1996/09/21. doi: 10.1016/S0140-6736(96)02514-7. PubMed PMID: 8813982.
77. Pazos-Lopez P, Peteiro-Vazquez J, Carcia-Campos A, Garcia-Bueno L, de Torres JP, Castro-Beiras A. The causes, consequences, and treatment of left or right heart failure. *Vasc Health Risk Manag.* 2011;7:237-54. Epub 2011/05/24. doi: 10.2147/VHRM.S10669. PubMed PMID: 21603593; PubMed Central PMCID: PMC3096504.
78. Peng J, Gurantz D, Tran V, Cowling RT, Greenberg BH. Tumor Necrosis Factor- α -Induced AT1 Receptor Upregulation Enhances Angiotensin II-Mediated Cardiac Fibroblast Responses That Favor Fibrosis. *Circulation Research.* 2002;91(12):1119-26. doi: 10.1161/01.Res.0000047090.08299.D5.
79. Frangogiannis NG. Inflammation in cardiac injury, repair and regeneration. *Current Opinion in Cardiology.* 2015;30(3):240-5. doi: 10.1097/hco.0000000000000158.
80. Siwik DA, Colucci WS. Regulation of matrix metalloproteinases by cytokines and reactive oxygen/nitrogen species in the myocardium. *Heart Fail Rev.* 2004;9(1):43-51. Epub 2004/01/24. doi: 10.1023/B:HREV.0000011393.40674.13. PubMed PMID: 14739767.
81. GunjaSmith Z, Morales AR, Romanelli R, Woessner JF. Remodeling of human myocardial collagen in idiopathic dilated cardiomyopathy - Role of metalloproteinases and pyridinoline cross-links. *American Journal of Pathology.* 1996;148(5):1639-48. PubMed PMID: WOS:A1996UJ47300030.
82. Hegyi B, Bossuyt J, Griffiths LG, Shimkunas R, Coulibaly Z, Jian Z, et al. Complex electrophysiological remodeling in postinfarction ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(13):E3036-E44. Epub 2018/03/14. doi: 10.1073/pnas.1718211115. PubMed PMID: 29531045; PubMed Central PMCID: PMC5879679.
83. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(7):519-29. Epub 2007/06/15. doi: 10.1038/nrm2199. PubMed PMID: 17565364.
84. Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature.* 1999;397(6716):271-4. Epub 1999/02/04. doi: 10.1038/16729. PubMed PMID: 9930704.
85. Cui W, Li J, Ron D, Sha B. The structure of the PERK kinase domain suggests the mechanism for its activation. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography.* 2011;67(5):423-8. doi: 10.1107/s0907444911006445.
86. Thuerauf DJ, Marcinko M, Gude N, Rubio M, Sussman MA, Glembotski CC. Activation of the unfolded protein response in infarcted mouse heart and hypoxic cultured cardiac myocytes. *Circ Res.* 2006;99(3):275-82. Epub 2006/06/24. doi: 10.1161/01.RES.0000233317.70421.03. PubMed PMID: 16794188.
87. Hetz C, Chevet E, Oakes SA. Proteostasis control by the unfolded protein response. *Nat Cell Biol.* 2015;17(7):829-38. Epub 2015/07/01. doi: 10.1038/ncb3184. PubMed PMID: 26123108; PubMed Central PMCID: PMC35546321.
88. Wang X, Xu L, Gillette TG, Jiang X, Wang ZV. The unfolded protein response in ischemic heart disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 2018;117:19-25. doi: 10.1016/j.yjmcc.2018.02.013.

89. Toth A, Nickson P, Mandl A, Bannister ML, Toth K, Erhardt P. Endoplasmic reticulum stress as a novel therapeutic target in heart diseases. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2007;7(3):205-18. Epub 2007/09/28. PubMed PMID: 17896961.
90. Wang M, Wey S, Zhang Y, Ye R, Lee AS. Role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in development, cancer, and neurological disorders. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(9):2307-16. Epub 2009/03/25. doi: 10.1089/ARS.2009.2485. PubMed PMID: 19309259; PubMed Central PMCID: PMCPMC2819800.
91. Shi YG, Vattem KM, Sood R, An J, Liang JD, Stramm L, et al. Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control. *Molecular and Cellular Biology*. 1998;18(12):7499-509. doi: Doi 10.1128/Mcb.18.12.7499. PubMed PMID: WOS:000077099700060.
92. Wang P, Li J, Sha B. The ER stress sensor PERK luminal domain functions as a molecular chaperone to interact with misfolded proteins. *Acta Crystallogr D Struct Biol*. 2016;72(Pt 12):1290-7. Epub 2016/12/06. doi: 10.1107/S2059798316018064. PubMed PMID: 27917829; PubMed Central PMCID: PMCPMC5137225.
93. Groenendyk J, Sreenivasaiiah PK, Kim DH, Agellon LB, Michalak M. Biology of Endoplasmic Reticulum Stress in the Heart. *Circulation Research*. 2010;107(10):1185-97. doi: 10.1161/circresaha.110.227033.
94. Ma K, Vattem KM, Wek RC. Dimerization and release of molecular chaperone inhibition facilitate activation of eukaryotic initiation factor-2 kinase in response to endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*. 2002;277(21):18728-35. Epub 2002/03/22. doi: 10.1074/jbc.M200903200. PubMed PMID: 11907036.
95. Carrara M, Prisci F, Nowak PR, Ali MM. Crystal structures reveal transient PERK luminal domain tetramerization in endoplasmic reticulum stress signaling. *EMBO J*. 2015;34(11):1589-600. Epub 2015/05/01. doi: 10.15252/embj.201489183. PubMed PMID: 25925385; PubMed Central PMCID: PMCPMC4474532.
96. Liu Z, Cai H, Zhu H, Toque H, Zhao N, Qiu C, et al. Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)/calcineurin signaling is a novel pathway regulating intracellular calcium accumulation which might be involved in ventricular arrhythmias in diabetic cardiomyopathy. *Cell Signal*. 2014;26(12):2591-600. Epub 2014/08/26. doi: 10.1016/j.cellsig.2014.08.015. PubMed PMID: 25152364.
97. Wang R, McGrath BC, Kopp RF, Roe MW, Tang X, Chen G, et al. Insulin secretion and Ca²⁺ dynamics in beta-cells are regulated by PERK (EIF2AK3) in concert with calcineurin. *J Biol Chem*. 2013;288(47):33824-36. Epub 2013/10/12. doi: 10.1074/jbc.M113.503664. PubMed PMID: 24114838; PubMed Central PMCID: PMCPMC3837125.
98. Bollo M, Paredes RM, Holstein D, Zheleznova N, Camacho P, Lechleiter JD. Calcineurin interacts with PERK and dephosphorylates calnexin to relieve ER stress in mammals and frogs. *PLoS One*. 2010;5(8):e11925. Epub 2010/08/12. doi: 10.1371/journal.pone.0011925. PubMed PMID: 20700529; PubMed Central PMCID: PMCPMC2916823.
99. Liu Z, Lv Y, Zhao N, Guan G, Wang J. Protein kinase R-like ER kinase and its role in endoplasmic reticulum stress-decided cell fate. *Cell Death Dis*. 2015;6:e1822. Epub 2015/08/01. doi: 10.1038/cddis.2015.183. PubMed PMID: 26225772; PubMed Central PMCID: PMCPMC4650730.
100. Bandyopadhyay A, Shin DW, Ahn JO, Kim DH. Calcineurin regulates ryanodine receptor/Ca(2+)-release channels in rat heart. *Biochem J*. 2000;352 Pt 1:61-70. Epub 2000/11/04. PubMed PMID: 11062058; PubMed Central PMCID: PMCPMC1221432.
101. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2012;298(1937-6448 (Print)):229-317. Epub 2012/08/11. doi:

- 10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7. PubMed PMID: 22878108; PubMed Central PMCID: PMC3904795.
102. Credle JJ, Finer-Moore JS, Papa FR, Stroud RM, Walter P. On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(52):18773-84. Epub 2005/12/21. doi: 10.1073/pnas.0509487102. PubMed PMID: 16365312; PubMed Central PMCID: PMC316886.
103. Tirasophon W, Welihinda AA, Kaufman RJ. A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev*. 1998;12(12):1812-24. Epub 1998/06/24. PubMed PMID: 9637683; PubMed Central PMCID: PMC316900.
104. Calton M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, et al. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*. 2002;415(6867):92-6. Epub 2002/01/10. doi: 10.1038/415092a. PubMed PMID: 11780124.
105. Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell*. 1999;10(11):3787-99. Epub 1999/11/17. doi: 10.1091/mbc.10.11.3787. PubMed PMID: 10564271; PubMed Central PMCID: PMC316900.
106. Yamamoto K, Sato T, Matsui T, Sato M, Okada T, Yoshida H, et al. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. *Dev Cell*. 2007;13(3):365-76. Epub 2007/09/04. doi: 10.1016/j.devcel.2007.07.018. PubMed PMID: 17765680.
107. Atkins C, Liu Q, Minthorn E, Zhang SY, Figueroa DJ, Moss K, et al. Characterization of a novel PERK kinase inhibitor with antitumor and antiangiogenic activity. *Cancer Res*. 2013;73(6):1993-2002. Epub 2013/01/22. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3109. PubMed PMID: 23333938.
108. Anderson ME. CaMKII and a failing strategy for growth in heart. *Journal of Clinical Investigation*. 2009;119(5):1082-5. doi: 10.1172/jci39262.
109. Trollinger DR, Cascio WE, Lemasters JJ. Selective loading of Rhod 2 into mitochondria shows mitochondrial Ca²⁺ transients during the contractile cycle in adult rabbit cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;236(3):738-42. Epub 1997/07/30. doi: 10.1006/bbrc.1997.7042. PubMed PMID: 9245725.
110. The Molecular Probes® Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies. 11 ed 2010.
111. Thermofischer Fluorescence Spectraviewer [21.02.2018]. Available from: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>.
112. Zeiss LSM 700 Light Pathways [20.10.2018]. Available from: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/tutorials/spectralimaging/lsm700/indexflash.html>.
113. Loughrey CM, MacEachern KE, Neary P, Smith GL. The Relationship between Intracellular [Ca²⁺] and Ca²⁺Wave Characteristics in Permeabilised Cardiomyocytes from the Rabbit. *The Journal of Physiology*. 2002;543(3):859-70. doi: 10.1113/jphysiol.2002.021519.
114. Page MT, Quintana PJE, Ligutti JA, Sabbadini RA. Cell Death in Cultured Adult Rat Cardiomyocytes: Use of the Comet Assay to Distinguish Apoptosis from Necrosis. *Basic and Applied Myology*. 2000;10(4):159-70.
115. Razali NM, Wah YB. Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. *Journal of Statistical Modeling and Analytics*. 2011;2:21-33.

116. Bootman MD, Rietdorf K, Collins T, Walker S, Sanderson M. Ca²⁺-sensitive fluorescent dyes and intracellular Ca²⁺ imaging. *Cold Spring Harb Protoc.* 2013. 2013/02/05 ed2013. p. 83-99.
117. Frank A, Bonney M, Bonney S, Weitzel L, Koeppe M, Eckle T. Myocardial ischemia reperfusion injury: from basic science to clinical bedside. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth.* 2012;16(3):123-32. Epub 2012/03/01. doi: 10.1177/1089253211436350. PubMed PMID: 22368166; PubMed Central PMCID: PMC3457795.
118. Park KM, Teoh JP, Wang Y, Broskova Z, Bayoumi AS, Tang Y, et al. Carvedilol-responsive microRNAs, miR-199a-3p and -214 protect cardiomyocytes from simulated ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2016;311(2):H371-83. Epub 2016/06/12. doi: 10.1152/ajpheart.00807.2015. PubMed PMID: 27288437; PubMed Central PMCID: PMC5005281.
119. Panel M, Ghaleh B, Morin D. Ca(2+) ionophores are not suitable for inducing mPTP opening in murine isolated adult cardiac myocytes. *Sci Rep.* 2017;7(1):4283. Epub 2017/06/29. doi: 10.1038/s41598-017-04618-4. PubMed PMID: 28655872; PubMed Central PMCID: PMC5487341.
120. Wick AN, Drury DR, Nakada HI, Wolfe JB. Localization of the primary metabolic block produced by 2-deoxyglucose. *J Biol Chem.* 1957;224(2):963-9. Epub 1957/02/01. PubMed PMID: 13405925.
121. Yu L, Li B, Zhang M, Jin Z, Duan W, Zhao G, et al. Melatonin reduces PERK-eIF2alpha-ATF4-mediated endoplasmic reticulum stress during myocardial ischemia-reperfusion injury: role of RISK and SAFE pathways interaction. *Apoptosis.* 2016;21(7):809-24. Epub 2016/05/14. doi: 10.1007/s10495-016-1246-1. PubMed PMID: 27170343.
122. Montie HL, Kayali F, Haezebrouck AJ, Rossi NF, Degracia DJ. Renal ischemia and reperfusion activates the eIF 2 alpha kinase PERK. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1741(3):314-24. Epub 2005/06/07. doi: 10.1016/j.bbadis.2005.04.007. PubMed PMID: 15936177.
123. Miyazaki Y, Kaikita K, Endo M, Horio E, Miura M, Tsujita K, et al. C/EBP homologous protein deficiency attenuates myocardial reperfusion injury by inhibiting myocardial apoptosis and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(5):1124-32. Epub 2011/02/19. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.224519. PubMed PMID: 21330607.
124. Sun MY, Ma DS, Zhao S, Wang L, Ma CY, Bai Y. Salidroside mitigates hypoxia/reoxygenation injury by alleviating endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in H9c2 cardiomyocytes. *Molecular Medicine Reports.* 2018. doi: 10.3892/mmr.2018.9403.
125. Szegezdi E, Duffy A, O'Mahoney ME, Logue SE, Mylotte LA, O'Brien T, et al. ER stress contributes to ischemia-induced cardiomyocyte apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;349(4):1406-11. Epub 2006/09/19. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.09.009. PubMed PMID: 16979584.
126. Brillantes AB, Ondrias K, Scott A, Kobrinsky E, Ondriasova E, Moschella MC, et al. Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell.* 1994;77(4):513-23. Epub 1994/05/20. PubMed PMID: 7514503.
127. Timerman AP, Wiederrecht G, Marcy A, Fleischer S. Characterization of an exchange reaction between soluble FKBP-12 and the FKBP.ryanodine receptor complex. Modulation by FKBP mutants deficient in peptidyl-prolyl isomerase activity. *J Biol Chem.* 1995;270(6):2451-9. Epub 1995/02/10. PubMed PMID: 7531689.
128. Yano M, Kobayashi S, Kohno M, Doi M, Tokuhisa T, Okuda S, et al. FKBP12.6-Mediated Stabilization of Calcium-Release Channel (Ryanodine Receptor) as a Novel Therapeutic Strategy Against Heart Failure. *Circulation.* 2003;107(3):477-84. doi: 10.1161/01.Cir.0000044917.74408.Be.

129. Ladilov YV, Siegmund B, Piper HM. Protection of reoxygenated cardiomyocytes against hypercontracture by inhibition of Na⁺/H⁺ exchange. *Am J Physiol.* 1995;268(4 Pt 2):H1531-9. Epub 1995/04/01. doi: 10.1152/ajpheart.1995.268.4.H1531. PubMed PMID: 7733354.
130. Griffiths EJ, Ocampo CJ, Savage JS, Rutter GA, Hansford RG, Stern MD, et al. Mitochondrial calcium transporting pathways during hypoxia and reoxygenation in single rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 1998;39(2):423-33. Epub 1998/11/03. PubMed PMID: 9798527.
131. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med.* 2000;6(5):513-9. Epub 2000/05/10. doi: 10.1038/74994. PubMed PMID: 10802706.
132. Drago I, De Stefani D, Rizzuto R, Pozzan T. Mitochondrial Ca²⁺ uptake contributes to buffering cytoplasmic Ca²⁺ peaks in cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(32):12986-91. Epub 2012/07/24. doi: 10.1073/pnas.1210718109. PubMed PMID: 22822213; PubMed Central PMCID: PMC3420165.
133. Gunter TE, Buntinas L, Sparagna G, Eliseev R, Gunter K. Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. *Cell Calcium.* 2000;28(5-6):285-96. Epub 2000/12/15. doi: 10.1054/ceca.2000.0168. PubMed PMID: 11115368.
134. Roest G, La Rovere RM, Bultynck G, Parys JB. IP₃ Receptor Properties and Function at Membrane Contact Sites. *Adv Exp Med Biol.* 2017;981:149-78. Epub 2017/01/01. doi: 10.1007/978-3-319-55858-5_7. PubMed PMID: 29594861.
135. Zhu S, McGrath BC, Bai Y, Tang X, Cavener DR. PERK regulates Gq protein-coupled intracellular Ca²⁺ dynamics in primary cortical neurons. *Mol Brain.* 2016;9(1):87. Epub 2016/10/08. doi: 10.1186/s13041-016-0268-5. PubMed PMID: 27716400; PubMed Central PMCID: PMC345583.
136. Verfaillie T, Rubio N, Garg AD, Bultynck G, Rizzuto R, Decuyper JP, et al. PERK is required at the ER-mitochondrial contact sites to convey apoptosis after ROS-based ER stress. *Cell Death Differ.* 2012;19(11):1880-91. Epub 2012/06/19. doi: 10.1038/cdd.2012.74. PubMed PMID: 22705852; PubMed Central PMCID: PMC3469056.
137. Hagen BM, Boyman L, Kao JP, Lederer WJ. A comparative assessment of fluo Ca²⁺ indicators in rat ventricular myocytes. *Cell Calcium.* 2012;52(2):170-81. Epub 2012/06/23. doi: 10.1016/j.ceca.2012.05.010. PubMed PMID: 22721780; PubMed Central PMCID: PMC3393790.
138. Delepine M, Nicolino M, Barrett T, Golamaully M, Lathrop GM, Julier C. EIF2AK3, encoding translation initiation factor 2-alpha kinase 3, is mutated in patients with Wolcott-Rallison syndrome. *Nat Genet.* 2000;25(4):406-9. Epub 2000/08/10. doi: 10.1038/78085. PubMed PMID: 10932183.
139. Wolcott CD, Rallison ML. Infancy-onset diabetes mellitus and multiple epiphyseal dysplasia. *J Pediatr.* 1972;80(2):292-7. Epub 1972/02/01. PubMed PMID: 5008828.
140. Habeb AM. Frequency and spectrum of Wolcott–Rallison syndrome in Saudi Arabia: a systematic review. *Libyan Journal of Medicine.* 2013;8(1). doi: 10.3402/ljm.v8i0.21137.
141. Thornton CM, Carson DJ, Stewart FJ. Autopsy findings in the Wolcott-Rallison syndrome. *Pediatr Pathol Lab Med.* 1997;17(3):487-96. Epub 1997/05/01. PubMed PMID: 9185226.
142. Zhang SW, Liu Y, Wang F, Qiang J, Liu P, Zhang J, et al. Ilexsaponin A attenuates ischemia-reperfusion-induced myocardial injury through anti-apoptotic pathway. *PLoS One.* 2017;12(2):e0170984. Epub 2017/02/10. doi: 10.1371/journal.pone.0170984. PubMed PMID: 28182689; PubMed Central PMCID: PMC5300190.
143. Zhao TT, Yang TL, Gong L, Wu P. Isorhamnetin protects against hypoxia/reoxygenation-induced injury by attenuating apoptosis and oxidative stress in H9c2 cardiomyocytes. *Gene.*

- 2018;666:92-9. Epub 2018/05/08. doi: 10.1016/j.gene.2018.05.009. PubMed PMID: 29730426.
144. He F, Wu Q, Xu B, Wang X, Wu J, Huang L, et al. Suppression of Stim1 reduced intracellular calcium concentration and attenuated hypoxia/reoxygenation induced apoptosis in H9C2 cells. *Bioscience Reports*. 2017;37(6). doi: 10.1042/bsr20171249.
145. Bugaisky LB, Zak R. Differentiation of adult rat cardiac myocytes in cell culture. *Circ Res*. 1989;64(3):493-500. Epub 1989/03/01. PubMed PMID: 2465096.
146. Scarabelli TM, Knight RA, Rayment NB, Cooper TJ, Stephanou A, Brar BK, et al. Quantitative assessment of cardiac myocyte apoptosis in tissue sections using the fluorescence-based tunel technique enhanced with counterstains. *Journal of Immunological Methods*. 1999;228(1-2):23-8. doi: Doi 10.1016/S0022-1759(99)00090-3. PubMed PMID: WOS:000083770600003.
147. Ibanez B, Heusch G, Ovize M, Van de Werf F. Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65(14):1454-71. Epub 2015/04/11. doi: 10.1016/j.jacc.2015.02.032. PubMed PMID: 25857912.
148. Davidson SM, Ferdinandy P, Andreadou I, Botker HE, Heusch G, Ibanez B, et al. Multitarget Strategies to Reduce Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: JACC Review Topic of the Week. *J Am Coll Cardiol*. 2019;73(1):89-99. Epub 2019/01/10. doi: 10.1016/j.jacc.2018.09.086. PubMed PMID: 30621955.

7. Lebenslauf

8. Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Stefan Wagner für die Überlassung des hochspannenden Promotionsthemas, die stets hilfreiche Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Experimente, der Datenauswertung, sowie der schriftlichen Verfassung dieser Arbeit. Für weitere Unterstützung bei der Planung und Problemlösung bedanke ich mich bei meinem Betreuer Dr. Christian Schach.

Bei den weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich mich für die breite Hilfe bei der Arbeit im Labor bedanken, insbesondere bei Frau Gabriela Pietrzyk, Frau Felicia Radtke, und Herrn Thomas Sowa.

Bei Prof. Dr. Jonathan Jantsch aus der Abteilung für Mikrobiologie bedanke ich mich für die Bereitstellung der Hypoxiekammer.

Bei den Doktoranden der Kardiologie, insbesondere Simon Lebek, bedanke ich mich für die stete Motivation, den regen Austausch über die Forschung, und die gemeinsame Zeit im Labor.

Bei meiner Freundin Sydney Wagner bedanke ich mich für die Unterstützung und Motivation während dieser Zeit.

Mein herzlicher Dank gilt auch dem Forschungsrat der Fakultät für Medizin für die Verleihung des Promotionsstipendiums für die Durchführung dieser Arbeit.

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden auf den Herztagen 2018 der deutschen Gesellschaft für Kardiologie als Postervortrag präsentiert. Das Abstract ist unter Clin Res Cardiol 107 Suppl 3, October 2018 - Beitrag BS250 mit der DOI: 10.1007/s00392-018-1357-5 verfügbar.