

**Die Rolle des Proteins BNIP3  
im myokardialen  
Ischämie/Reperfusionsschaden**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
M.Sc. Sonja Ecken  
aus Viersen

Düsseldorf, Januar 2016

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. M. Kelm

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referenten: Prof. Dr. T. Rassaf  
Prof. Dr. U. Rüter

Tag der mündlichen Prüfung: 17.03.2016

**Meinen Lieben in Dankbarkeit gewidmet**

Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an  
interessant zu werden, wo sie aufhört!

Justus von Liebig (1803-73)

## Liste der Abkürzungen

A1/BFL-1	<i>BCL-2-related protein A1</i>
AAR	<i>area at risk</i>
Abb.	Abbildung
AF	Alexa Fluor
AIF	<i>Apoptosis inducing factor</i>
AKT	Proteinkinase B
AMI	akuter Myokardinfarkt
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
ANT1	<i>Adenine Nucleotide Translocase 1</i>
APAF-1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
App.	Applikation
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	<i>B-cell lymphoma 2-Antagonist of Cell Death</i>
BAK	<i>B-cell lymphoma 2-antagonist/killer</i>
BAX	<i>B-cell lymphoma 2-associated X protein</i>
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCL-w	<i>BCL2-like protein 2</i>
BCL-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BH	<i>Btk homology</i>
BID	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BIK	<i>BCL2-interacting killer</i>
BIM	<i>BCL-2-like protein 11</i>
BMF	<i>BCL2 modifying factor</i>
BNIP3	<i>BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CT	<i>cycle threshold</i>
Cys	Cystein
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
Diablo	<i>diablo, IAP-binding mitochondrial protein</i>

DIDS	<i>4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid</i>
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
ΔTM	delta Transmembrandomäne
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGL-1	<i>egg laying abnormal-1</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
et al.	et alii - und andere
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FADD	<i>Fas-Associated protein with Death Domain</i>
FAS	= <i>CD95 /Cluster of differentiation</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i> (fötales Kälberserum)
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i> = Vorwärtsstreulicht
GRPE-like1	<i>GrpE protein homolog 1</i>
HCl	Chlorwasserstoff
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	Histidine
HI-Virus	<i>human immunodeficiency virus</i> = Humane Immundefizienz-Virus
HL-1	<i>heart like-1 cells</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
IEM	Immun-Elektronenmikroskopie
IHC	Immunhistochemie
IP	Immunpräzipitation
i.p.	intraperitoneal
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
I/R	Ischämie/Reperfusion
JC-1	5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'- tetraethylbenzimidazolylcarbocyanin Iodid
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo Dalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat
KO	<i>knockout</i>

M	molar
MCL-1	<i>Induced myeloid leukemia cell differentiation protein</i>
MEF	<i>mouse embryonic fibroblast</i>
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
Mia40	<i>Mitochondrial intermembrane space import and assembly protein 40</i>
MOMP	<i>mitochondria outer membrane pore</i>
mPTP	<i>mitochondrial permeability transition pore</i>
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
NAPDH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NGS	<i>normal goat serum</i>
Ni-NTA	Nickel- Nitrilotriessigsäure
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOXA	<i>Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>
NP-40	Nonident P-40
OP	Operation
PBS	phosphate buffered saline
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> = Polymerase-Kettenreaktion
pH	potentia Hydrogenii
PE	R-phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PTCA	Perkutane transluminale Koronarangioplastie
PVC	Polyvinylchlorid
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-RT-PCR	Reverse Transkriptase <i>Real-Time</i> -Polymerase Kettenreaktion
s.c.	<i>subcutan</i>
SD	Standardabweichung

SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Ser	Serin
SMAC	<i>second mitochondria-derived activator of caspases</i>
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TAT	<i>Trans-Activator of Transcription</i>
TBS	Tris-buffered Saline
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TM	Transmembrandomäne
TNF	Tumornekrosefaktor
TOMM22	<i>translocase of outer mitochondrial membrane 22 homolog</i>
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
V	Volt
VDAC	<i>voltage-dependent anion channel</i>
WB	Western Blot
WT	Wildtyp

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>11</b>
<b>1.1 AKUTER MYOKARDINFARKT</b>	<b>11</b>
<b>1.2 REPERFUSIONSSCHADEN</b>	<b>12</b>
<b>1.3 ZELLTOD IM ISCHÄMIE-/REPERFUSIONS (I/R)-SCHADEN</b>	<b>13</b>
1.3.1 EXTRINSISCHER SIGNALWEG	14
1.3.2 INTRINSISCHER SIGNALWEG	15
1.3.3 MPTP-VERMITTELT ZELLTOD	17
1.3.4 INTERFERENZEN	18
<b>1.4 BNIP3</b>	<b>19</b>
1.4.1 DIE ENTDECKUNG VON BNIP3	19
1.4.2 BNIP3 IM I/R SCHADEN	20
1.4.3 STRUKTUR UND FUNKTION VON BNIP3	21
1.4.4 WEITERE FUNKTIONEN VON BNIP3	23
<b>1.5 ZIELSETZUNG</b>	<b>23</b>
<b>2 METHODEN</b>	<b>25</b>
<b>2.1 MAUSSTÄMME</b>	<b>25</b>
2.1.1 C57BL/6J	25
2.1.2 <i>BNIP3</i> -DEFIZIENTE ( <i>BNIP3</i> <sup>-/-</sup> )- MÄUSE	25
<b>2.2 ENTNAHME VON MURINEN HERZEN</b>	<b>28</b>
<b>2.3 ISOLATION MURINER KARDIOMYOZYTEN</b>	<b>28</b>
<b>2.4 SDS-PAGE UND WESTERN BLOT</b>	<b>30</b>
<b>2.5 REAL-TIME QRT-PCR</b>	<b>34</b>
<b>2.6 ISOLATION MURINER MITOCHONDRIEN UND ZYTOPLASMA AUS HERZEN</b>	<b>35</b>
<b>2.7 FRAKTIONIERUNG VON MITOCHONDRIEN</b>	<b>36</b>
<b>2.8 <i>IN VIVO</i> I/R MAUSMODELL</b>	<b>37</b>
<b>2.9 KULTIVIERUNG VON REKOMBINANTEM PROTEIN IN <i>E. COLI</i></b>	<b>41</b>
<b>2.10 ELEKTRONENMIKROSKOPIE</b>	<b>44</b>
<b>2.11 ZELLKULTUR</b>	<b>45</b>
<b>2.12 IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG</b>	<b>46</b>
<b>2.13 IMMUNPRÄZIPITATION (IP)</b>	<b>48</b>
<b>2.14 JC-1 ASSAY</b>	<b>49</b>
<b>2.15 <i>IN VITRO</i> HYPOXIE/REOXYGENIERUNG</b>	<b>49</b>
<b>3 ERGEBNISSE</b>	<b>50</b>
<b>3.1 EXPRESSION VON BNIP3</b>	<b>50</b>
3.1.1 EXPRESSION UNTER BASALEN BEDINGUNGEN	50
3.1.2 EXPRESSION IM VERLAUF DER I/R	52
<b>3.2 LOKALISATION VON BNIP3</b>	<b>54</b>
<b>3.3 TAT-FUSIONSPROTEINE</b>	<b>58</b>
3.3.1 CHARAKTERISIERUNG	58
3.3.2 AUFNAHME VON TAT-BNIP3 IN HERZZELLEN	59
<b>3.4 TRANSLOKATION VON BNIP3</b>	<b>62</b>
<b>3.5 DER EINFLUSS VON BNIP3 AUF DIE TRANSLOKATION VON BAX</b>	<b>63</b>
<b>3.6 BNIP3 INTERAGIERT MIT BAX UND VDAC</b>	<b>66</b>
<b>3.7 MITOCHONDRIALES MEMBRANPOTENTIAL</b>	<b>67</b>

<b>3.8 MITOCHONDRIALE STRUKTUR</b>	<b>69</b>
<b>3.9 BNIP3-INDUZIERTE AKTIVIERUNG VON BAX</b>	<b>71</b>
3.9.1 IN GESAMTEN HERZZELLEN	71
3.9.2 IM ZYTOPLASMA	72
<b>3.10 CYTOCHROM C FREISETZUNG</b>	<b>73</b>
3.10.1 <i>IN VIVO</i>	73
3.10.2 <i>EX VIVO</i>	74
<b>3.11 POSTTRANSLATIONALE PHOSPHORYLIERUNG VON BNIP3</b>	<b>76</b>
3.11.1 IN DEN GESAMTEN HERZZELLEN	76
3.11.2 IN MITOCHONDRIEN UND ZYTOPLASMA AUS HERZEN	78
3.11.3 EINFLUSS AUF DIE OLIGOMERISIERUNG VON BNIP3	78
<b>3.12 AKT-VERMITTELTE PHOSPHORYLIERUNG VON BNIP3</b>	<b>80</b>
<b>3.13 BIOLOGISCHE RELEVANZ DER BNIP3-INHIBITION</b>	<b>81</b>
<b>4 DISKUSSION</b>	<b>84</b>
<hr/>	
4.1 EXPRESSION, LOKALISATION UND TRANSLOKATION VON BNIP3	84
4.2 BNIP3-INDUZIERTE TRANSLOKATION VON BAX	87
4.3 DER EINFLUSS VON BNIP3 AUF DIE MITOCHONDRIEN IM I/R SCHADEN	88
4.4 BNIP3-INDUZIERTE BAX-AKTIVIERUNG	91
4.5 BIOLOGISCHE RELEVANZ VON BNIP3	94
4.6 HAUPTAUSSAGEN UND AUSBLICK	95
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>97</b>
<hr/>	
<b>6 SUMMARY</b>	<b>98</b>
<hr/>	
<b>7 MATERIAL</b>	<b>99</b>
<hr/>	
7.1 GERÄTE	99
7.2 CHEMIKALIEN/LÖSUNGEN/ENZYME	100
7.3 ASSAYS/KITS	102
7.4 ANTIKÖRPER	103
7.5 VERBRAUCHSMATERIAL	105
<b>8 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>106</b>
<hr/>	
<b>9 DANKSAGUNGEN</b>	<b>116</b>
<hr/>	
<b>10 LEBENSLAUF</b>	<b>117</b>
<hr/>	

# 1 Einleitung

Herz- und Kreislauferkrankungen sind die häufigste Todesursache weltweit und stellen ein globales Gesundheitsproblem dar<sup>1</sup>. Betroffen sind dabei insbesondere die westlichen Industrienationen. Der hier wirkende Lebensstil stellt einen Risikofaktor für Erkrankungen der arteriellen Gefäße dar. Neben dem Rauchen ist das metabolische Syndrom eine der häufigsten Ursachen für Herz- und Kreislauferkrankungen<sup>2,3</sup>. Das metabolische Syndrom ist gekennzeichnet durch eine permanente Überernährung und Bewegungsmangel. Dies führt in den meisten Fällen zu einer viszeralen (zentralen) Adipositas (Fettleibigkeit) und Bluthochdruck<sup>4,5</sup>. Es kommt zu einer Fettstoffwechselstörung mit Folge einer Erhöhung der Triglyceride (Hypertriglyzeridämie) und einer Reduktion des HDL-Cholesterins im Blut. Zudem tritt eine gestörte Glukosetoleranz auf. Diese Symptome sind assoziiert mit einem erhöhten Risiko für Typ-2-Diabetes und kardiovaskuläre Erkrankungen<sup>4,5</sup>.

Eine häufig auftretende Folge arterieller Erkrankungen der Koronargefäße stellt der akute Myokardinfarkt (Herzinfarkt) dar<sup>6</sup>. Die Anzahl an Sterbefällen durch einen Herzinfarkt ist aufgrund stetig effektiverer und flächendeckender Akutversorgung in Deutschland seit Jahren rückläufig. Dennoch war 2013 laut statistischem Bundesamt der akute Myokardinfarkt mit 52.004 Todesfällen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Als häufigste Todesursache konnte die chronisch, ischämische Herzkrankheit mit 73.176 Todesfällen charakterisiert werden<sup>7</sup>. Dies verdeutlicht die Relevanz der Forschung auf diesem Gebiet.

## 1.1 Akuter Myokardinfarkt

Bei einem akuten Myokardinfarkt kommt es zu einer plötzlichen Ischämie eines Teils des Myokards (Herzmuskel), welche mit dem Absterben von Kardiomyozyten einhergeht<sup>8</sup>. Die Ischämie ist charakterisiert über eine Sauerstoffunterversorgung, aufgrund einer Minderdurchblutung oder einem vollständigen Durchblutungsausfall des Gewebes<sup>8,9</sup>. Eine der häufigsten Ursachen hierbei stellen arterielle Thromben in einer arteriosklerotisch veränderten Engstelle eines der Herzkranzgefäße dar, welche zu einer Gefäßokklusion führen<sup>10</sup>. Der Sauerstoffmangel des Myokards führt zu einer Störung der Adenosintriphosphat (ATP)-Produktion der Mitochondrien über die

oxidative Phosphorylierung. Bereits nach acht Sekunden vermindertem arteriellen Blutflusses kommt es zu einer Umschaltung des Stoffwechsels auf die anaerobe Glykolyse<sup>11,12</sup>. Diese kann zum einen den Energiebedarf der Kardiomyozyten nicht decken und geht zum anderen mit einer Laktatakkumulation einher, welches zu einer metabolischen Azidose führt. Die Anhäufung von Laktat führt zu einer intrazellulären pH-Wert Senkung auf 6,0-5,8 in den ersten 10 Minuten der Ischämie<sup>11,12</sup>. Die über die intrazelluläre Akkumulation von Protonen gestörte pH-Wert-Homöostase aktiviert den Natrium-Protonen-Antiporter in der Zellmembran. Über den Antiporter werden Protonen aus der Zelle und Natriumionen in die Zelle transportiert. Aufgrund des mangelnden ATP-Angebots kann die Natrium-Kalium-ATPase dies nicht ausgleichen und es kommt zu einem intrazellulären Natriumüberschuss<sup>13,14</sup>. Der Überschuss an Natrium führt zur Aktivierung des Natrium-Kalzium-Antiporters, welches wiederum zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration führt. Daraus resultiert eine kontraktile Dysfunktion und pathomorphologische Veränderung der Kardiomyozyten<sup>13,14</sup>. Die morphologischen Schäden sind teilweise nach einer Ischämie die weniger als 15 Minuten dauert noch reversibel<sup>15</sup>. Um die Schäden des Myokards möglichst gering zu halten, ist daher eine zeitnahe Wiedereröffnung des Gefäßes mittels kathetergestützter, perkutaner transluminaler Koronarangioplastie (PTCA) von entscheidender Bedeutung<sup>16,17</sup>.

## 1.2 Reperfusionsschaden

Eine schnelle Lösung des Blutgerinnsels minimiert die Infarktgröße und verbessert die klinische Symptomatik<sup>16</sup>. Paradoxerweise führt die Reoxygenierung des Gewebes durch die Lösung der Gefäßokklusion (Reperfusion) zu einer weiteren Schädigung des Gewebes. Diese kann in der frühen Phase der Reperfusion sogar bis zu 50% des Infarktes ausmachen<sup>15,18</sup>. Der plötzliche Einstrom von sauerstoffreichem Blut führt zu einem Sauerstoffüberschuss in den auf anaerobe Glykolyse umgestellten Zellen<sup>12</sup>. Es entsteht der sogenannte Reperfusionsschaden. Innerhalb der ersten 5 Minuten der Reperfusion kommt es zu einer Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) über verschiedene Enzymsysteme, von denen die mitochondriale Atmungskette eines darstellt<sup>15</sup>. Als Folge einer inkompletten Reduktion des Sauerstoffs in den Mitochondrien bilden sich Superoxidanionradikale und im weiteren Verlauf kommt es zur Bildung von Wasserstoffperoxid und

hochreaktiven Hydroxylradikalen. Ebenfalls kommt es in den Endothelzellen über die Xanthinoxidase und in den neutrophilen Granulozyten über die NADPH-Oxidase zur Bildung von ROS<sup>19,20</sup>. Diese gebildeten ROS medieren die Peroxidation von Lipiden, zerstören so die Membranintegrität und lösen eine Dysfunktion des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) aus<sup>13</sup>. Dies führt zu einer Freisetzung von Kalzium aus dem SR und einem weiteren Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Zudem denaturieren ROS Enzyme und führen zu einer oxidativen Schädigung der DNA<sup>13</sup>.

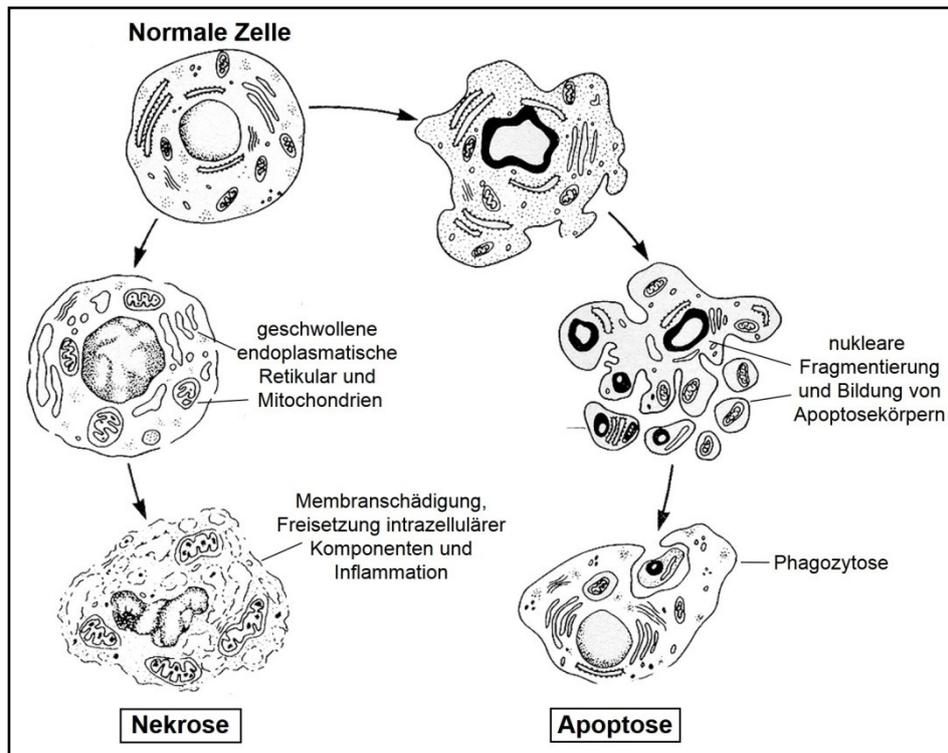
Über den Natrium-Protonen-Antiporter und den Natrium-Hydrogencarbonat-Symporter wird die Laktatsäure aus der Zelle gewaschen und es kommt zu einer schnellen Änderung des pH-Wertes zurück zum physiologischen Wert. Diese schnelle Änderung und der Anstieg des Kalziumspiegels löst eine Hyperkontraktion der Kardiomyozyten aus, welche zum Tod der Zelle führen kann<sup>21</sup>. Die Wiederherstellung des Membranpotentials führt zu einer Aktivierung des Kalzium-Uniporters in der mitochondrialen Membran, welches einen Anstieg der Kalziumkonzentration in den Mitochondrien zur Folge hat<sup>22,23</sup>. Der Anstieg der Kalzium- und Phosphatkonzentration in den Mitochondrien kann zu der Auslösung einer über die Mitochondrien-vermittelten Zelltodaktivierung führen<sup>13,18</sup>.

### **1.3 Zelltod im Ischämie-/Reperfusion (I/R)-Schaden**

Im Rahmen des I/R-Schadens kommt es zu einem Verlust von myokardialen Gewebe über Zelltod<sup>18</sup>. Lange ist man davon ausgegangen, dass es zum Untergang der Kardiomyozyten über Nekrose kommt<sup>24</sup>. Heute geht man jedoch davon aus, dass sowohl der Prozess der Nekrose als auch der Apoptose stattfindet<sup>25,26</sup>. Als Nekrose wird der pathologische Untergang von Zellen über einen degenerativen Prozess bezeichnet<sup>27</sup>. Diese geht einher mit dem Anschwellen von Zellorganellen, Verlust der Zellintegrität und einer Ruptur der Plasmamembran. Das führt wiederum zu einer Freisetzung zytosolischer Komponenten und hat eine inflammatorische Antwort zur Folge (Abb.1.1)<sup>28,29</sup>.

Als Apoptose wird der Untergang von Zellen über den sogenannten programmierten Zelltod verstanden<sup>27</sup>. Die Apoptose kann über den hochregulierten intrinsischen (mitochondrialen) oder extrinsischen (Rezeptor-vermittelten) Signalweg eingeleitet werden. Beides geht mit Zellschrumpfen, Membran-*Blebbing* (Bläschenbildung) und

nukleosomaler Kondensation und Degradation einher. Es kommt zur Bildung kleiner Membranvesikel (Apoptosekörper), welche von Makrophagen entfernt werden (Abb.1.1)<sup>29-31</sup>.



**Abb. 1.1: Apoptose und Nekrose**

Schematische Darstellung der Zellstruktur beim Untergang der Zellen über Nekrose (links) und Apoptose (rechts). Der nekrotische Signalweg führt zur Schwellung von Zellorganellen, Schädigung der Plasmamembran und zur Freisetzung intrazellulärer Komponenten. Dies geht mit einem inflammatorischen Signal einher. Bei der Apoptose kommt es zur nuklearen Fragmentierung, Bildung von Apoptosekörpern und Phagozytose der Zellfragmente (nach Van der Meer *et al.*<sup>27</sup>).

### 1.3.1 Extrinsischer Signalweg

Die extrinsische Rezeptor-vermittelte Apoptose wird ausgelöst über die Bindung eines Liganden an einen Rezeptor<sup>32</sup>. Dabei stellen die Liganden Tumornekrosefaktoren (TNF) oder FAS (auch genannt CD95=*Cluster of differentiation 95*) dar. Diese binden an Rezeptoren der TNF-Rezeptorfamilie (Todesrezeptoren), welche auf der Zelloberfläche lokalisiert sind. An den zytoplasmatischen Teil des Rezeptors gekoppelte Adaptermoleküle wie FADD (*FAS-associated death domain*) homotrimerisieren daraufhin<sup>33-35</sup>. Dies bewirkt die Translokation der Procaspase 8 zu dem Rezeptor. Procaspase 8 untergeht einer autokatalytischen Homooligomerisierung und einer aktivierenden Prozessierung. Die

aktivierte Caspase 8 wirkt als Effektorcaspase und aktiviert weitere Caspasen, wie unter anderem Caspase 3<sup>36</sup> (Abb.1.2). Beim Zelltod im I/R-Schaden scheint unter anderem auch der extrinsische Signalweg eine Rolle einzunehmen. Mäuse, welche kein funktionelles FAS aufweisen, zeigen im *in vivo* Model eine verminderte Infarktgröße<sup>37</sup>. Ein erhöhte FAS-Level dagegen geht mit einem erhöhtem Sterben von Zellen einher<sup>34</sup>.

### 1.3.2 Intrinsischer Signalweg

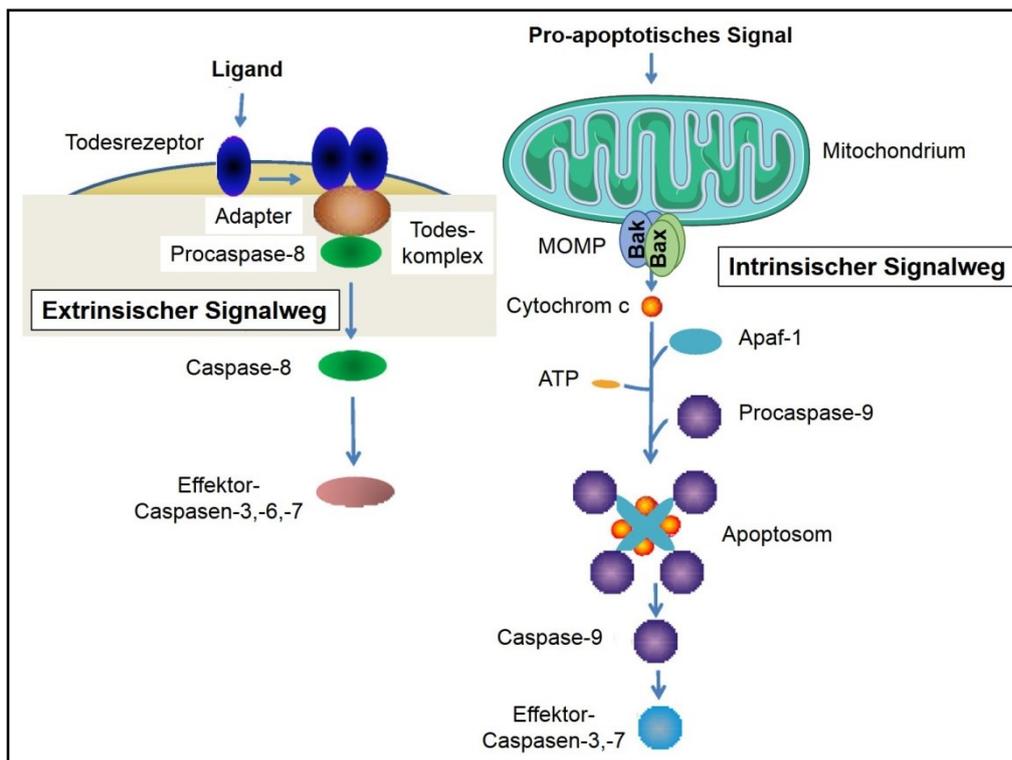
Der intrinsische Signalweg wird über verschiedene pathophysiologische Bedingungen ausgelöst. Diese können unter anderem oxidativer Stress und eine gesteigerte Kalziumkonzentration sein<sup>32</sup>. Der mitochondrial-vermittelte Signalweg geht mit der Freisetzung von pro-apoptischen Faktoren wie Cytochrom c aus dem Mitochondrium in das Zytoplasma einher. Dies führt über die Aktivierung von Caspasen und DNA-Fragmentierung zum Zelltod<sup>27</sup>. Die intrinsische Apoptose wird über die Proteine der *B-cell lymphoma-2* (BCL-2) Familie reguliert<sup>38</sup>.

Die BCL-2 Familie besteht aus pro- und anti-apoptischen Proteinen. Diese werden anhand ihrer Anzahl an BCL-2 Homology (BH)-Domänen in drei Unterklassen einsortiert<sup>39</sup>. Die erste Gruppe stellen die anti-apoptischen Proteine: BCL-2, BCL-xL, BCL-w, MCL-1 und A1/BFL-1 dar. Sie weisen vier BH-Domänen auf und sind für die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Integrität verantwortlich. Die zweite Gruppe setzt sich zusammen aus den pro-apoptischen Proteinen BAX, BAK und BOK. Diese weisen jeweils drei BH-Domänen auf und sind an der Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran beteiligt. Die letzte Gruppe besteht aus den BH3-only Proteinen, welche nur die BH3-Domäne aufweisen. Es handelt sich hierbei um wichtige Regulatoren die auf verschiedene Stimuli hin reagieren und über Zellüberleben oder Zelltod entscheiden<sup>39-41</sup>. Das erste Protein der BH3-only Proteine wurde 1995 von Boyd *et al.* beschrieben<sup>42</sup>. Seither wurden ein Vielzahl weiterer Proteine der Gruppe klassifiziert, wie z.B. BIM, BID, BAD, BIK, EGL-1, BMF, NOXA, und BNIP3.

BCL-2 Proteine können über die BH-Domänen miteinander interagieren und Homo- und Heterooligomere bilden<sup>43</sup>. Die meisten BCL-2 Proteine weisen zudem eine C-terminale Transmembrandomäne auf, welche eine mitochondriale Membranintegration ermöglicht<sup>32</sup>. Zelltod-vermittelnde Signale aktivieren die Translokation des zytoplasmatisch lokalisierten BAX zu der Mitochondrien-

membran<sup>44</sup>. BAX oligomerisiert mit dem in der Membran lokalisierten BAK. Es kommt zur Bildung einer Pore in der äußeren mitochondrialen Membran, welche als *mitochondria outer membrane pore* (MOMP) charakterisiert ist<sup>43,45,46</sup>. Es wird vermutet, dass durch die Insertion von BAX in die Membran und eine Entfaltung des Proteins auf der Oberfläche die Lipidumgebung gestört wird und eine Lipidpore entsteht<sup>47,48</sup>. Es folgt eine Freisetzung der pro-apoptischen Faktoren Cytochrom c, Endonuklease G, AIF und SMAC aus dem Mitochondrium über die MOMP ins Zytoplasma<sup>49-53</sup>. Cytochrom c und SMAC lösen einen Caspase 9-aktivierenden Prozess aus. Cytochrom c bildet dazu mit APAF-1 und ATP einen Komplex (Apoptosom) (Abb.1.2). Die aktivierte Caspase 9 aktiviert wiederum weitere Caspasen<sup>54-56</sup>. Endonuklease G und AIF translozieren zum Nukleus und bewirken hier Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung<sup>50,53</sup>. Reguliert wird die Bildung der BAK-BAX-Pore über die anderen Mitglieder der BCL-2 Familie. Je nach Stimuli kommt es zur Bindung der pro- oder anti-apoptischen Proteine an BAX, welches eine Anregung bzw. eine Inhibition der Translokation und Oligomerisierung zur Folge hat<sup>57,58</sup>. Die BH3-only Proteine BID und PUMA z.B. gelten als Aktivatoren der MOMP-Bildung über zwei verschiedene Mechanismen. Zum einen bilden sie eine direkte und aktivierende Interaktion mit dem pro-apoptischen Protein BAX aus. Zum anderen inhibieren die Proteine anti-apoptische BCL-2 Proteine über eine Interaktion mit diesen<sup>59-61</sup>.

Neben dem extrinsischen Signalweg konnte auch eine Beteiligung des intrinsischen Signalwegs im Rahmen des I/R-Schadens beschrieben werden. Die Überexpression des anti-apoptischen BCL-2 Proteins, welches über eine Interaktion BAX inhibiert, führte zu einer Reduktion der Infarktgröße<sup>62</sup>. Auch eine Defizienz von BAX in Mäusen zeigte *in vivo* einen positiven Effekt auf die Infarktgröße<sup>63</sup>. Zudem zeigen auch BID- und PUMA-defiziente Mäuse einen geringeren Untergang an Kardiomyozyten im I/R-Schaden<sup>64,65</sup>.



**Abb.1.2: Extrinsische und intrinsische Apoptose**

Schematische Darstellung des extrinsischen (links) und intrinsischen (rechts) Signalwegs. Beim extrinsischen Weg kommt es über die Bindung eines Liganden an einen Rezeptor zur Aktivierung der Caspase 8, welche wiederum weitere Caspasen aktiviert. Der intrinsische Signalweg geht einher mit der Freisetzung des pro-apoptischen Faktors Cytochrom c aus der MOMP. Cytochrom c bildet mit APAF-1 und ATP das Caspase 9-aktivierende Apoptosom. Die aktivierte Caspase 9 aktiviert weitere Effektor-Caspasen. Neben Cytochrom c gibt es noch weitere pro-apoptische Faktoren, die über die MOMP freigesetzt werden, jedoch nicht in der Abbildung dargestellt sind (nach Li *et al.*)<sup>66</sup>.

### 1.3.3 mPTP-vermittelter Zelltod

Neben dem intrinsischen gibt es noch einen weiteren mitochondrial-vermittelten Signalweg, welcher eine Zelltodantwort zur Folge hat. Die Öffnung der *mitochondrial permeability transition pore* (mPTP) in der inneren und äußeren Mitochondrienmembran<sup>67</sup>. Ausgelöst wird die mPTP-Öffnung über den Anstieg der Kalziumkonzentration im Mitochondrium und über ROS<sup>68,69</sup>.

Unter physiologischen Bedingungen führt die Elektronentransportkette über die Atmungskette in den Mitochondrien zu einem Protonengradient zwischen der inneren und der äußeren Membran. Dies wird als das mitochondriale Membranpotential ( $\Delta\psi_m$ ) bezeichnet und ist essentiell bei der Generierung von ATP<sup>70</sup>. Bei der mPTP handelt es sich um eine Pore in der inneren und äußeren mitochondrialen Membran, welche permeabel für Moleküle bis zu 1,5kDa ist<sup>69</sup>. Die Öffnung der Pore führt zu einer Umverteilung von gelösten Stoffen und Ionen. Die Entstehung eines

osmotischen Drucks führt zu einem Einstrom von Wasser in die Matrix. Es kommt zu einem Zusammenbruch des Membranpotentials und somit der Produktion von ATP<sup>71</sup>. Der Verlust von ATP und der Plasmamembranintegrität, bedingt durch eine gesteigerte Proteaseaktivität, führt zur Auslösung des Untergangs der Zelle über Nekrose<sup>68,71</sup>. Auch nekrotischer Zelltod spielt im Rahmen des myokardialen I/R-Schadens eine Rolle. Die Inhibition der mPTP über Cyclosporin A (CsA) und Sanglifehrin-A zeigte eine Reduktion des Zelltods der Kardiomyozyten in Folge der I/R<sup>24,72,73</sup>.

### 1.3.4 Interferenzen

Neueste Erkenntnisse zeigen jedoch, dass diese klassischen Modelle der Apoptose und Nekrose viel komplexer und stärker miteinander verbunden sind, als bisher angenommen. Die Öffnung der mPTP kann nicht nur zum nekrotischen, sondern auch zum apoptotischen Zelltod führen<sup>74</sup>. Der Einstrom an Wasser in die Matrix führt zu einem Anschwellen der inneren Membran, welche sehr dehnbar ist. Dagegen kann es jedoch zum Platzen der weniger dehnbaren äußeren Membran kommen. Dies geht mit einer Freisetzung von Cytochrom c und weiterer pro-apoptotischer Faktoren einher und hat den intrinsischen Signalweg zur Folge<sup>74,75</sup>. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Öffnung der mPTP auch zu einer BAX-Translokation zum Mitochondrium, einer BAX-medierten Öffnung der MOMP und somit einhergehenden Freisetzung von Cytochrom c führen kann<sup>76,77</sup>. Dabei ist zu erwähnen, dass die Daten aus *in vitro* Versuchen stammen und die Vergleichbarkeit zu *in vivo* Mechanismen kritisch betrachtet werden muss. Lange ist man davon ausgegangen, dass die mPTP aus *voltage dependent anion channel* (VDAC) in der äußeren Membran, *adenine nucleotide translocator 1* (ANT1) in der inneren Membran und Cyclophilin D in der Matrix besteht<sup>71</sup>. Dies wird jedoch kontrovers diskutiert. Es konnte gezeigt werden, dass weder VDAC<sup>78</sup> noch ANT1<sup>79</sup> am Aufbau der mPTP beteiligt zu sein scheinen. Durchgeführt wurden diese Studien anhand von isolierten Mitochondrien und primären Zellen aus den entsprechenden defizienten Mäusen. Auch die Bestandteile und der Aufbau der MOMP werden weiterhin diskutiert. Neben BAK kann BAX auch mit BID *in situ* oligomerisieren und eine 25-100nm Membranpore bilden<sup>80,81</sup>. Diese Studien beziehen sich auf Versuche an Liposomen. Bisher gibt es keine Daten die zeigen, dass diese Formation auch *in vivo* vorkommt. Zudem kann die Bildung der MOMP *in vitro* auch einen Capase-unabhängigen

Zelltod auslösen. Dieser wird als eine Konsequenz der Abnahme der Membranfunktion aufgrund des Verlustes der Zellatmung verstanden<sup>82</sup>. Diskutiert wird auch eine Permeabilisierung der mitochondrialen Membran über die Interaktion zwischen BAX und VDAC<sup>83,84</sup>. Insbesondere in den letzten Jahren wurde auch der Begriff der Nekroptose als ein Caspase-unabhängiger, programmierter Zelltod geprägt, welcher auch im I/R-Schaden eine Rolle zu spielen scheint<sup>85</sup>. Dies zeigt, dass die Mechanismen, welche zum Tod einer Zelle führen, noch nicht ausreichend geklärt sind. Zudem scheinen im I/R-Schaden verschiedene Signalwege den Untergang der Kardiomyozyten auszulösen und dabei ist die relative Häufigkeit von Apoptose und Nekrose unklar<sup>86</sup>. Zudem ist zu berücksichtigen, dass es hier bisher nur Daten aus *in vitro* und *in situ* Versuchen gibt, da eine eindeutige Analyse, wie die Zelle zugrunde gegangen ist, *in vivo* mittels biochemischer Analysen nur schwer realisierbar ist<sup>87</sup>.

Ob Apoptose, Nekrose oder Nekroptose: die Wahrung der mitochondrialen Integrität und Funktionalität scheint bei der Reduktion des Reperfusionsschadens von zentraler Bedeutung<sup>88</sup>. Ein vielversprechender Ansatz hierbei scheint das Protein *BCL-2 and adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein3* (BNIP3) darzustellen. Es konnte in verschiedenen *in vitro* Studien eine Beteiligung des pro-apoptotischen Proteins, sowohl bei der über mPTP-, als auch über MOMP-induzierten mitochondrialen Zellantwort identifiziert werden.

## 1.4 BNIP3

### 1.4.1 Die Entdeckung von BNIP3

BNIP3 wurde 1994 in einem *two-hybrid Screen* in Hefe entdeckt und in die Gruppe der pro-apoptotischen BCL-2 Proteine, zur Untergruppe der BH3-only Proteine, eingeordnet<sup>89</sup>. Das aus 194 Aminosäuren bestehende Protein weist eine Größe von 21,5kDa auf und wird human auf dem Chromosom 10q26.3 codiert<sup>90</sup>. Kurz nach der Entdeckung konnte ein Zusammenhang des pro-apoptotischen Proteins BNIP3 mit verschiedenen Krebserkrankungen hergestellt werden. Eine DNA-Methylierung des *Bnip3* Gens führt in Tumorzellen zu einer Gen-Stillegung, welches das Überleben der Tumorzellen sichert. Es konnte ein Zusammenhang zwischen BNIP3 und kolorektalen Tumoren<sup>91,92</sup>, Brustkrebs<sup>93,94</sup>, Prostatakrebs<sup>95</sup> und Bauchspeicheldrüsenkrebs<sup>96</sup> hergestellt werden.



**Abb.1.3: BNIP3-Sequenz**

Schematische Darstellung der BNIP3-Sequenz. Die BH3-Domäne (AS110-118) ist grün und die Transmembrandomäne (TM) (AS164-184) orange dargestellt.

#### 1.4.2 BNIP3 im I/R Schaden

2001 erweckte BNIP3 auch das Interesse in der Herz- und Kreislaufforschung. Guo *et al.* konnten *in vitro* zeigen, dass eine Hypoxie in neonatalen Kardiomyozyten aus Ratten eine verstärkte Expression von BNIP3 zu Folge hat<sup>97</sup>. Weitere Gruppen konnten *in vitro* eine verstärkte Expression von BNIP3 in neonatalen<sup>98,99</sup> und postnatalen<sup>100</sup> Kardiomyozyten aus Ratten unter Hypoxie nachweisen. Zudem wird BNIP3 verstärkt in Ratten mit einem chronischen Herzfehler in Folge eines Myokardinfarkts exprimiert<sup>100</sup>. Auch in murinen Herzen und bei Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie ist eine substantielle Hochregulation von BNIP3 beschrieben worden<sup>98,101</sup>.

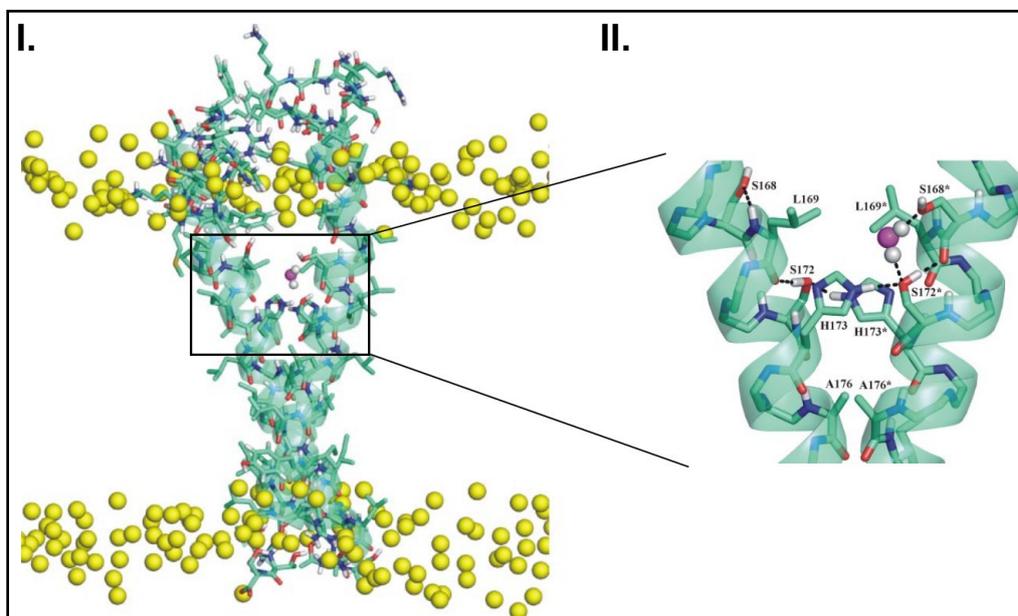
Guo *et al.* konnten zudem zeigen, dass eine verstärkte Expression von BNIP3 in HeLa-Zellen zum Tod der Zellen führt<sup>97</sup>. Auch weitere Gruppen konnten die Zelltod-aktivierende Wirkung von BNIP3 bestätigen. Unter welchem Mechanismus es zum Untergang der Zellen kommt und ob es sich hierbei um Apoptose, Nekrose oder eine bisher nicht charakterisierte Form des Zelltods handelt, wird kontrovers diskutiert. Zudem scheint dies Zell-abhängig zu sein. Guo *et al.* konnten einen Caspase-unabhängigen BNIP3-induzierten Zelltod in HeLa-Zellen identifizieren<sup>97</sup>. Regula *et al.* zeigten dagegen in postnatalen, ventrikulären Ratten-Kardiomyozyten, dass der BNIP3-induzierte Zelltod über Caspase-Inhibitoren reduziert werden kann<sup>100</sup>. Neben Caspase-Inhibitoren zeigten auch Inhibitoren der mPTP eine Reduktion des BNIP3-vermittelten Zelltods. Zudem konnte hier eine nukleosomale DNA-Fragmentierung festgestellt werden<sup>100</sup>. Die DNA-Fragmentierung konnten auch Kubasiak *et al.* in neonatalen Rattenkardiomyozyten unter Hypoxie zeigen. Sie entdeckten jedoch einen Caspase-unabhängigen, mPTP-abhängigen Effekt von BNIP3<sup>99</sup>. Ebenso wie Van de Velde *et al.*, die zeigten, dass die Überexpression von BNIP3 in 293T Zellen einen Caspase 3 und 9-unabhängigen nekrotischen Zelltod ohne Cytochrom c-Freisetzung induziert<sup>102</sup>. Hamacher-Brady *et al.* dagegen verwiesen eher auf apoptotische Marker und zeigten in *heart like-1* (HL-1) Kardiomyozyten unter Hypoxie einen Caspase-abhängigen Zelltodeffekt von BNIP3<sup>103</sup>. In einem Langendorff-Modell

mit Rattenherzen konnte zudem ein aktivierender Effekt von BNIP3 auf die Freisetzung von Cytochrom c und AIF aus den Mitochondrien gezeigt werden. Die Inhibition der Aktivität von BNIP3 mit einer Transmembrandeletionsmutante des Proteins (siehe 3.4) führte im Langendorff-Modell zu einer Reduktion der Infarktgröße<sup>103</sup>. 2007 konnten Kubli *et al.* ein Zusammenspiel zwischen BNIP3 und den pro-apoptotischen BCL-2-Familienmitgliedern BAX und BAK darlegen<sup>104</sup>. Die BNIP3-Überexpression in Wildtyp *mouse embryonic fibroblast* (MEF) Zellen führte zu einer gesteigerten Zelltodrate. Dieser Effekt konnte dagegen in BAX/BAK-Doppelknockout MEF-Zellen nicht erzielt werden<sup>104</sup>. Der BNIP3-induzierte Zelltod ging hier mit der Freisetzung von Cytochrom c und der Öffnung der mPTP einher. Zudem konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Inhibition von BNIP3 die Translokation von BAX zu den Mitochondrien, welche unter Hypoxie stattfindet, reduziert<sup>104</sup>. 2007 konnten Diwan *et al.* erstmals den Effekt von überexprimiertem BNIP3 auf den myokardialen I/R-Schaden im *in vivo* (Mausmodell) zeigen. Die Überexpression von BNIP3 führte zu einer signifikanten Vergrößerung der Infarktgröße<sup>105</sup>.

### 1.4.3 Struktur und Funktion von BNIP3

Unklar sind dabei die Mechanismen, über die BNIP3 die pro-apoptotische Wirkung erzielt und die Faktoren, die die zelltodaktivierende Wirkung von BNIP3 auslösen. Erste wichtige Hinweise darauf gibt die Struktur des Proteins. BNIP3 weist einen am N-Terminus lokalisierten, konservierten Cysteinrest auf (Cys64)<sup>106</sup>. Dieser zeigte über eine Disulfidbrückenbindung einen stabilisierenden Effekt auf die Homodimerisierung von BNIP3<sup>106</sup>. Die Aminosäuren 110-118 codieren die für BH3-only Proteine typische BH-Domäne. Der C-Terminus weist eine Carboxy-terminale Transmembrandomäne auf (Aminosäuren 164-184)<sup>89</sup> (Abb.1.3). Die Transmembrandomäne soll entscheidend für die Funktion von BNIP3 sein. Nach der Deletion der Transmembrandomäne konnte keine Zelltodaktivität von BNIP3 mehr festgestellt werden<sup>100,107,108</sup>. Auch der N-Terminus scheint für die BNIP3-Zelltodaktivität von Bedeutung<sup>106</sup>. Essentiell dabei soll der Einfluss des C- und N-Terminus auf die Dimerisierung des Proteins sein<sup>106</sup>. Kubli *et al.* zeigten *in vitro* in HL-1 Zellen, dass der Austausch von Histidin mit Arginin am C-Terminus (BNIP3H173A) die Dimerisierung von BNIP3 verhindert. Damit einhergehend kam es auch zu einer vollständigen Inhibition der Zelltodaktivität von BNIP3. Der Austausch des N-

terminalen Cysteins mit Arginin (BNIP3C64A) dagegen führte zu einer Verringerung der Dimerisierung. Dieses ging mit einer verringerten Zelltodaktivität von BNIP3 einher<sup>106</sup>. Die Dimerisierung soll notwendig für die Integration von BNIP3 in die äußere Mitochondrienmembran sein, wo das Protein zu interagieren scheint<sup>100</sup>. Die Struktur von BNIP3 in den Mitochondrien wurde mittels löslicher *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* (NMR) untersucht. Dabei wurde die homodimere BNIP3-Transmembrandomäne in einer lipiddoppelschichtigen Mizelle charakterisiert<sup>109</sup>. Die dimere Domäne weist in der Membran eine rechtsdrehende Helix-Helix Struktur auf, die eine Hydrogen-reiche, über Histidin- und Serinreste ausgekleidete Pore, in der Mitte der Membran bildet (Abb.1.4). Aufgrund der hydrophilen Umgebung der Pore ist diese für Wassermoleküle zugänglich. Es ist daher möglich, dass BNIP3 selbst einen Ionen-leitenden Kanal durch die Membran bildet. Die Transmembrandomäne zeigte eine pH-abhängige Leitfähigkeit<sup>109</sup>. Besonders die elektrostatische Interaktion der Aminosäurereste Ser172 und His173 hat eine stabilisierende Wirkung auf die Dimerisierung<sup>110</sup>. Graham *et al.* zeigten in primären, neonatalen Kardiomyozyten aus Ratten, dass neben der Dimerisierung auch die Phosphorylierung von BNIP3 mit der Zelltodaktivität des Enzym korreliert<sup>101</sup>. Dies gab erste Hinweise auf eine posttranslationale Modifikation von BNIP3.



**Abb.1.4: BNIP3-Dimer**

(I.) Schematische Darstellung der Struktur des BNIP3-Dimers in einer Lipiddoppelschicht. Die Carbogen-, Nitrogen- und Sauerstoffatome sind in grün, blau und rot dargestellt, die Lipidköpfe der Membran als gelbe Kugeln und in der Mitte der Pore befindet sich ein Wassermolekül in magenta und weiß. (II.) Vergrößerter Ausschnitt des hydrophilen Histidin und Serin Motivs in der Pore. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Aminosäuren, die

eine stabilisierende Wirkung auf das Dimer haben, sind über gestrichelte Linien angedeutet (nach Bocharov *et al.*<sup>109</sup>).

#### 1.4.4 Weitere Funktionen von BNIP3

Im Rahmen des I/R-Schadens wird BNIP3 noch ein weiterer Wirkmechanismus zugeschrieben. BNIP3 wird als ein Mediator der Autophagie diskutiert<sup>111,112</sup>. Die Autophagie wird als ein Überlebensmechanismus angesehen. Charakterisiert wird sie über die Beseitigung von geschädigten Zellorganellen über intrazellulär ablaufende lysosomale Abbauprozesse<sup>61</sup>. Im Rahmen der myokardialen Ischämie zeigt die Autophagie eine kardioprotektive Wirkung<sup>103,113</sup>, wohingegen sie im Verlauf der Reperfusion mit dem Zelltod von Kardiomyozyten einhergeht<sup>113</sup>.

Neben der Wirkung im myokardialen I/R-Schaden werden dem Protein noch weitere Funktionen zugeschrieben. Die Inhibition der pro-apoptotischen Wirkung von BNIP3 spielt neben Krebs auch bei der rheumatischen Arthritis eine Rolle<sup>114</sup>. Zudem konnte BNIP3 in Folge einer Ischämie im Gehirn in Neuronen detektiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass das Protein beim Zellsterben von Neuronen eine aktivierende Rolle spielt<sup>115,116</sup>. Zudem scheint BNIP3 verwickelt zu sein im Zelltod von Makrophagen induziert über Milzbrandtoxine<sup>117</sup>.

### 1.5 Zielsetzung

Die Anzahl an Todesfällen durch einen akuten Myokardinfarkt ist in den letzten Jahren gesunken. Dennoch ist die Anzahl, aufgrund des Fehlens eines wirkungsvollen Therapeutikums zur Behandlung des Reperfusionsschadens, immer noch sehr hoch<sup>7</sup>. Die Entwicklung einer neuen Therapie stellt sich als essentiell dar. In dieser Arbeit wird der Einfluss des Proteins BNIP3 auf den Tod von Kardiomyozyten in der frühen Phase der Reperfusion nach myokardialer Ischämie untersucht. BNIP3 zeigt eine hohe zelltodaktivierende Wirkung und scheint an verschiedenen Mechanismen des Zelltods im I/R Schaden beteiligt zu sein<sup>103,104,118</sup>. Die Verwendbarkeit des Proteins als Zielprotein bei der Entwicklung einer neuen Therapie soll daher analysiert werden. Bislang wurden die meisten Studien zu BNIP3 *in vitro* durchgeführt und es ist erst wenig über die Struktur und Funktion des Proteins *in vivo* bekannt. Daher sollen in dieser Arbeit folgende Punkte in einem *in vivo* Mausmodell untersucht werden:

1. Expression und Lokalisation von BNIP3 in der frühen Phase der Reperfusion nach myokardialer Ischämie.
2. Untersuchung der Mechanismen, die die Aktivierung von BNIP3 determinieren
  - Untergeht BNIP3 eine für die Wirkung wichtige Translokation?
  - Reguliert eine posttranslationale Modifikation die BNIP3 Wirkung?
  - Findet eine aktivierende Oligomerisierung von BNIP3 statt?
3. Zelltodaktivität von BNIP3 / In welcher Zelltodantwort resultiert die von BNIP3 aktivierte Signalkaskade? Untersuchung:
  - der mitochondrialen Struktur
  - des mitochondrialen Membranpotentials
  - Aktivierung des BCL-2 Proteins BAX
  - Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren aus dem Mitochondrium
4. Einfluss von BNIP3 auf die Infarktgröße.

## 2 Methoden

Alle verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien, Assays, Kits, Antikörper, Puffer, Lösungen und Chemikalien sind unter 7 Material oder in dem entsprechenden Methodenteil aufgelistet. Alle Lösungen und Puffer wurden mit Wasser aus einer Millipore MilliQ Anlage angesetzt.

### 2.1 Mausstämme

#### 2.1.1 C57BL/6J

Als Wildtyp (WT) Kontrolle wurden C57BL/6J Mäuse verwendet, welche über die zuständige Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf bei Jackson Laboratory bezogen wurden. Die Tiere wurden bis zum Versuchsbeginn in der Tierversuchsanlage gehalten und versorgt. Sie wurden gruppenweise in Käfigen mit vorgeschriebener Größe (Typ 3) auf Holzgranulat (3/4) gehalten. Die Raumtemperatur betrug 19-21°C bei einer Luftfeuchtigkeit von 50-60%. Es existierte ein 12 Stunden Tag-/ Nacht-Zyklus mit einer halbstündigen Dämmerungsphase. Für die Versuche wurden männliche Mäuse im Alter von 12±3 Wochen und mit einem Gewicht von 25-30g verwendet.

#### 2.1.2 *Bnip3*-defiziente (*Bnip3*<sup>-/-</sup>)- Mäuse

Zur Untersuchung der Auswirkung des Proteins BNIP3 auf den Zelltod im myokardialen I/R-Schaden wurden *Bnip3*<sup>-/-</sup>-Mäuse verwendet. Diese Mäuse wurden von Prof. Gerald W. Dorn, MD (Ohio, USA) bereitgestellt und in der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf gezüchtet. Die Maus basiert auf dem Stamm C57BL/6. Zur Generierung des Knockouts wurden *Bnip3* Exon 2 und 3 durch eine Neomycin-Kassette ersetzt. Weibliche homozygote Tiere geben keine Milch. Daher wurden für die Zucht homozygote Männchen mit heterozygoten Weibchen verpaart. Des Weiteren konnte kein Unterschied zwischen dem Phänotyp der *Bnip3*<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich mit dem WT identifiziert werden<sup>105</sup>.

Alle Tierversuche wurden über die zuständige Behörde, das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen, im Vorfeld genehmigt (AZ 84-02.04.2014.A144).

#### Genotypisierung der *Bnip3*<sup>-/-</sup>-Mäuse:

##### DNA-Isolation:

Zur Charakterisierung aller Nachkommen der *Bnip3*<sup>-/-</sup>-Mäuse wurde der Genotyp mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bestimmt. Den Mäusen wurde 6 Wochen nach der Geburt eine Biopsie entnommen (2-3mm der Schwanzspitze). Aus dieser wurde zunächst die DNA isoliert. Dazu wurde ein Verdau der Biopsie mittels Proteinase K (Qiagen, Hilden) in Aufschlusspuffer im Thermoschüttler bei 55°C und 600rpm (Eppendorf, Hamburg) über Nacht durchgeführt und anschließend die DNA mittels Isopropanol gefällt, getrocknet und in H<sub>2</sub>O gelöst.

##### PCR:

Zur Vorbereitung der PCR wurden die Proben wie folgt angesetzt:

H <sub>2</sub> O	7,5µl
KAPA Red. Mix	12,5µl
Primer Mix	4µl
DNA	1µl

Der Primer-Mix setzte sich dabei aus 3 Primern (Eurofins, Luxemburg) zusammen welche 1:10 in H<sub>2</sub>O verdünnt 1:2:2 eingesetzt wurden. Der KAPA Red. Mix (Peqlab, Erlangen) enthält Hot-Start DNA-Polymerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> und Stabilisatoren. Es wurde die PCR-Maschine Matercyler Gradient von Eppendorf verwendet.

## PCR-Programm:

95°C	3min	
95°C	15sec	} 35x
60°C	15sec	
72°C	15sec	
72°C	10min	
4°C	Hold	

## Primer:

*Bnip3*<sup>-/-</sup> FW: 5` TGT GGC TGA GAG TCA GTG GTC `3  
*Bnip3*<sup>-/-</sup> RW: 5` TTG CAA GTC TAG GAG TCA GTT `3  
 WT-Allel: 5` GTG GAT GTG GAA TGT GTG CG `3

## Agarose-Gelelektrophorese:

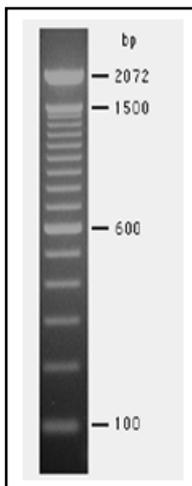
Mittels Agarose-Gelelektrophorese werden Nukleinsäurestränge in einem Agarosegel, an welches ein elektrisches Feld gekoppelt ist, der Größe nach aufgetrennt.

Zur Vorbereitung der Elektrophorese wurden die Proben nach der PCR 1:10 mit dem Laufpuffer Blue Juice (Invitrogen) verdünnt. Pro Geltasche wurden 20µl Probe aufgetragen. Neben den Proben wurde ein Marker (Invitrogen) (Abb.2.1) aufgetragen, welches eine anschließende Abschätzung der Größe der DNA-Fragmente ermöglichte. Es wurde das E-Gel System iBase von Invitrogen mit 2%igen, SYBR-Green enthaltenden, Agarosegelen verwendet. SYBR-Green ist ein DNA-interkalierender Fluoreszenzfarbstoff. Die Analyse des Fluoreszenzsignals erfolgte mittels Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare, München)

## Aufschlusspuffer:

100mM	Tris HCl (pH 8)
5mM	EDTA
0,2%	SDS
200mM	NaCl
ad H <sub>2</sub> O	

Marker:



**Abb.2.1: DNA Marker**

Bandenmuster des 100bp DNA Markers von Invitrogen (# 15628-019)

## 2.2 Entnahme von murinen Herzen

Die Mäuse wurden gewichtsadaptiert mittels Ketamin/Rompun (100mg/kg Körpergewicht Ketamin, 5-10mg/kg Körpergewicht Rompun i.p.) narkotisiert und auf einem auf 37°C aufgeheizten OP-Tisch (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) mittels Klebeband fixiert. Es erfolgte eine Öffnung des Brustkorbes indem zunächst die Haut über dem Sternum entfernt und ein Einschnitt in die Bauchdecke gemacht wurde. Anschließend wurde das Sternum mit einer Pinzette ergriffen, ein langer Schnitt durch die Rippen links und rechts gemacht und das Zwerchfell durchtrennt. Es folgte die Blutfreispülung des Herzens mittels eiskalter NaCl-Lösung. Die Lösung wurde über eine Rollerpumpe (Ismatec, Düsseldorf) durch einen PVC-Schlauch, verbunden mit einer Kanüle, welche direkt ins Herz gestochen wurde, eingeleitet. Im Anschluss wurde das Herz entnommen.

## 2.3 Isolation muriner Kardiomyozyten

Die Isolation der Kardiomyozyten aus adulten murinen Herzen erfolgte über einen Kollagenaseverdau mittels Kollagenase TypII (Biochrom, Berlin). Dazu wurden die Mäuse narkotisiert, die Herzen blutfrei gespült (2.2) und mitsamt ca. 1cm freiliegender Aorta entnommen. Die Aorta wurde im Anschluss mit 2 Pinzetten in eiskalter PBS-Lösung (Sigma, München) freipräpariert, auf eine Perfusionskanüle gestülpt und mittels Nylonfaden fixiert. Es erfolgte eine Perfusion des Herzens über

die Aorta mittels einer speziell angefertigten Glassäule (Verhees, Neuss) (Abb.2.2). Perfundiert wurde 25min mit einem mit  $4\mu\text{M}$  Kollagenase versetzten HEPES-Puffer. Im Anschluss wurde das Herz mittels *Tissue Ruptor* (Qiagen) zerkleinert und der entstandene Herzbrei für 5min in der Kollagenaselösung nachverdaut. Die Kardiomyozyten wurden mittels Filtration von noch nicht ganz verdauten Herzstücken getrennt und bei  $29\times g$ , 1min, Raumtemperatur (Rotina 38R, Hettich, Tuttlingen) pelletiert, um möglicherweise enthaltene Fibroblasten zu separieren.

HEPES-Puffer:

100mM	NaCl
2,5mM	KCl
1mM	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
1mM	$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$
20mM	Hepes
10mM	Glucosemonohydrat
ad $\text{H}_2\text{O}$	



**Abb. 2.2:** Fotoaufnahme Kardiomyozytenisoliationsanlage

Der Kollagenasepuffer wurde in das obere Pufferreservoir der Säule gegeben. Das über die Aorta an eine Kanüle aufgehangene Herz wurde am unteren Ende der Säule befestigt (roter Pfeil) und mit dem Puffer perfundiert. Über eine Rollerpumpe wurde der Puffer nach dem Durchlaufen des Herzens zurück in das obere Pufferreservoir gepumpt. Die Säule besteht aus Doppelglas und wird über eine Wasserpumpe mit 37°C warmen Wasser umspült.

## 2.4 SDS-PAGE und Western Blot

Mittels Western Blot wurde die Konzentration verschiedener Proteine aus humanem und murinem Herzgewebe, Kardiomyozyten, Zytoplasma, isolierten Mitochondrien als Ganzes sowie fraktioniert und HL-1 Zellen analysiert und verglichen. Dazu wurden zunächst Proteinlysate des zu untersuchenden Gewebes/Zellen/Zellorganells hergestellt, diese in der *sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) aufgetrennt und mittels Western Blot untersucht.

### Herstellung von Proteinlysaten

Gewebe:

Nach Entnahme der murinen Herzen (2.2) erfolgte ein Schockgefrieren des Gewebes mit flüssigem Stickstoff. Die gefrorenen Herzen wurden in 1ml RIPA-Puffer, versetzt mit Protease- und Phosphataseinhibitoren (Thermo Scientific, Darmstadt), mittels Glaspotter homogenisiert, das Homogenat für 1h bei 4°C auf einem Überkopfschüttler lysiert und die Zelltrümmer bei 14.000rpm, 4°C, 30min (Mikro 200R, Hettich) abzentrifugiert.

Mitochondrien:

Nach der Isolation der Mitochondrien (2.6) wurde das Pellet in 200µl Mito-Lysepuffer resuspendiert und für 1h bei 4°C auf einem Überkopfschüttler lysiert. Die Zelltrümmer wurden bei 14.000rpm, 4°C, 30min (Mikro 200R, Hettich) abzentrifugiert.

Zytoplasma:

Das bei der Isolation der Mitochondrien gewonnene Zytoplasma (2.6) wurde nach der Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation direkt verwendet.

Zellen:

Zur Herstellung von Proteinlysaten aus HL-1 Zellen wurde zunächst das Medium abgenommen und Mediumreste mittels PBS-Waschung entfernt. Anschließend

wurden die adhärennten Zellen zur Ablösung 2x2min mit 500µl Trypsin bei 37°C inkubiert, mit einem Zellschaber abgekratzt und bei 500xg, 5min, RT (Rotina 38R, Hettich) sedimentiert. Das HL-1 Zellpellet sowie das Kardiomyozytenpellet der primären Zellen (2.3) wurde in 500µl RIPA-Puffer, versetzt mit Protease- und Phosphataseinhibitoren, resuspendiert und die Zellen für 1h auf einem Überkopfschüttler (Neolab, Heidelberg) bei 4°C aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden mittels Zentrifugation (14.000rpm, 4°C, 30min) entfernt.

### Bestimmung der Proteinkonzentration

Mittels DC Protein Assay (Bio-Rad, München) wurde die Proteinkonzentration der Lysate bestimmt. Der Assay beruht auf der Methode nach Bradford. Hierbei wird ein Farbstoff eingesetzt, welcher mit Proteinen interkaliert und in Folge dessen sein Absorptionsmaximum ändert. Der Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, die photometrische Messung der Proben erfolgte bei einer Absorption von 700nm mit dem Plattenphotometer Fluostar Omega (BMG Labtech, Ortenberg).

### SDS-PAGE

Äquivalente Proteinmengen der Lysate wurden unter reduzierenden (50mM DTT) und nicht-reduzierenden (keine DTT Behandlung, keine Hitzedenaturierung) Bedingungen elektrophoretisch in SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt. Die Auftrennung der Proteine erfolgt dabei anhand ihrer Größe und Ladung entlang eines elektrischen Feldes, welches durch das Anlegen einer Spannung an das Gel erzeugt wird.

Zur Vorbereitung auf das SDS-Gel wurden die Proteinlysate 1:4 mit *LDS-Sample Buffer* (Invitrogen) und bei reduzierenden Bedingungen 1:10 mit *Reducing-Agent* (Invitrogen) versetzt und für 10min bei 70°C denaturiert.

Pro Geltasche wurden durchschnittlich 30µg Protein in einem Volumen von 20µl aufgetragen. Neben den Proben wurden zwei Proteinmarker (Magic Marker und See Blue Marker / Invitrogen) aufgetragen, welches eine anschließende Abschätzung des Molekulargewichts der Proteinbanden ermöglichte. Die Elektrophorese wurde mit dem Novex Bolt Gel Elektrophorese System (Invitrogen) durchgeführt. Es wurden 4-12%ige Bis-Tris Gele (Invitrogen) unter Verwendung von MES SDS *Running Buffer* (Invitrogen) als Laufpuffer verwendet. Die Elektrophorese lief für 30-40min bei einer angelegten Spannung von 200V (Power Pac 200, Bio Rad) ab.

### Western Blot

Im Anschluss erfolgte eine Übertragung der im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran mittels Spannung. Dies ermöglicht im Nachhinein, unter Verwendung spezifischer Antikörper, die Analyse einer Veränderung der Proteinkonzentration spezifischer Proteine, im Vergleich zueinander. Hierzu wurde das iBlot 2 Dry Blotting System von Invitrogen verwendet. Die Gele wurden dazu zunächst für 10min in einer 20%igen Ethanollösung inkubiert und anschließend unter Verwendung von iBlotTransfer Stacks (Invitrogen) auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, bei einer angelegten Spannung von 20V für 1min, 23V für 4min und 25V für 2min. Zur Kontrolle des Transfers erfolgte eine Ponceau-Färbung. Ponceau färbt die Proteine auf der Membran rot an und gibt zu erkennen, ob die aufgetragenen Proteinmengen äquivalent waren und die Auftrennung im Gel gleichmäßig verlaufen ist. Nach der Entfärbung durch 20minütiges Waschen mit TBS-T, wurde die Membran für 30-60min in einer 5%igen Lösung aus Magermilchpulver in TBS-T inkubiert, um unspezifische Bindestellen zu blockieren. Über Nacht wurde die Membran mit dem spezifischen Antikörper des nachzuweisenden Proteins bei 4°C auf einem Schüttler (Heidolph, Schwabach) inkubiert. Die Antikörper wurden in 3% BSA in TBS-T angesetzt und mit 0,0003% Na-Azid versetzt, welches der Stabilisierung des Antikörpers dient. Die verwendeten Antikörper und die eingesetzten Verdünnungen sind unter 7 Material aufgelistet.

Am nächsten Tag wurde der Antikörper abgenommen und die Membran 5x10min mit TBS-T auf einem Schüttler bei RT gewaschen. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem Spezies-spezifischen Sekundärantikörper in 3% BSA in TBS-T. Daraufhin wurde erneut 5x10min mit TBS-T gewaschen. Zur Visualisierung der Proteinbanden wurde die Nitrozellulosemembran für 1min mit einer Belichtungslösung, abhängig von der Sensitivität des Antikörpers mit SuperSignal West Pico Chemilumineszenz Substrate oder SuperSignal West Femto Chemilumineszenz Substrat (Thermo Scientific) inkubiert und die Chemilumineszenz im Image Quant LAS 400 (GE Healthcare) aufgezeichnet.

Alle verwendeten Sekundärantikörper waren HRP (horseradish peroxidase) konjugiert. Diese Peroxidase katalysiert die Chemolumineszenzreaktion von Luminol. Die Belichtungslösung enthält das HRP-Substrat wodurch es zur Entstehung von Chemilumineszenz, an der Stelle auf der Membran kommt, an die der

Sekundärantikörper gebunden hat. Die Aufzeichnungen wurden im Anschluss bearbeitet (Photoshop) und ausgewertet (ImageJ).

RIPA-Puffer:

50mM	Tris-HCl
150mM	NaCl
0,5mM	EDTA
1%	NP-40
1:100	Protease-und Phosphataseinhibitoren

Mito-Lysepuffer:

200mM	Sucrose
10mM	HEPES
1mM	EGTA
1%	TritonX100
pH 7,4	

TBS:

10mM	Tris/HCl
100mM	NaCl
pH 7,5	

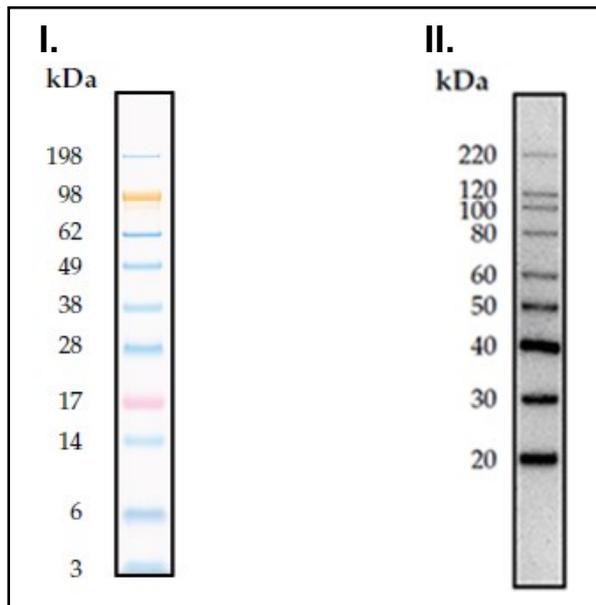
TBS-T:

0,1%	Tween 20
ad TBS	

Ponceau-Lösung:

0,2g	Ponceau
0,3g	Trichloressigsäure
ad 100ml H <sub>2</sub> O	

Marker:



**Abb. 2.3: Western Blot Marker**

Bandenmuster der verwendeten Western Blot Marker (I.) See Blue (# LC5925) und (II.) Magic Mark (# LC5602) von Invitrogen

## 2.5 Real-time qRT-PCR

Zur Analyse der Konzentration spezifischer mRNAs aus murinen Herzen wurde eine Echtzeit quantitative Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (real-time qRT-PCR) (7500 Fast PCR, Thermo Fischer) durchgeführt. Nach Entnahme der Herzen (2.2) wurde die mRNA mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Im Anschluss erfolgte eine Umschreibung der mRNA in cDNA mittels dem High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Life Technologies) nach Herstellerangaben. Es wurden je 2µg RNA eingesetzt, so dass von einer umgesetzten cDNA Menge von 2µg ausgegangen werden konnte. Im Folgenden ist das verwendete PCR-Programm zur Umschreibung in cDNA verzeichnet:

PCR-Programm:

37°C	60min
95°C	5min
4°C	Hold

Die real-time qRT-PCR wurde unter Verwendung des TaqMan Gene Expression Assay (Life Technologies) nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden pro Ansatz 400ng cDNA eingesetzt und jede Probe wurde 3-fach bestimmt. Als Kontrolle diente die Rn18s mRNA.

PCR-Programm:

50°C	2min	
95°C	10min	
95°C	15sec	} 40x
60°C	1min	

Primer:

- BNIP3, Applied Biosystems, Taq Man Gen Expression Assay, # Mm00833810\_g1
- Rn18s, Applied Biosystems, Taq Man Gen Expression Assay, # Mm00833810\_g1

## 2.6 Isolation muriner Mitochondrien und Zytoplasma aus Herzen

Die Mäuse wurden mittels zervikaler Dislokation getötet. Die Entnahme des Herzens erfolgte direkt nach der Tötung durch Öffnung des Brustkorbes. Nach Entnahme wurde das Herz in Mito-Isopuffer aufgenommen, 2x eingeschnitten und blutfrei gespült. Anschließend wurde das Herz in einem BSA-Puffer aufgenommen, mit einer Schere in kleine Stücke geschnitten und in 4ml BSA-Puffer mittels Ultra-Turrax (IKA-Werke, Staufen) homogenisiert (2x10s Stufe 1 / 1x5s Stufe 2). Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (700xg, 10min, 4°C / Mikro 200R, Hettich), der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und die Mitochondrien pelletiert (15.000xg, 10min, 4°C). Im Überstand befindet sich das Zytoplasma, welches mittels 30minütiger Zentrifugation bei 105.000xg, 4°C (Optima, Beckman Coulter, Krefeld) im Anschluss aufgereinigt wurde. Das Mitochondrienpellet wurde noch einmal mit Mito-Isopuffer gewaschen, pelletiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Alternativ wurden Mitochondrien mittels Qproteome Mitochondria Isolation Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert.

Mito-Isopuffer:

250mM	Sucrose
10mM	HEPES
1mM	EGTA

BSA-Puffer:

0,5%	BSA
------	-----

in Mito-Isopuffer

## 2.7 Fraktionierung von Mitochondrien

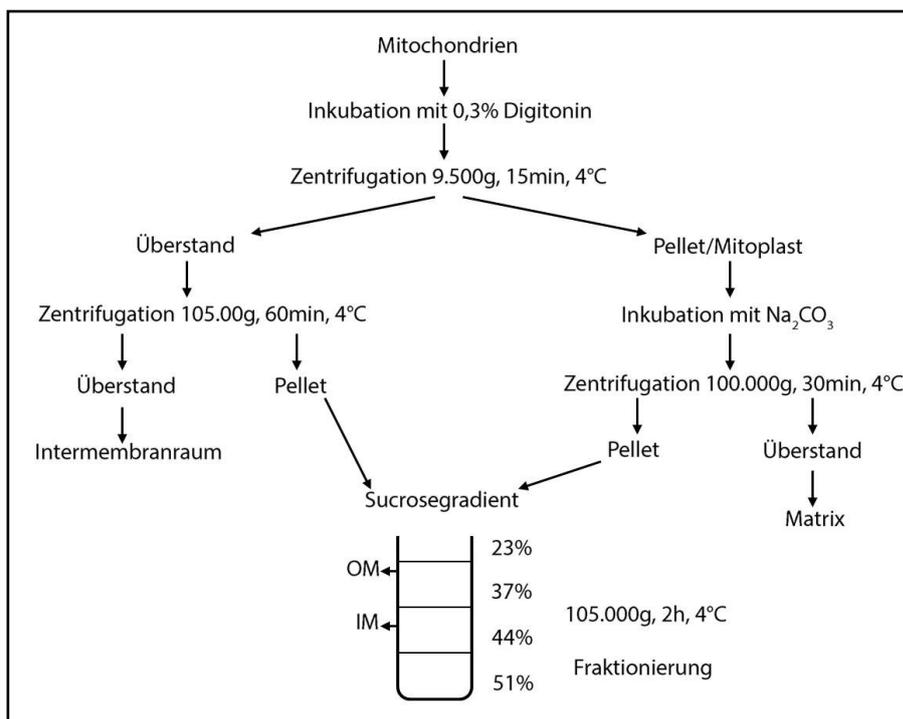
Zur Fraktionierung der Mitochondrien in innere und äußere Membranfraktion wurde ein Protokoll etabliert (Abb.2.4). Die, wie unter 2.6 beschrieben, isolierten Mitochondrien aus zwei Herzen wurden in 400µl Sucrose-Lösung (0,25M) resuspendiert und 1:2 mit einer 0,6%igen Digitonin Lösung versetzt (Endkonzentration 0,3%). Digitonin, ein nichtionisches Tensid, solubilisiert Membranproteine und zerstört so die Integrität der Membran. Es erfolgte eine 20minütige Inkubation auf einem Überkopfschüttler bei 4°C. Mittels Zentrifugation bei 9.500xg, 15min, 4°C (Mikro 200R, Hettich) wurden die Mitoplasten (bestehend aus innerer Membran und Matrix) pelletiert und anschließend durch eine 20minütige Inkubation in 0,1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung auf Eis aufgeschlossen. Bei 100.000xg, 30min, 4°C (Optima, Beckman Coulter) wurde die innere Membran pelletiert und so von der Matrix getrennt.

Der Überstand der ersten Zentrifugation, welcher die äußere Membran und den Intermembranraum enthält, wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 105.000xg, 60min, 4°C erfolgte die Pelletierung der äußeren Membran und somit die Trennung des Intermembranraums.

Da die Membranen, aufgrund von Interaktionen von Proteinen der inneren mit Proteinen der äußeren Membran, mit dieser Methode nicht vollständig voneinander separiert werden konnten, erfolgte im Anschluss eine Aufreinigung der Fraktionen über einen Sucrosegradienten. Der Gradient setzte sich wie folgt zusammen: 1ml 51% Sucrose, 1ml 44% Sucrose, 500µl 37% Sucrose, 500µl 23% Sucrose und wurde in einem Zentrifugenröhrchen angesetzt. Die innere und die äußere Membranfraktion wurden in je 500µl einer Lösung aus 0,25M Sucrose, 10mM Tris-HCl, pH 7,4 aufgenommen, auf den Gradienten aufgetragen und zentrifugiert (105.000xg, 2h,

4°C). Von oben herab wurden je 200µl Fraktionen des Gradienten abgenommen und die Zusammensetzung mittels Western Blot analysiert. Zur Identifizierung der Fraktionen wurden folgende Proteine mittels spezifischer Antikörper analysiert:

- innere Membran: *adenine nucleotide translocase type 1* (ANT1)
- äußere Membran: *translocase of outer mitochondrial membrane 22 homolog* (TOMM22)



**Abb.2.4: Fraktionierung von Mitochondrien**

Schematische Darstellung des etablierten Protokolls zur Fraktionierung von Mitochondrien in innere und äußere Membranfraktion.

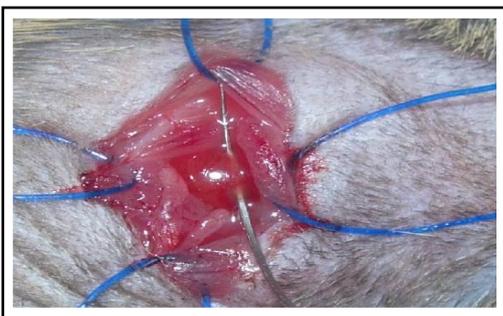
## 2.8 In vivo I/R Mausmodell

Alle Arbeiten wurden in Asepsis durchgeführt (sterile Handschuhe, sterilisierte Bestecke, sterilisierte Lösungen, sterilisiertes Nahtmaterial). Während der Operation (OP) wurden die Tiere auf einem geheizten OP-Tisch (Hugo Sachs Elektronik) bei einer Temperatur von 37°C warm gehalten.

Die Mäuse wurden gewogen und anschließend gewichtsadaptiert mittels Ketamin/Rompun (100mg/kg Körpergewicht Ketamin, 5-10mg/kg Körpergewicht Rompun i.p.) narkotisiert. Es erfolgte eine Intubation mit 20G Venenverweilkathetern (Vygon, Aachen) und Ventilation der Mäuse über einen speziellen murinen

Respirator Mini Vent Typ 845 (Hugo Sachs Elektronik). Die Intubationsnarkose wurde mittels 1,2-2 Vol% Isofluran aufrechterhalten. Mittels lateraler Sternotomie erfolgte die Thorakotomie, 1,5cm Schnittlänge und die Präparation des Herzens unter Verwendung eines Operationsmikroskops (MS5, Leica, Wetzlar). Anschließend wurde die linke Koronararterie exponiert und diese für 30min reversibel ligiert. Die Ligation erfolgte über das Umstechen der linken Koronararterie und Aufnähen eines 0,6mm Polyethylenschlauchs mit einem 6-0 Prolene Faden (Abb.2.5). Die Beobachtung des Erblässens des distal gelegenen Myokards diente als Erfolgskontrolle. Die Verwendung des Schlauches ermöglichte eine Wiederöffnung der Ligation und die Einleitung der Reperfusion durch die Entfernung des Schlauches. Der Nylon Faden wurde zur Bestimmung der „Area at risk“ (dem potentiell Ischämiegefährdeten Gebiet) belassen.

Nach 30minütiger Ischämie erfolgte eine Reperfusionsphase von je nach Versuchsansatz 0-24h. Dauerte die Reperfusionsphase länger als 30min, wurde der Thorax lagenweise mit resorbierbarem Nahtmaterial wieder verschlossen. Nach Ausschleichen der Narkose erfolgte eine Extubation und die Überprüfung der eigenständigen Atmung der Tiere. Mittels Rotlicht erfolgte eine Warmhaltung. Eine Schmerzstillung erfolgte postoperativ und alle 12 Stunden durch die Gabe von Buprenorphin (Temgesic, 0.05 – 0.1mg/kg Körpergewicht, s.c.).



**Abb. 2.5: Ligation**

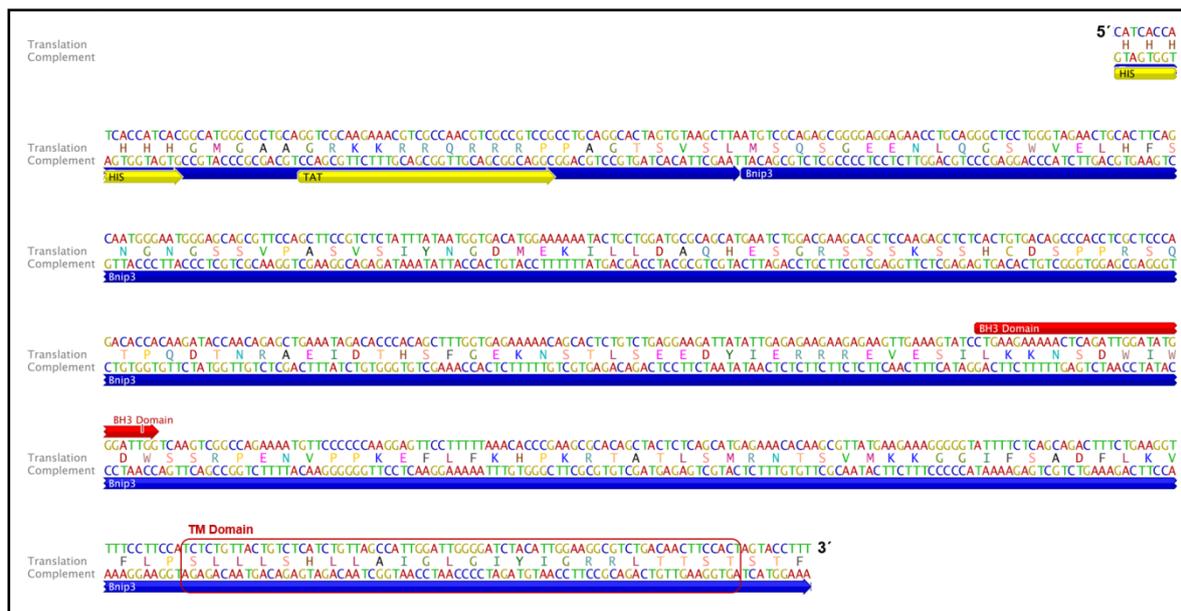
Fotoaufnahme des Herzens einer Maus, während des Setzens einer Ligation zur Erzeugung einer myokardialen Ischämie.

### Zugabe der Fusionsproteine

Zur Inhibition der Aktivität bzw. Zugabe des Proteins BNIP3 wurden die Fusionsproteine TAT-BNIP3 $\Delta$ TM (Inhibition) und TAT-BNIP3 verwendet (Abb.2.6). TAT-BNIP3 $\Delta$ TM besteht aus der TAT-Sequenz des HI-Virus, welches das Eindringen des Proteins in die Zelle ermöglicht<sup>119</sup> und der Aminosäure (AS)-Sequenz einer Deletionsmutante von BNIP3, welcher die Transmembrandomäne fehlt. Diese

Mutante wirkt als dominant negativer Inhibitor der BNIP3-Aktivität<sup>18</sup>. TAT-BNIP3 besteht aus der TAT-Sequenz gekoppelt an das gesamte Protein und ermöglicht eine Zugabe von BNIP3. Zur Aufreinigung der Proteine während der Herstellung (2.9) ist neben der TAT-Sequenz noch ein His-Taq, bestehend aus 6 Histidinen, an die Proteine gekoppelt.

Die Proteine wurden 5min vor Ischämie linksventrikulär, mittels Hamiltonpipette, in einem Volumen von 50µl und einer Stoffmenge von 2nmol in NaCl-Lösung direkt ins Herz injiziert.



**Abb. 2.6: Sequenz der BNIP3-Fusionsproteine**

DNA- und Aminosäuresequenz des Fusionsproteins 6xHis-TAT-BNIP3. Der Bereich der Transmembrandomäne, welchen die Deletionsmutante TAT-BNIP3 $\Delta$ TM nicht aufweist, wurde hier rot eingekreist.

### Bestimmung der Infarktgröße

Zur Bestimmung der Infarktgröße nach einer 30minütigen Ischämie mit anschließender 24stündiger Reperfusion wurde eine Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)-Färbung durchgeführt. In intakten Zellen kommt es zu einer Reduktion des Redox-Indikators Tetrazolium (farblos), über die Dehydrogenasen der Atmungskette in den Mitochondrien, zu Formazan (rot). Diese Reaktion findet nicht in abgestorbenem Gewebe statt. Dies ermöglicht hier eine Trennung der intakten von toten Zellen des Herzgewebes. Diese Färbung findet nur in der AAR statt. Nicht durch die Ligation betroffenes Gewebe wird zuvor mittels Evansblue-Färbung blau

markiert indem die Ligation wieder geschlossen und die Färbelösung über die Aorta durch das Herz perfundiert wird. Über die abgebundene linke Koronararterie versorgtes Gewebe, welches von der Ischämie betroffen war, wird so nicht angefärbt und markiert die AAR. Dazu wurden die Mäuse erneut narkotisiert, auf einem OP-Tisch fixiert und der Brustkorb schnell geöffnet. Zur Öffnung des Brustkorbes wurde zunächst die Haut über dem Sternum entfernt und ein Einschnitt in die Bauchdecke gemacht. Anschließend wurde das Sternum mit einer Pinzette ergriffen und ein langer Schnitt durch die Rippen links und rechts gemacht. Das Zwerchfell wurde durchtrennt, der Gefäßstrang unterhalb des Herzens mit einer Pinzette ergriffen und das Herz abgelöst indem der Gefäßstrang entlang der Wirbelsäule abgeschnitten wurde. Nach Entnahme des Herzens wurde dieses in eine Schale mit eiskalter NaCl-Lösung (versetzt mit Heparin) gegeben und das Herz und die Aorta wurden frei präpariert. Die Aorta wurde über eine Perfusionskanüle gestülpt, mit einem Seidenfaden fixiert und das Herz über die Kanüle mit eiskalter NaCl-Lösung blutfrei gespült. Im Anschluss erfolgte die Re-Ligation der Koronararterie, indem über den noch vorhandenen 6-0 Prolene Faden ein neuer gelegt und zugezogen wurde. Mittels Spritze wurde dann über die Kanüle Evansblue-Lösung (2% in H<sub>2</sub>O) perfundiert. Das Herz wurde bei -20°C für 60min eingefroren und anschließend in 2mm dicke Scheiben geschnitten, welche für 15min bei 37°C in einer TTC-Lösung inkubiert wurden. Die Scheiben wurden dann einzeln gewogen, mikroskopiert und fotografiert (MZ6, Leica). Die entstandenen Bilder wurden mittels Diskus-Viewer ausgewertet und die Infarktgröße (%) der AAR berechnet.

#### TTC Lösung

30mM      TTC

gelöst in:

77,4%      0,1M      Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

22,6%      0,1M      NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

pH=7,4

## 2.9 Kultivierung von rekombinantem Protein in *E.coli*

### Kompetente *E.coli* Bakterien

Es wurden die kompetenten *E.coli* Bakterien Tuner™ von Novagen, Darmstadt verwendet. Es handelt sich dabei um eine *lacZY* Deletionsmutante des Stammes BL21. Die Mutation ermöglicht eine konzentrationsabhängige Regulation der Expression mit IPTG, ein Aktivator des *lac*-Operons. Die Zellen weisen eine Chloramphenicol Resistenz auf.

### Plasmid-DNA

Die Klonierung der Plasmide für die Expression von TAT-BNIP3 und TAT-BNIP3 $\Delta$ TM in *E.coli* sowie die Protokolletablierung der anschließenden Aufreinigung wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Raphael Stoll, Biomolekulare NMR, Ruhr-Universität Bochum durchgeführt. Als Ausgangsvektor für die Klonierung wurde pGEX 48-1 verwendet. Zur Selektion enthalten die Plasmide eine Ampicillin Resistenz. Die Klone kodieren folgende Proteinprodukte:

HIS(6x)-TAT-BNIP3-Intein

HIS(6x)-TAT-BNIP3 $\Delta$ TM-Intein

### Kultivierung und Transformation von *E.coli*

Zur Generierung der Fusionsproteine TAT-BNIP3 und TAT-BNIP3 $\Delta$ TM erfolgte eine Transformation der Plasmid-DNA in die kompetenten *E.coli* Bakterien. Dazu wurden je 100 $\mu$ l auf Eis aufgetaute Zellen mit 2 $\mu$ l Plasmid-DNA versetzt, für 20min auf Eis inkubiert und anschließend für 50sec einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Die Zellen wurden auf Eis für 2min wieder abgekühlt und anschließend mit 900 $\mu$ l SOC-Medium versetzt. Nach einer 30minütigen Inkubation bei 37°C wurden die Zellen herunterzentrifugiert bei 4500rpm, 5min, RT (Rotina 38R, Hettich), der Überstand bis auf ca. 100 $\mu$ l verworfen und die Zellen im restlichem Überstand resuspendiert. Es folgte ein Ausstreichen der Zellen auf Ampicillin enthaltende Agarplatten. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine der gewachsenen Kolonien von der Platte gepickt, in 500ml LB-Medium, versetzt mit 100 $\mu$ g/ml Ampicillin und 34 $\mu$ g/ $\mu$ l Chloramphenicol, gegeben und für 48h im Schüttelinkubator (Thermo Scientific) bei 37°C kultiviert. Im Anschluss wurden 100mM IPTG dazu geben. IPTG dient als Aktivator des *lac*-Operons und somit der

Transkription des auf dem Plasmid kodierten Proteins, indem es den *lac*-Repressor (das Proteinprodukt des *lacI* Gens) bindet und so der DNA-Polymerase den Zugang zum Operon ermöglicht. Nach einer weiteren 48stündigen Inkubation bei 37°C wurden die Zellen abzentrifugiert bei 6000xg, 15min, 4°C in 15ml Protease- und Phosphataseinhibitoren enthaltenden Phosphatpuffer aufgenommen und bei -20°C eingefroren.

#### Aufreinigung des Proteins mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie

Am nächsten Tag wurden die gefrorenen Zellen mit 1mg/ml Lysozym versetzt und für 1h bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mittels Ultrasonifier behandelt. Es wurde eine periodische Ultrasonifikation auf Eis für 10x 1min mit einer Amplitude von 250W durchgeführt. Das verwendete Gerät war ein HD 2200 Sonoplus Homogenisator mit einem Durchmesser von 13mm VS 70T Sonotrode (Bandelin, Berlin). Es erfolgte eine Pelletierung der restlichen Zellbestandteile bei max. g-Zahl, 50min, 4°C (Rotina 38R, Winkelrotor, Hettich). Das Zellhomogenat wurde abgenommen, mit Phosphatpuffer auf 50ml aufgefüllt und mittels Rollerpumpe auf eine 20ml Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA) Säule über Nacht aufgetragen. Die Proteine wurden dabei an die Säule gebunden, indem der His-Taq an das Nickel der Säule bindet. Die Säule wurde zuvor mit dem 10-fachen Säulenvolumen Phosphatpuffer äquilibriert. Nach der Auftragung des Lysats erfolgte eine Waschung, zur Entfernung des restlichen Homogenats mit dem 20-fachen Säulenvolumen Phosphatpuffer. Das im Phosphatpuffer enthaltende DTT schneidet das Intein am Protein ab. Die Eluierung des Proteins erfolgte mit Phosphatpuffer mit 250mM Imidazol versetzt. Imadizol, welches im Überschuss dazu gegeben wurde, bindet an das Nickel der Säule und verdrängt so das über Histidin gebundene Protein. Die Proteine wurden mittels Filter Units (Millipore) aufkonzentriert.

#### Aminosäuresequenzen:

TAT-BNIP3:

HHHHHH-GRKKRRQRRRPQ-MSQSGEENLQGSWVELHFSNGNGSSVPASVSIYN  
GDMEKILLDAQHESGRSSSKSSHCDSPPRSQTPQDTNRAEIDSHSFGEKNSTLSE  
EDYIERRREVESILKKNSDWIWDWSSRPENIPPKEFLFKHPKRTATLSMRNTSVMK  
KGGIFSADFLKVFLPSLLLSHLLAIGLGIYIGRRLTTSTSTF

TAT-BNIP3 $\Delta$ TM:

HHHHHH-GRKKRRQRRRPQ-MSQSGEENLQGSWVELHFSNGNGSSVPASVSIYN  
GDMEKILLDAQHESGRSSSKSSHCDSPPRSQTQDTNRAEIDSHSFGEKNSTLSE  
EDYIERRREVESILKKNSDWIWDWSSRPENIPPKEFLFKHPKRTATLSMRNTSVMK  
KGGIFSADFLKVFLPSTF

LB-Medium (Life Technologies):

1% Pepton 140

0,5% Hefeextrakt

0,5% NaCl

pH=7

SOC-Medium (Life Technologies):

2% Trypton

0,5% Hefeextrakt

10mM NaCl

2.5mM KCl

10mM MgCl<sub>2</sub>

10mM MgSO<sub>4</sub>

20mM Glukose

pH=7

Agarplatten:

Zur Herstellung der Agarplatten wurde 1g Agar in 100ml LB-Medium in einer Mikrowelle aufgekocht und nach einer kurzen Abkühlung mit 100 $\mu$ g/ml Ampicilin versetzt. Die Lösung wurde dann in Petrischalen ausgegossen und leicht geöffnet unter einer Arbeitsbank mit laminarer Luftströmung (Clean Air Engineering, Marseille) trocknen gelassen.

Phosphatpuffer (pH=8):

50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

300mM NaCl

5mM DTT

Elutionspuffer (pH=8):

50mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
300mM	NaCl
250mM	Imidazol
5mM	DTT

## 2.10 Elektronenmikroskopie

Mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurde die Struktur von den, aus murinen Herzen isolierten Mitochondrien analysiert. Mittels Immun-Elektronenmikroskopie (IEM) wurde das Protein BNIP3 auf den Mitochondrien mit Gold-Partikel markierten Antikörpern angefärbt und untersucht. Die Proben wurden generiert, fixiert, vorbereitet und anschließend von Ph.D. Ilkka Miinalainen im Biocenter Electron Microscopy der Universität von Oulu, Finnland, mikroskopiert. Verwendet wurde das Mikroskop Tecnai G2 Spirit 120 kV.

### Probenvorbereitung:

Fixierung von isolierten Mitochondrien für TEM:

Nach der Isolation wurde das Mitochondrienpellet in 500µl Mito-Isopuffer aufgenommen, 1:2 mit doppelt-konzentrierter Fixierungslösung gemischt und 10min inkubiert. Die Mitochondrien wurden dann bei 17.000xg, 2min, 4°C (Mikro 200R, Hettich) herunterzentrifugiert, in einfach-konzentrierter Fixierungslösung resuspendiert und 1h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Mitochondrien 3x10min mit PBS und 2x10min mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Das Pellet wurde in einem Tropfen 2,5%ige Agarose eingebettet und in Fixierungslösung bei RT gelagert.

Fixierung von Mitochondrien für IEM:

Nach der Fixierung (siehe TEM) wurden die Mitochondrien 2x10min mit PBS gewaschen und das Pellet anschließend in einem Tropfen 12%ige Gelatine in PBS eingetaucht. Nach einer 10minütigen Inkubation bei 37°C wurde die Probe 5min bei 13.000rpm, RT zentrifugiert und dann 30min auf Eis inkubiert. Das in Gelatine eingebettete Pellet wurde in 2,3M Sucrose in PBS gegeben, 4h bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert und dann bei RT gelagert.

Fixierlösung TEM:

Doppelt-konzentriert:

2% Glutaraldehyd

8% Formaldehyd

in PBS

Einfach-konzentriert:

1% Glutaraldehyd

4% Formaldehyd

in PBS

Fixierlösung IEM:

Doppelt-konzentriert:

2,5% Sucrose

8% Formaldehyd

in PBS

Einfach-konzentriert:

2,5% Sucrose

4% Formaldehyd

in PBS

## 2.11 Zellkultur

Als Modell wurden HL-1 Zellen, eine Zelllinie von atrialen Kardiomyozyten-Tumorzellen, verwendet. Diese Zellen wurden aus einem subkutanen Tumor einer weiblichen C57BLy6J (Jackson Laboratory, Maine, USA) Maus gewonnen. Bei den Tumorzellen handelte es sich um AT-1 (*atrial tumor*) Zellen<sup>120</sup>. Die kontrahierenden HL-1 Zellen sind mit regulären Kardiomyozyten vergleichbar und können in Zellkultur behandelt werden. Es handelt sich um adhärent wachsende Zellen, welche in einem speziell für diese Zellen entwickeltem Medium, dem Claycomb-Medium (Invitrogen), kultiviert werden. Bereitgestellt wurden die Zellen von Ph.D. William C. Claycomb, LSU Health Sciences Center, New Orleans.

Die HL-1 Zellen wurden in Gewebekulturflaschen (T-Flaschen, Carl Roth) mit gewinkeltem Hals und Filterdeckel im Brutschrank (Thermo Electron Corporation, Darmstadt) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Um eine Haftung der adhärennten Zellen zu ermöglichen, wurden die Gewebekulturflaschen im Vorfeld mit einer Gelatine/Fibronectin-Lösung beschichtet. Gearbeitet wurde unter einer sterilen Arbeitsbank mit laminarer Luftströmung (Clean Air Engineering). Alle 2 Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Zellen wurden in Claycomb-Medium (Sigma) unter Zusatz von 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Norepinephrin und 1% Glutamin kultiviert. Einmal pro Woche erfolgte eine 1:3 Splittung der Zellen. Dazu wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst (2x2min Inkubation bei 37°C), 5min bei 500xg (Rotina 38R, Hettich) pelletiert, in frischem Medium resuspendiert und 1:3 verdünnt in neue Gelatine/Fibronectin-beschichtete Gewebekulturflaschen überführt.

Gelatine/Fibronectin:

- 0,1g Gelatine auf 500ml H<sub>2</sub>O
- Lösung autoklavieren
- 1ml Fibronectin (1mg/ml) auf 200ml Gelatinelösung

## 2.12 Immunfluoreszenzfärbung

Mittels Fluoreszenzfärbung werden spezifische Proteine mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern mikroskopisch untersucht. Hier wurden Gewebeschnitte aus murinen Herzen (*in situ*) und fixierte HL-1 Zellen und isolierte murine Kardiomyozyten (*in vitro*) analysiert.

Probenvorbereitung:

*In vitro* Experimente:

Die HL-1 Zellen wurden mit Trypsin abgelöst, unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer (Brand, Wertheim) gezählt, in einer bestimmten Zellzahl auf zuvor Gelatin/Fibronectin-beschichtete Deckgläschen ausgesät und über Nacht anwachsen gelassen.

Die isolierten Kardiomyozyten (2.3) wurden in Suspension (PBS) gefärbt.

### *In situ* Experimente:

Die entnommenen Herzen (2.2) wurden zunächst für 2,5h in einer 20%igen Sucrose-Lösung, dann 2,5h in einer 30%igen Sucrose-Lösung und anschließend über Nacht in einer 40%igen Sucrose-Lösung auf einem Schüttler bei 4°C inkubiert. Die Inkubation in der Sucrose-Lösung entzieht dem Gewebe das Wasser und ermöglicht sauberere, luftblasenfreie Schnitte. Dann wurden die Herzen in Tissue Tek (ClinPath, Berlin) eingebettet und mittels Kryotom (Leica) 8µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf Objektträgern fixiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Es wurden je 10 Schnitte/Herzebene angefertigt, die Ebenen lagen dabei 150µm auseinander.

### Färbung der Schnitte/Zellen:

Die Proben wurden für 15min mit einer 4% Paraformaldehyd-Lösung fixiert, 3x5min mit PBS/0,5% Triton-X gewaschen, 1h mit 10% *normal goat Serum* (NGS) in PBS/Triton-X blockiert und bei 4°C über Nacht mit dem Primärantikörper in PBS/Triton-X/10% NGS inkubiert. Am nächsten Tag wurde 5x5min mit PBS/TritonX gewaschen, für 1h bei RT mit Fluoreszenzfarbstoff-markiertem Sekundärantikörper (1:250) in PBS/TritonX/NGS inkubiert, 3x5min mit PBS/TritonX gewaschen, 3min mit DAPI (1:5000) (Life Technologies) in PBS inkubiert und erneut 1x5min mit PBS/TritonX gewaschen. Die gefärbten isolierten Kardiomyozyten wurden in PBS am Mikroskop DFC425C (Leica) direkt mikroskopiert. Die fixierten HL-1 Zellen und die Herzschnitte wurden im Anschluss an die Färbung mit dem Einbettmedium ProLong Gold Antifade (Thermo Scientific) eingebettet und es erfolgte eine konvokale Mikroskopie mit dem Mikroskop Elyra PS (Zeiss, Oberkochen) unter Verwendung des Objektivs 63x/1.4Oil DIC M27 in Zusammenarbeit mit dem Center for Advanced Imaging (CAi) der Universität Düsseldorf und dem Imaging Center Essen (IMCES) des Universitätsklinikums Essen. Zur Kontrolle der Antikörperspezifität wurde immer parallel eine Probe nur mit Zweitantikörper, ohne vorherige Erstantikörperinkubation, angefertigt. Die verwendeten Antikörper und die entsprechenden Verdünnungen sind unter 7 Material aufgelistet.

## 2.13 Immunpräzipitation (IP)

Mittels Immunpräzipitation (IP) und anschließender SDS-Page/Western Blot wurde zum einen die Interaktion zwischen zwei Proteinen untersucht und zum anderen Proteine zur anschließenden Analyse isoliert. Das Prinzip der IP beruht auf der Bindung spezifischer Proteine an magnetischen Beads, welche mit entsprechenden Primärantikörpern gekoppelt sind. Über die Isolation der Beads mittels Magnet und folgender Elution der gebundenen Proteine können so einzelne Proteine aus einem Proteingemisch herausgetrennt werden.

### Herstellung von Proteinlysaten

Hierzu wurden zunächst Proteinlysate aus Herzgewebe hergestellt. Das zuvor aus Mäusen entnommene und schockgefrorene Gewebe (2.2) wurde mit 1mg/ml Lysozym, Protease- und Phosphatase-Inhibitoren und 1mM DTT in PBS mittels Glaspotter homogenisiert, 30min auf einem Überkopfschüttler inkubiert und der Zelldebris bei 14.000rpm, 4°C, 30min (Mikro 200R, Hettich) abzentrifugiert.

### Immunpräzipitation

500µg des Proteins in einem Volumen von 100µl wurden mit 2µg des entsprechenden Antikörpers und 0,005% Brij35 versetzt und über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden 20µl Beads (Dynabeads, ProteinG / Invitrogen) zu dem Gemisch hinzugegeben und eine weitere Stunde bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Daraufhin wurden die Beads 2x mit je 2ml PBS / 0,005%Brij35 / 1mM DTT gewaschen und anschließend die gebundenen Proteine eluiert. Zur Waschung der Proteine wurden die Reaktionsgefäße in einen Magnetständer (Invitrogen) eingehängt. Die Beads wurden an einen Magneten gebunden und die Waschlösung konnte ohne Beads entfernt werden. Die Elution erfolgte mit PBS, versetzt mit 1:4 *LDS-Sample Buffer* (Invitrogen) und 1:10 *Reducing Agent* (Invitrogen) bei 70°C für 10min. Die Proben wurden im Anschluss direkt gelelektrophoretisch aufgetrennt. Für eine IP unter nicht-reduzierenden Bedingungen wurde im gesamten Versuchsansatz kein DTT verwendet und die Proteinkonjugate direkt, ohne vorherige Elution von den Beads, im SDS Gel aufgetrennt. Durch die Spannung im Gel lösten sich die Proteine von den Beads, welche auf Grund ihrer Größe nicht diffundierten und in den Geltaschen blieben.

## 2.14 JC-1 Assay

Mittels 5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanin Iodid (JC-1) wurde das mitochondriale Membranpotential untersucht. Der Assay beruht auf einer konzentrationsabhängigen Akkumulation der JC-1-Aggregate in der Matrix der Mitochondrien, welches ein rotes Fluoreszenzsignal zur Folge hat. JC-1 wird nur von Mitochondrien mit einem physiologischen Membranpotential aufgenommen. Die Änderung des Membranpotentials hat einen Ausschluss von JC-1 aus den Mitochondrien und somit den Verlust des Fluoreszenzsignals zur Folge.

Der Assay wurde nach Herstellerangaben (MitoProbe™ JC-1 Assay Kit for Flow Cytometry / Invitrogen) durchgeführt. Anders als im Protokoll fand die Messung an isolierten Mitochondrien aus Mäuseherzen (2.4) statt und nicht an Zellen. Je Ansatz wurden 250µg Mitochondrien und 1,5µg JC-1/mg Mitochondrien eingesetzt. Das Fluoreszenzsignal wurde mittels Durchflusszytometer FACS Verse (Becton Dickinson) erfasst bei einer Extinktion von 514nm und einer Emission von 529 und 590nm.

## 2.15 *In vitro* Hypoxie/Reoxygenierung

Zur Generierung einer Hypoxie wurden die HL-1 Zellen in 6-Well-Platten (Carl Roth) ohne Deckel in einer luftdichten Kammer (Modular incubator chamber / Billups, Rothenberg) für 5min mit 5% Kohlendioxid in Stickstoff begast, die Kammer verschlossen und die Zellen 24h bei 37°C inkubiert. Als Medium wurde hier pures Claycomb-Medium ohne Zusätze verwendet. Nach der 24stündigen Inkubation im Inkubator bei 37°C erfolgte eine Reoxygenierung der Zellen, indem die Zellen aus der Kammer geholt und das Medium durch Claycomb-Medium mit Zusätzen (2.11) ersetzt wurde. Es folgte eine 1stündige Reoxygenierung im Inkubator bei 37°C.

## 3 Ergebnisse

Im myokardialen I/R-Schaden kommt es insbesondere in der frühen Phase der Reperfusion zu einem vermehrten Untergang von Kardiomyozyten<sup>18</sup>. Dies geht mit einer hohen Anzahl an Sterbefällen in Folge des Infarktes einher<sup>7</sup>. Die genauen Mechanismen, welche zum Tod der Zellen führen, sind jedoch weiterhin ungeklärt. Die Aufklärung der Zelltod-aktivierenden Signalwege ist bei der Identifikation eines neuen therapeutischen Zielproteins von entscheidender Bedeutung.

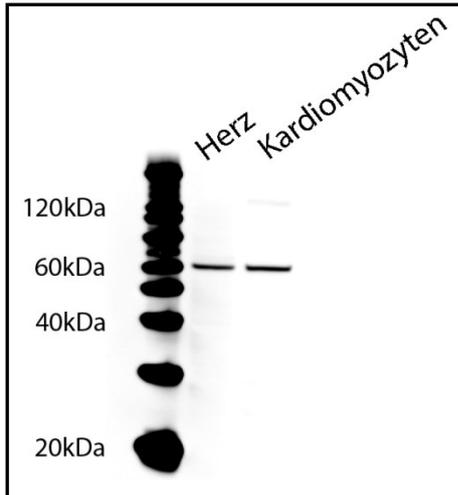
Welchen Einfluss das pro-apoptische Protein BNIP3 auf das Sterben der Zellen nimmt, welche Prozesse hierbei ablaufen und die Verwendbarkeit von BNIP3 als Zielprotein zur Behandlung des I/R Schadens wurden im Folgenden untersucht.

### 3.1 Expression von BNIP3

#### 3.1.1 Expression unter basalen Bedingungen

Es zeigte sich, dass nicht alle Zellen BNIP3 unter endogenen Bedingungen exprimieren und verschiedene Zellen unterschiedliche Level aufweisen<sup>97-99,118</sup>. Um die Rolle von BNIP3 im myokardialen I/R-Schaden im Mausmodell zu analysieren, wurde daher zunächst das Vorhandensein des Proteins unter basalen (endogenen) Bedingungen in adulten murinen Herzen mittels Western Blot analysiert. Da es im I/R-Schaden insbesondere zu einem Untergang an Kardiomyozyten kommt<sup>18</sup>, wurden zusätzlich explizit diese Zellen der murinen Herzen isoliert und die BNIP3-Proteinkonzentration hier gemessen.

Proteinlysate aus murinem Herzgewebe und isolierten murinen Kardiomyozyten wurden dazu gelelektrophoretisch unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Dabei zeigte sich, dass BNIP3 in adulten Herzen unter basalen Bedingungen exprimiert wird (Abb.3.1). Das Protein zeigt eine dimere Form, welche bei 60kDa im Gel dokumentiert werden konnte. Auch die isolierten Kardiomyozyten zeigten eine BNIP3-Proteinbande auf dieser Höhe im SDS-Gel (Abb.3.1). Unter reduzierenden Bedingungen (+50mM DTT) zeigte sich auch die monomere Form (30kDa) von BNIP3.

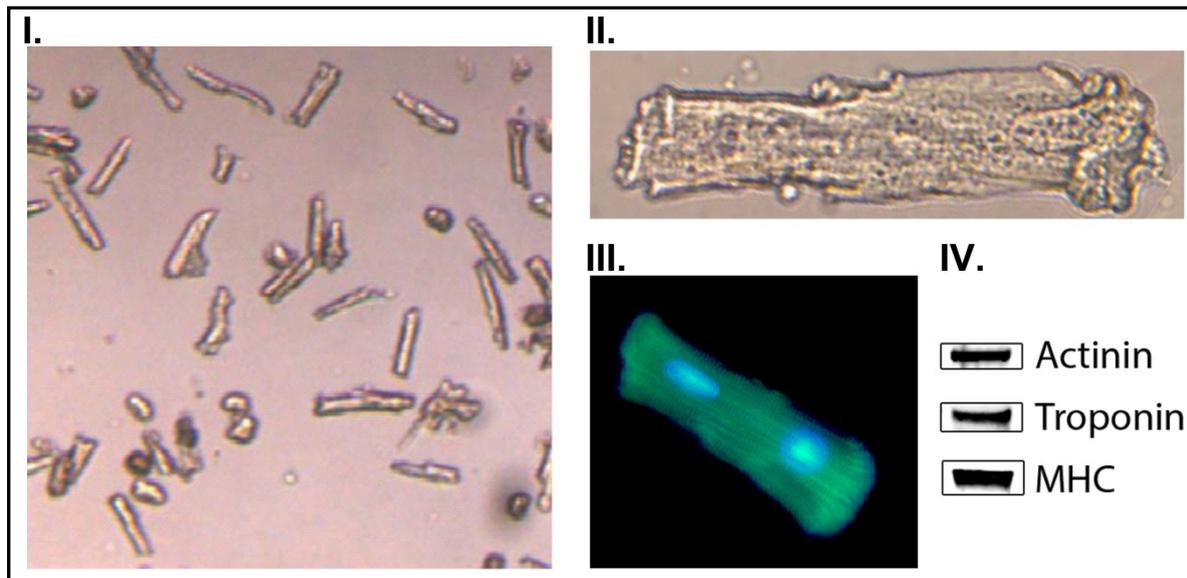


**Abb. 3.1: Expression von BNIP3 unter basalen Bedingungen**

Western Blot Analyse von BNIP3 in einem murinen Herz und isolierten, murinen Kardiomyozyten. Der Western Blot wurde unter nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt.

#### Charakterisierung der isolierten murinen Kardiomyozyten

Mittels Durchlichtmikroskopie, Fluoreszenzmikroskopie und Western Blot wurden die Kardiomyozyten nach ihrer Isolation charakterisiert. Die durchlichtmikroskopischen (Abb.3.2/II.) und fluoreszenzmikroskopischen (Abb.3.2/III.) Einzelaufnahmen einer isolierten Kardiomyozyte zeigen deutlich die charakteristische, sarkomere Struktur der Herzmuskelzelle<sup>121</sup>. Das Protein sarkomeres  $\alpha$ -Aktinin (grün) und die Zellkerne (blau) wurden mittels Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt. Neben der sarkomeren Struktur ist auch das Vorhandensein zweier Zellkerne charakteristisch für die Zellart<sup>122</sup>. Im Western Blot konnten die die Kardiomyozyten kennzeichnenden Proteine sarkomeres  $\alpha$ -Aktinin, kardiales Troponin T und *heavy chain cardiac* Myosin nachgewiesen werden (Abb.3.2/IV.)<sup>121</sup>. Die isolierten Zellen konnten als Kardiomyozyten identifiziert werden. Es zeigte sich eine reine Kardiomyozytenpopulation und ein Überleben der Zellen von rund 80% (Abb.3.2/I.). Lebende Zellen weisen eine stäbchenförmige Struktur auf, wohingegen sich tote Zellen einrollen.



**Abb.3.2: Charakterisierung muriner Kardiomyozyten**

(I./II.) Durchlichtmikroskopische Aufnahmen isolierter muriner Kardiomyozyten (Vergrößerung 5x/50x) (III.) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer murinen Kardiomyozyte (Zellkern/DAPI/blau; sarkomeres  $\alpha$ -Aktinin/FITC/grün). (IV.) Analyse der charakteristischen Proteine sarkomeres  $\alpha$ -Aktinin, kardiales Troponin T und *heavy chain cardiac* Myosin in, aus einem Mausherz, isolierten Kardiomyozyten, mittels Western Blot.

### 3.1.2 Expression im Verlauf der I/R

Verschiedene Zellarten zeigen unter Hypoxie/Reoxygenierung eine Steigerung der BNIP3-Expression<sup>97–99,118</sup>. Daher wurde im Folgenden untersucht, welche Auswirkung der myokardiale I/R-Schaden auf die Expression des Proteins BNIP3 im Herzen hat. Da es bereits in der frühen Phase der Reperfusion zu einem Sterben von Kardiomyozyten kommt<sup>18</sup>, wurde hier auf die Expression von BNIP3 in diese Phase eingegangen. Es wurde ein *in vivo* Mausmodell verwendet. Über eine Ligation der linken Koronararterie wurde eine 30minütige myokardiale Ischämie erzeugt. Durch die Lösung der Ligation im Anschluss wurde eine Reperfusion des Herzens ausgelöst. Die Herzen wurden direkt nach der 30minütigen Ischämie, ohne Auslösung einer Reperfusion und nach 5minütiger und 4ständiger Reperfusion entnommen. Über eine *real-time* qRT-PCR wurde das mRNA-Level und mittels reduziertem Western Blot die Proteinkonzentration von BNIP3 analysiert. Als Kontrolle dienten basale, nicht behandelte, Herzen.

Sowohl das *Bnip3*-mRNA-Level (Abb.3.3), als auch die BNIP3-Proteinkonzentration (Abb.3.4) zeigten sich im Verlauf der I/R konstant. Im Western Blot wurde die Konzentration der BNIP3-Monomere bei 30kDa (Abb.3.4/I.), -Dimere bei 60kDa (Abb.3.4/II.) und des gesamten Proteins (Abb.3.4/III.) im Einzelnen analysiert. Es

zeigten sich auch in den Einzelanalysen keine signifikanten Veränderungen der Proteinkonzentration. Es scheint so, als würde BNIP3 im myokardialen I/R-Schaden nicht über eine gesteigerte Expression reguliert, sondern über eine Regulation der Aktivität des Proteins. Die Aktivierung von BNIP3 könnte z.B. über eine Translokation oder eine posttranslationale Modifikation des Proteins ablaufen.

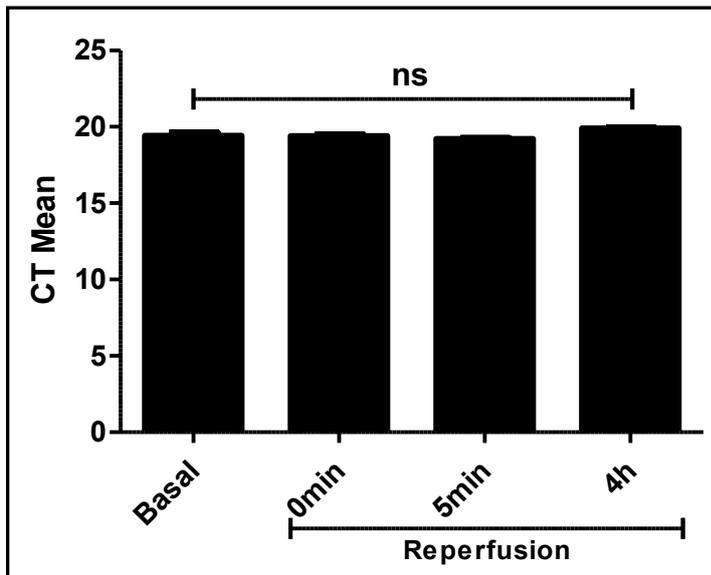
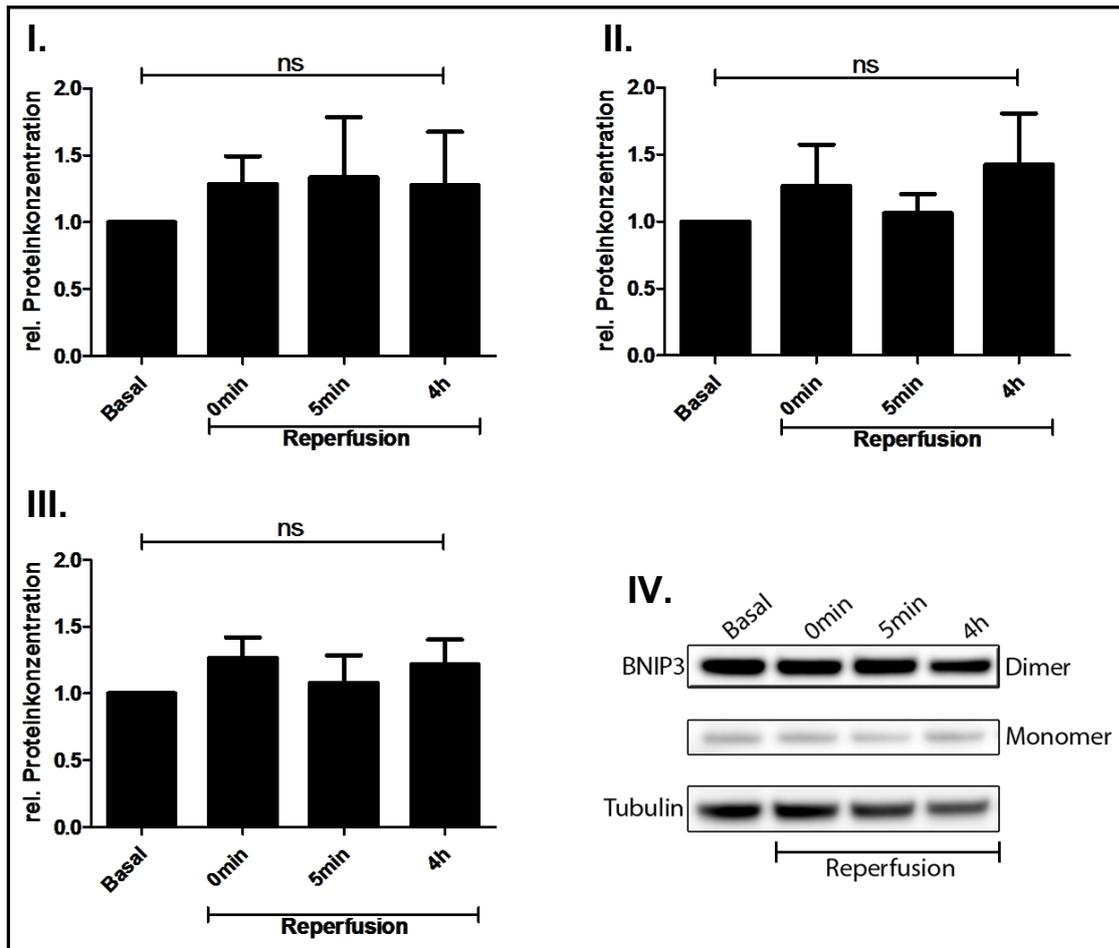


Abb. 3.3: mRNA-Level von *Bnip3* im Verlauf der I/R

Mittels *real-time* quantitativer RT-PCR wurde das *Bnip3*-mRNA-Level in murinen Herzen unter basalen Bedingungen und nach 30minütiger Ischämie ohne und mit anschließender 5minütiger und 4stündiger Reperfusion untersucht. Als Kontrolle wurde die mRNA 18s verwendet. Aufgetragen wurde der Mittelwert der einzelnen *cycle thresholds* (CT Mean). Der CT Mean gibt die Anzahl der Zyklen an, die benötigt werden um ein Fluoreszenzsignal zu erhalten, welches über einem bestimmten Grenzwert (threshold) liegt. Die Signifikanz wurde mit *One-Way ANOVA*, *post hoc* Bonferroni berechnet,  $n=5$ , SD.

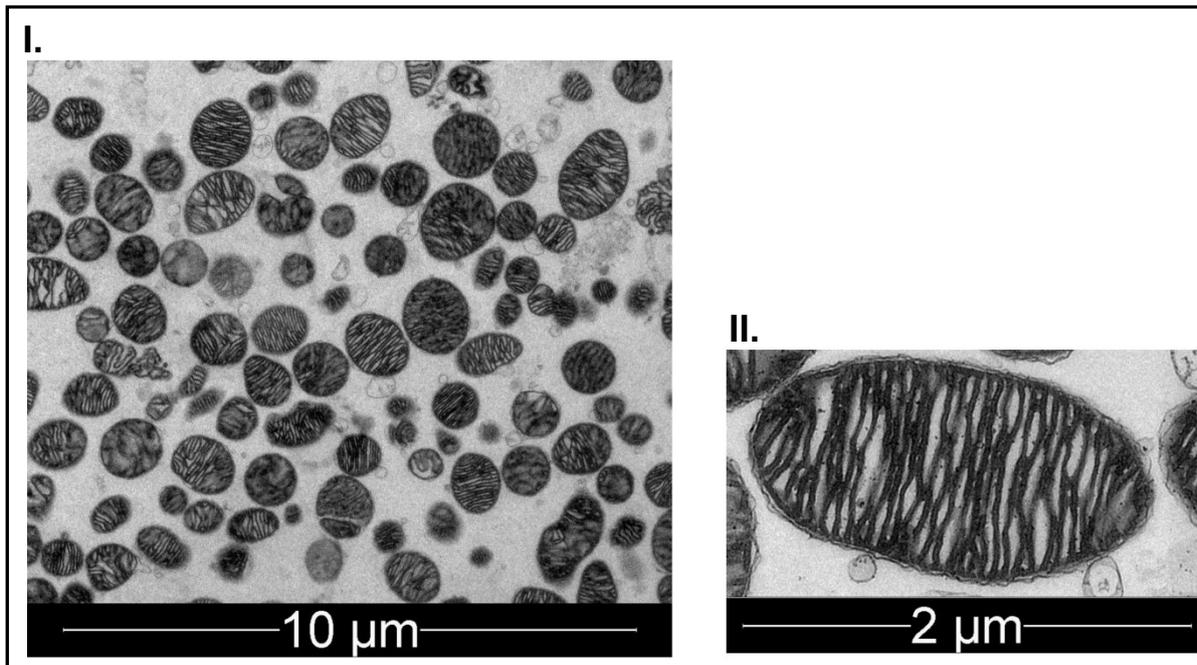


**Abb.3.4: Proteinkonzentration von BNIP3 im Verlauf der I/R**

Western Blot Analyse von BNIP3 in murinen Herzen unter basalen Bedingungen und nach 30minütiger Ischämie ohne und mit anschließender 5minütiger und 4stündiger Reperfusion. Zu sehen ist die relative Proteinkonzentration des BNIP3-Monomers (I.), -Dimers (II.) und des gesamten Proteins (III.). Als Ladekontrolle wurde  $\alpha$ -Tubulin verwendet. Die relative Proteinkonzentration setzt sich zusammen aus dem Verhältnis der Intensität der Banden (mittels ImageJ analysiert) von BNIP3/ $\alpha$ -Tubulin. Die Signifikanz wurde mit *One-Way ANOVA, post hoc Bonferroni* berechnet,  $n=9$ , SD. (IV.) Exemplarischer Western Blot.

### 3.2 Lokalisation von BNIP3

Da die Lokalisation eines Proteins bei seiner Funktion von entscheidender Bedeutung sein kann<sup>44</sup>, wurde diese für BNIP3 unter basalen Bedingungen in murinen Herzzellen analysiert. Hierzu wurden zunächst Mitochondrien und Zytoplasma aus murinen Herzen isoliert und im Folgenden die Mitochondrien in äußere und innere Mitochondrienmembran fraktioniert. Die Reinheit und Intaktheit der isolierten Mitochondrienfraktion konnte mittels Elektronenmikroskopie bestätigt werden (Abb.3.5).



**Abb.3.5: Charakterisierung von Mitochondrien**

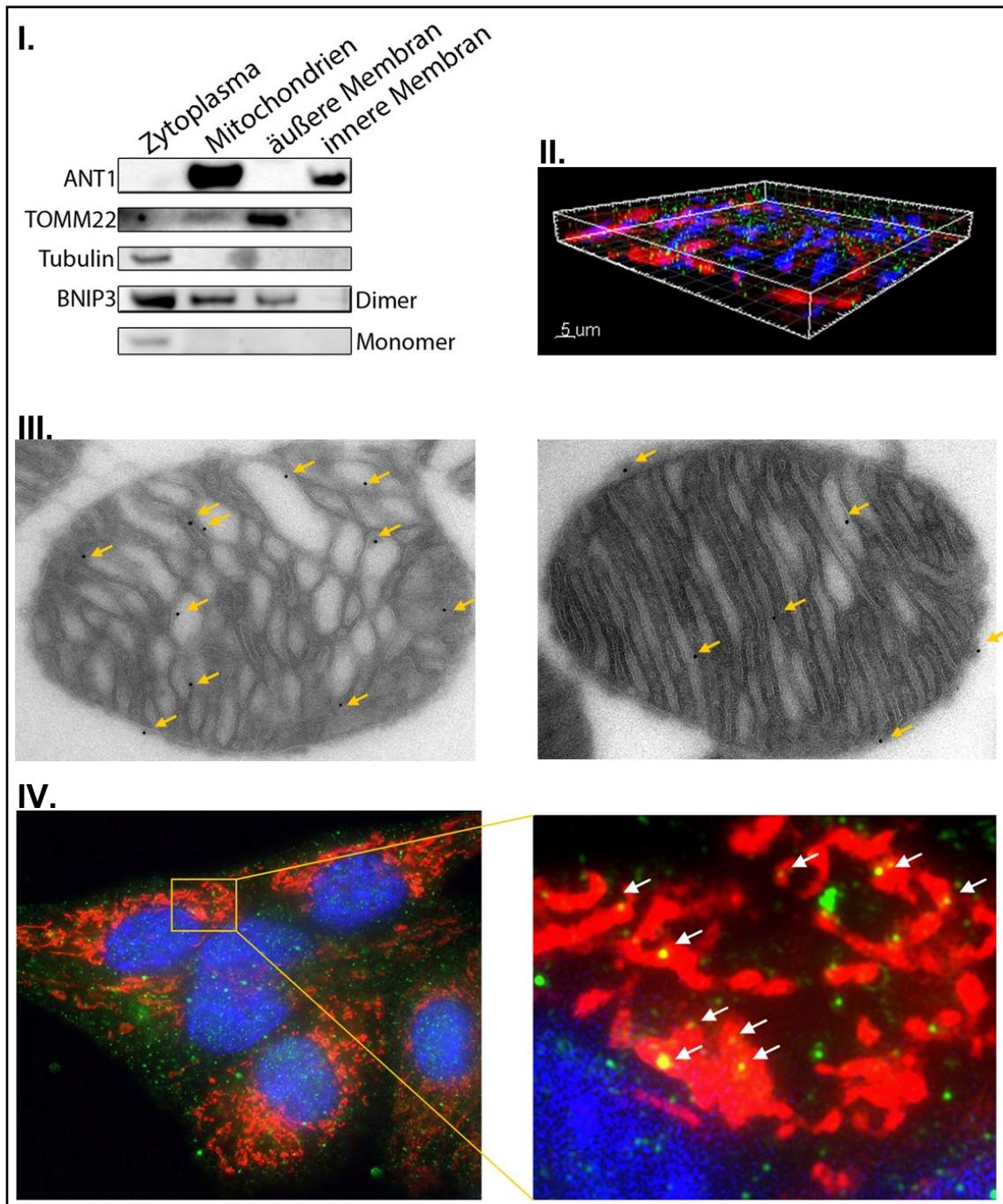
Elektronenmikroskopische Aufnahmen von, aus murinen Herzen isolierten, Mitochondrien. Vergrößerung: (I.) 1.200-fach, (II.) 4.800-fach. Die Aufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit Ph.D. Ilkka Miinalainen im Biocenter Electron Microscopy der Universität von Oulu, Finnland angefertigt. Die Arbeitsteilung gliederte sich dabei wie unter 2.10 beschrieben.

#### Fraktionierung der Mitochondrien

Zur Fraktionierung der Mitochondrien wurde ein Protokoll etabliert, welches auf der Abspaltung der äußeren Membran mittels Digitonin und der inneren Membran mittels Natriumcarbonat beruht (siehe 2.7)<sup>123,124</sup>. Um den Erfolg der Fraktionierung zu untersuchen, wurden die Fraktionen über Western Blot auf für die Organellbestandteile spezifische Proteine hin untersucht (Abb.3.6/I.). Hierbei charakterisiert  $\alpha$ -Tubulin das Zytoplasma, ANT1 die innere und TOMM22 die äußere Mitochondrienmembran. Es konnte eine vollständige Trennung der äußeren von der inneren Mitochondrienmembran erreicht werden.

Daraufhin wurde das Vorhandensein von BNIP3 in den einzelnen Fraktionen untersucht. BNIP3 wird zwar als mitochondriales Protein beschrieben<sup>107,112</sup>, konnte hier jedoch neben den Mitochondrien auch im Zytoplasma der Zellen nachgewiesen werden (Abb.3.6/I.). Im Zytoplasma liegt BNIP3 unter reduzierenden Bedingungen in seiner monomeren (30kDa) und dimeren (60kDa) Form vor. In den Mitochondrien dagegen konnte BNIP3 nur in einer DTT-resistenten, dimeren Form detektiert werden. Die Fraktionierung der Mitochondrien zeigte außerdem, dass BNIP3 auf der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Auf der inneren Membran liegt das Protein

dagegen nicht vor. Dies konnte mittels Elektronenmikroskopie von isolierten murinen Mitochondrien aus den Herzen bestätigt werden. Auch hier zeigt sich eine mitochondriale Lokalisierung von BNIP3 auf der äußeren Membran (gelbe Pfeile) (Abb.3.6/III.). Murines Herzgewebe wurde zudem mittels konvokaler Fluoreszenzmikroskopie (ElyraPS/Zeiss) untersucht. Dabei erfolgte eine Färbung des Zellkerns über DAPI (blau), der Mitochondrien mittels Mito-Tracker (rot) und BNIP3 mit AF488 (grün). Es wurde eine Z-Stack Analyse durchgeführt. Hierbei wurde ein Bereich von  $x=84,94\mu\text{m}$ ,  $y=84,94\mu\text{m}$  und  $z=11\mu\text{m}$  mikroskopiert. Entlang der Z-Achse wurden 12 Aufnahmen im Abstand von  $0,9\mu\text{m}$  gemacht. Im Anschluss wurde mittels IMARIS ein 3D-Modell erstellt (Abb.3.6/II.). Die zytoplasmatische und mitochondriale Lokalisation von BNIP3 konnte bestätigt werden. Auch in HL-1 Zellen (Abb.3.6/IV.) zeigte sich das gleiche Ergebnis. Es konnten deutlich co-lokalisiert von BNIP3 mit Mitochondrien (gelb, weiße Pfeile) verzeichnet werden.



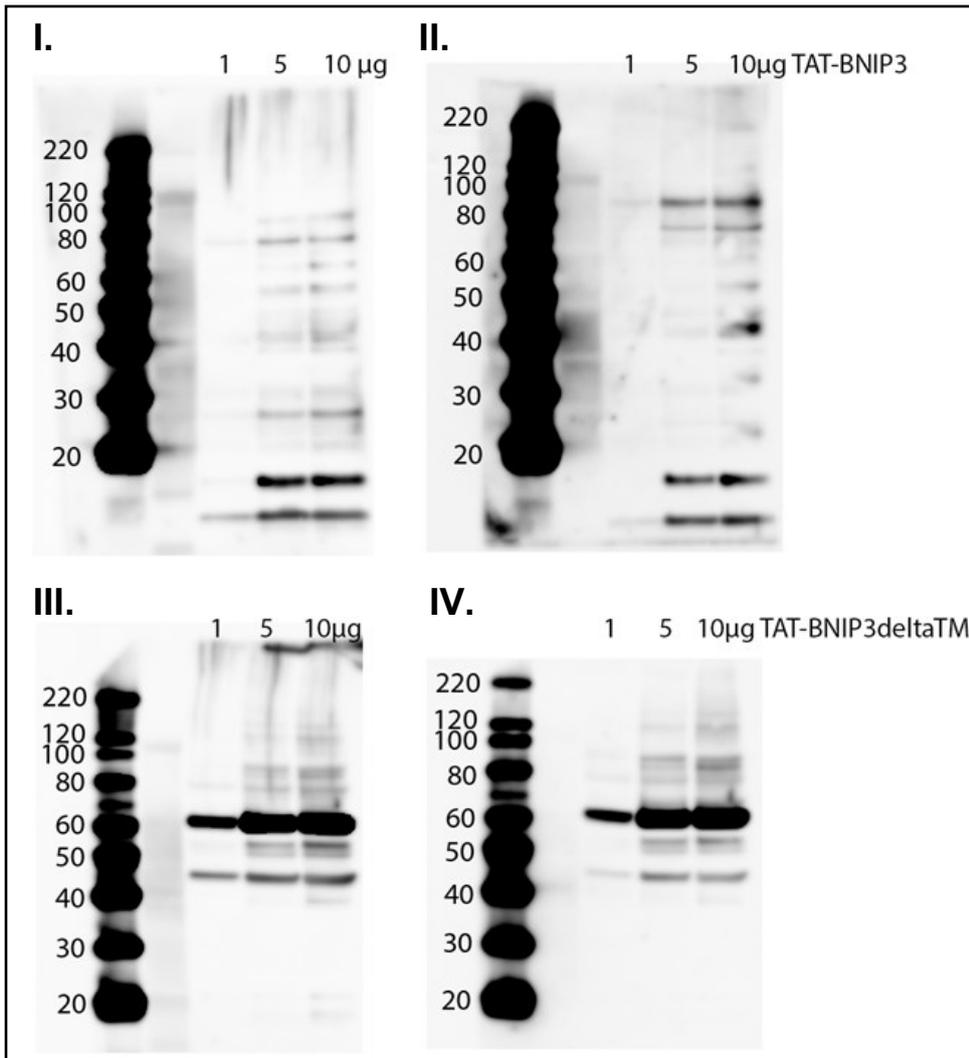
**Abb.3.6: Lokalisation von BNIP3**

(I.) Western Blot Analyse von BNIP3 im Zytoplasma, Mitochondrien, äußerer und innerer Mitochondrienmembran aus murinen Herzen unter basalen Bedingungen. (II./IV.) Konvokale Fluoreszenzmikroskopie (63-fache Vergrößerung) eines murinen Herzschnittes unter basalen Bedingungen (Z-Stack Analyse mit anschließender Erstellung eines 3D Bildes mittels Imaris) (II.) und HL-1 Zellen (IV.). Die Färbung des Zellkerns erfolgte mit DAPI (blau), BNIP3 wurde mit AF488 gelabelt (grün) und die Mitochondrien mittels Mito-Tracker angefarbt (rot). Es ist eine Co-Lokalisation von BNIP3 mit Mitochondrien zu erkennen (gelb/weiße Pfeile). (III.) Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mitochondrien, isoliert aus einem Mausherz, in 4.800-facher Vergrößerung. BNIP3 wurde mittels Goldpartikel-gelabelter Antikörper angefarbt (gelbe Pfeile).

## 3.3 TAT-Fusionsproteine

### 3.3.1 Charakterisierung

Um den Einfluss von BNIP3 im I/R-Schaden untersuchen zu können, wurde dessen Proteinaktivität mittels TAT-BNIP3 $\Delta$ TM inhibiert. Hierbei handelt es sich um ein Fusionsprotein. Dieses besteht aus der TAT-Sequenz des HI-Virus, welche das Eindringen des Proteins in die Zelle ermöglicht<sup>119</sup> und der Aminisäuresequenz einer Deletionsmutante von BNIP3. Der Mutante fehlt die Transmembrandomäne. Das Fusionsprotein oligomerisiert mit endogenem BNIP3. Aufgrund der fehlenden Transmembrandomäne verhindert dies die Integration des Komplexes in die äußere Mitochondrienmembran<sup>118</sup>. Da sich die mitochondriale BNIP3-Lokalisation als essentiell für die Zelltodaktivität des Proteins erwies<sup>106</sup>, kann diese so inhibiert werden. Das Fusionsprotein wurde 5min vor der Ischämie linksventrikulär ins Herz injiziert (2nmol/50 $\mu$ l). Neben diesem Fusionsprotein wurde noch mit einem weiteren gearbeitet. Dies ist TAT-BNIP3, welches die TAT-Sequenz gekoppelt an die gesamte BNIP3-Proteinsequenz (*full-length*) darstellt. Nach der Herstellung der Fusionsproteine (2.9) wurden diese zur Charakterisierung mittels Western Blot unter reduzierenden (Abb.3.7/I.+III.) und unter nicht-reduzierenden (Abb.3.7/II.+IV.) Bedingungen untersucht. Dabei zeigte sich kein Unterschied zwischen den reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen. Die Oligomerisierung der Fusionsproteine zeigte sich DTT-resistent. TAT-BNIP3 liegt als Monomer (30kDa), Dimer (60kDa) und in höheren Oligomeren im gleichen Verhältnis vor. TAT-BNIP3 $\Delta$ TM dagegen bildet hauptsächlich Dimere aus und konnte nicht in der monomeren Form detektiert werden.



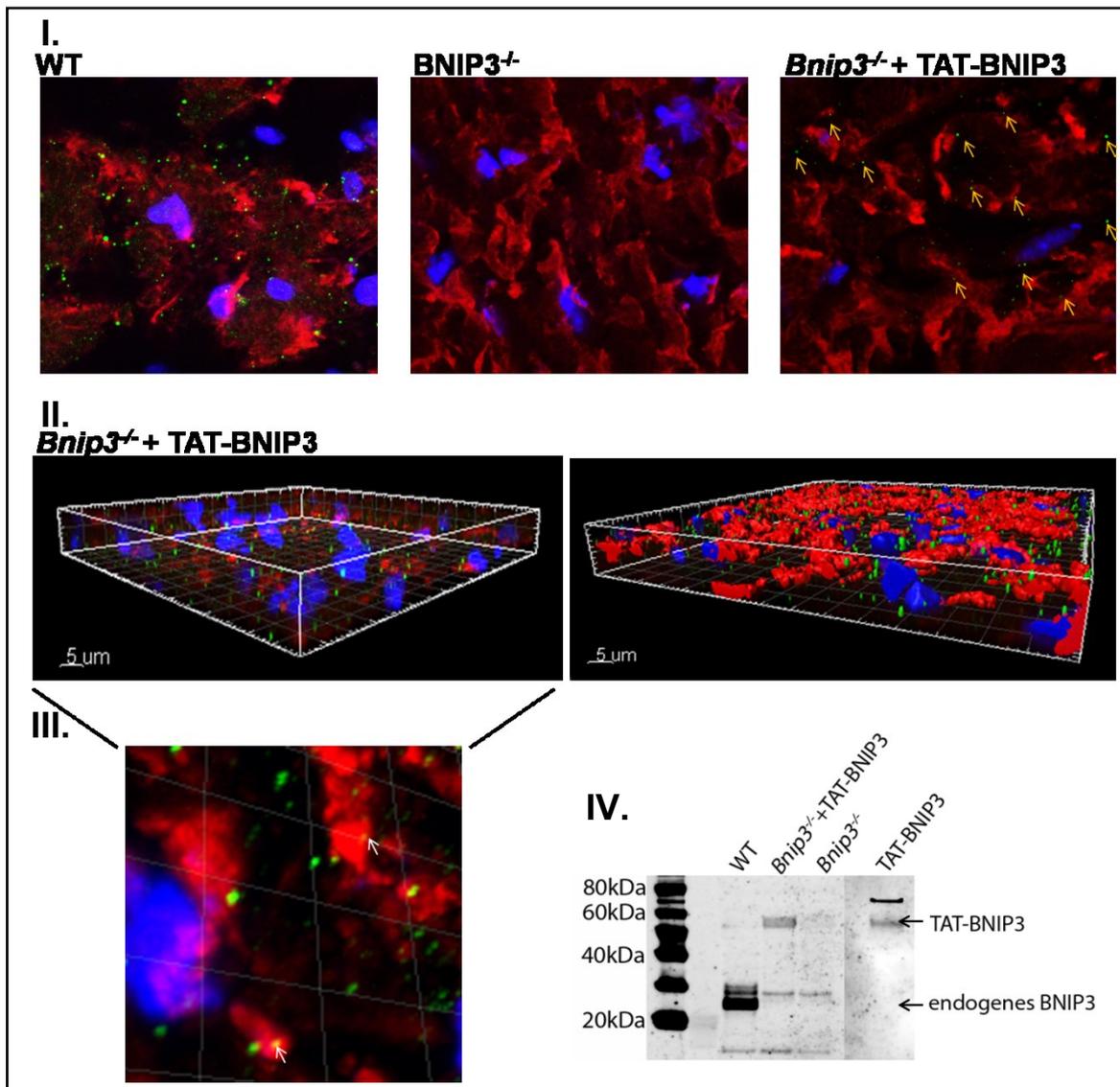
**Abb.3.7: Charakterisierung der Fusionsproteine**

Western Blot Analyse. Es wurden je 1, 5 und 10 $\mu$ g des Proteins TAT-BNIP3 (I./II.) und TAT-BNIP3 $\Delta$ TM (III./IV.) aufgetrennt unter Zugabe von 50mM DTT (I./III.) und ohne Zugabe von DTT (II./IV.).

### 3.3.2 Aufnahme von TAT-BNIP3 in Herzzellen

Die Aufnahme des Fusionsproteins über Kardiomyozyten wurde anhand der *Bnip3*<sup>-/-</sup> - Maus getestet. Es erfolgte eine 30minütige Ischämie mit 10minütiger Reperfusion. Das Fusionsprotein wurde, wie in allen weiteren Versuchen, 5min vor Ischämie linksventrikulär ins Herz injiziert. Im Anschluss wurde das Vorhandensein des BNIP3-Proteins in den Kardiomyozyten der Herzen untersucht. Es erfolgte eine Analyse mittels Western Blot (Abb.3.8/IV.). Wohingegen die *Bnip3*<sup>-/-</sup>-Maus kein BNIP3 aufwies, konnte das TAT-BNIP3-Protein in der Kardiomyozytenpopulation der *Bnip3*<sup>-/-</sup> - Maus nach der Zugabe von TAT-BNIP3 vor I/R nachgewiesen werden. Das Protein zeigte sich in den Kardiomyozyten, genau wie rekombinant aufgetragen, in einer dimeren

Form bei 60kDa. Dieses Ergebnis konnte mittels konvokaler Fluoreszenzmikroskopie von Herzschnitten bestätigt werden. Die *Bnip3*<sup>-/-</sup>-Maus zeigte im Vergleich zu der WT-Maus kein BNIP3-Protein. Nach Injektion des Fusionsproteins vor der Ischämie zeigte auch die defiziente Maus BNIP3-Protein in den Zellen (gelbe Pfeile) (Abb.3.8/I.). Um sicher zu gehen, dass die Zellen TAT-BNIP3 wirklich aufgenommen haben und das Protein nicht an der Oberfläche der Zellen hängt, wurde zudem eine Z-Stack Analyse des Herzgewebes der *Bnip3*<sup>-/-</sup>-Maus, welcher vor I/R TAT-BNIP3 injiziert wurde, angefertigt. Hierzu wurde ein Bereich von x=84,94µm, y=84,94µm und z=14µm aufgenommen. Entlang der Z-Achse wurden 15 Aufnahmen mit einem Abstand von 0,9µm mikroskopiert, was die anschließende Modulation eines 3D-Modells ermöglichte (Abb.3.8/II.). Dabei zeigte sich deutlich, dass sich TAT-BNIP3 nach der I/R in den Zellen des Herzens befand. Das Protein konnte nah an den Mitochondrien assoziiert, bzw. teilweise mit den Mitochondrien co-lokalisiert nachgewiesen werden (weiße Pfeile) (Abb.3.8/III.). Dies zeigt, dass die TAT-Fusionsproteine in die Zellen aufgenommen werden und intrazellulär agieren können.



**Abb. 3.8: Nachweis von TAT-BNIP3**

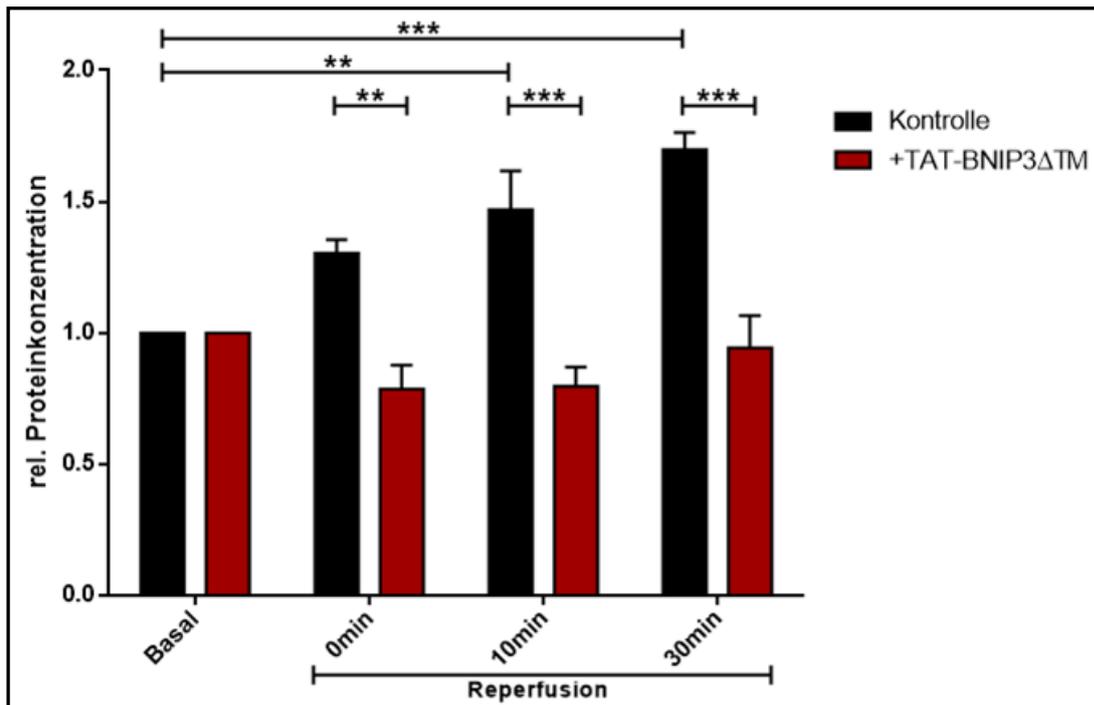
Wildtyp (WT)-Mäuse wurden im Vergleich zu *Bnip3*<sup>-/-</sup>-Mäusen nach 30minütiger Ischämie und folgender 10minütiger Reperfusion ± Injektion von TAT-BNIP3 5min vor Ischämie mittels konvokaler Fluoreszenzmikroskopie von Herzschnitten (I-III.) und Western Blot der Kardiomyozyten (IV.) analysiert. Die Fluoreszenzaufnahmen erfolgten unter 64xfacher Vergrößerung mit dem Mikroskop Elyra PS von Zeiss im Imaging Center Essen. Dabei wurde der Zellkerne/DAPI in blau, die Mitochondrien/Mito-Tracker in rot und BNIP3/AF488 in grün dargestellt. (I.) Aufnahmen einer WT-Maus im Vergleich zu einer *Bnip3*<sup>-/-</sup>-Maus ohne und mit vorheriger TAT-BNIP3 Injektion. Die gelben Pfeile markieren TAT-BNIP3. (II.) Z-Stack Analyse der *Bnip3*<sup>-/-</sup>-Maus, welcher TAT-BNIP3 injiziert wurde. Es wurden 15 Aufnahmen in einem Bereich von 14µm entlang der Z-Achse aufgenommen und mittels anschließender Analyse unter Verwendung des Programms Imaris wurden Bilder in 3D erstellt. (III.) Teilausschnitt der Aufnahme. Die weißen Pfeile zeigen Co-Lokalisationen von TAT-BNIP3 mit Mitochondrien. (IV.) Western Blot Analyse von isolierten Kardiomyozyten aus murinen Herzen.

### 3.4 Translokation von BNIP3

Wie zuvor gezeigt, findet in der frühen Phase der Reperfusion keine Steigerung der Expression von BNIP3 statt (Abb.3.4). Das legt die Vermutung nahe, dass die Funktion des Proteins im myokardialen I/R-Schaden über eine Translokation und/oder posttranslationale Modifikation aktiviert wird. Im Weiteren wurde die Translokation von BNIP3 in einem *in vivo* Mausmodell untersucht. In vorausgegangenen Versuchen zeigte sich, dass BNIP3 Basal im Zytoplasma und in den Mitochondrien lokalisiert ist (Abb.3.6). Zudem scheint die Funktion von BNIP3 mit einer mitochondrialen Lokalisation einher zu gehen<sup>100</sup>. Daher wurde die Proteinkonzentration von BNIP3 in den Mitochondrien im Verlauf der I/R mittels Western Blot untersucht. Isoliert wurden die Zellorganellen aus dem gesamten Herzen der Mäuse Basal, nach 30minütiger Ischämie und nach Ischämie mit anschließender 10- und 30minütiger Reperfusion  $\pm$  BNIP3-Inhibition mittels TAT-BNIP3 $\Delta$ TM.

Es zeigte sich, dass es im Verlauf der I/R und zwar in der frühen Phase der Reperfusion zu einem Anstieg des BNIP3-Levels in den Mitochondrien kommt. Bereits nach einer 10minütigen Reperfusion konnte ein signifikanter Anstieg der relativen Proteinkonzentration normiert auf Basal detektiert werden. Im weiteren Verlauf zeigte sich ein weiterer Anstieg (Abb.3.9) (Basal=1 / 10min Reperfusion=1,5 $\pm$ 0,3 / 30min Reperfusion=1,7 $\pm$ 0,1;  $p=0,0026$ ). Im Verlauf der I/R kommt es in der frühen Phase der Reperfusion zu einer Translokation von BNIP3 zu den Mitochondrien.

Die Inhibition von BNIP3 unter Verwendung des Fusionsproteins TAT-BNIP3 $\Delta$ TM verhindert den Anstieg der BNIP3-Proteinkonzentration in den Mitochondrien vollständig (10min Reperfusion+TAT-BNIP3 $\Delta$ TM=0,8 $\pm$ 0,1 / 30min Reperfusion+TAT-BNIP3 $\Delta$ TM=0,9 $\pm$ 0,2;  $p=0,0084$ ) (Abb. 3.9). Dies untermauert die Theorie, dass die Deletionsmutante die Aktivität von BNIP3 inhibiert, indem die Integration von BNIP3 in die Mitochondrien verhindert wird (3.3).



**Abb.3.9: Translokation von BNIP3 im Verlauf der I/R**

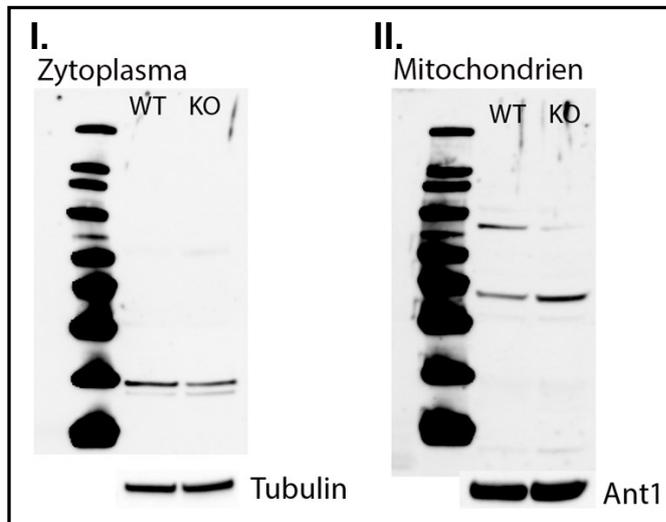
Western Blot Analyse der Proteinkonzentration von BNIP3 in, aus murinen Herzen isolierten, Mitochondrien. Die Mitochondrien wurden Basal, nach 30minütiger Ischämie ohne und mit 10- und 30minütiger Reperfusion  $\pm$  Inhibition von BNIP3 mit 2nmol TAT-BNIP3 $\Delta$ TM isoliert. Die Signifikanz wurde mittels *Two-Way ANOVA, post hoc* Bonferroni berechnet,  $n=3$ , SD. Als Ladekontrolle wurde das mitochondriale Protein ANT1 verwendet. Die relative Proteinkonzentration setzt sich zusammen aus dem Verhältnis der Intensität der Banden von BNIP3/ANT1.

### 3.5 Der Einfluss von BNIP3 auf die Translokation von BAX

Wolter *et al.* konnten 1997 *in vitro* zeigen, dass es im Verlauf der Apoptose zu einer Translokation von BAX zu den Mitochondrien kommt<sup>44</sup>. Ob diese Translokation auch *in vivo* im myokardialen I/R-Schaden stattfindet und inwieweit BNIP3 dabei eine Rolle spielt, wurde im Folgenden untersucht.

Zunächst wurde dazu die Lokalisation von BAX unter basalen Bedingungen in einer WT-Maus gegenüber einer *Bnip3*<sup>-/-</sup>-Maus mittels Western Blot analysiert. Dabei zeigte sich im Zytoplasma der Herzzellen der beiden Mäuse kein Unterschied (Abb.3.10/I.). Hier konnte jeweils die monomere BAX-Form des Proteins (28kDa) nachgewiesen werden. In den Mitochondrien dagegen lag das BAX-Protein nicht als Monomer vor. Die WT-Maus zeigte sowohl die dimere Form des Proteins (50kDa), als auch ein höheres Oligomer bei 80kDa. In der *Bnip3*<sup>-/-</sup>-Maus dagegen konnte in

den Mitochondrien hauptsächlich die dimere Form und kaum das 80kDa Oligomer von BAX detektiert werden (Abb.3.10/II.).



**Abb.3.10: Proteinkonzentration von BAX im Zytoplasma und Mitochondrien**

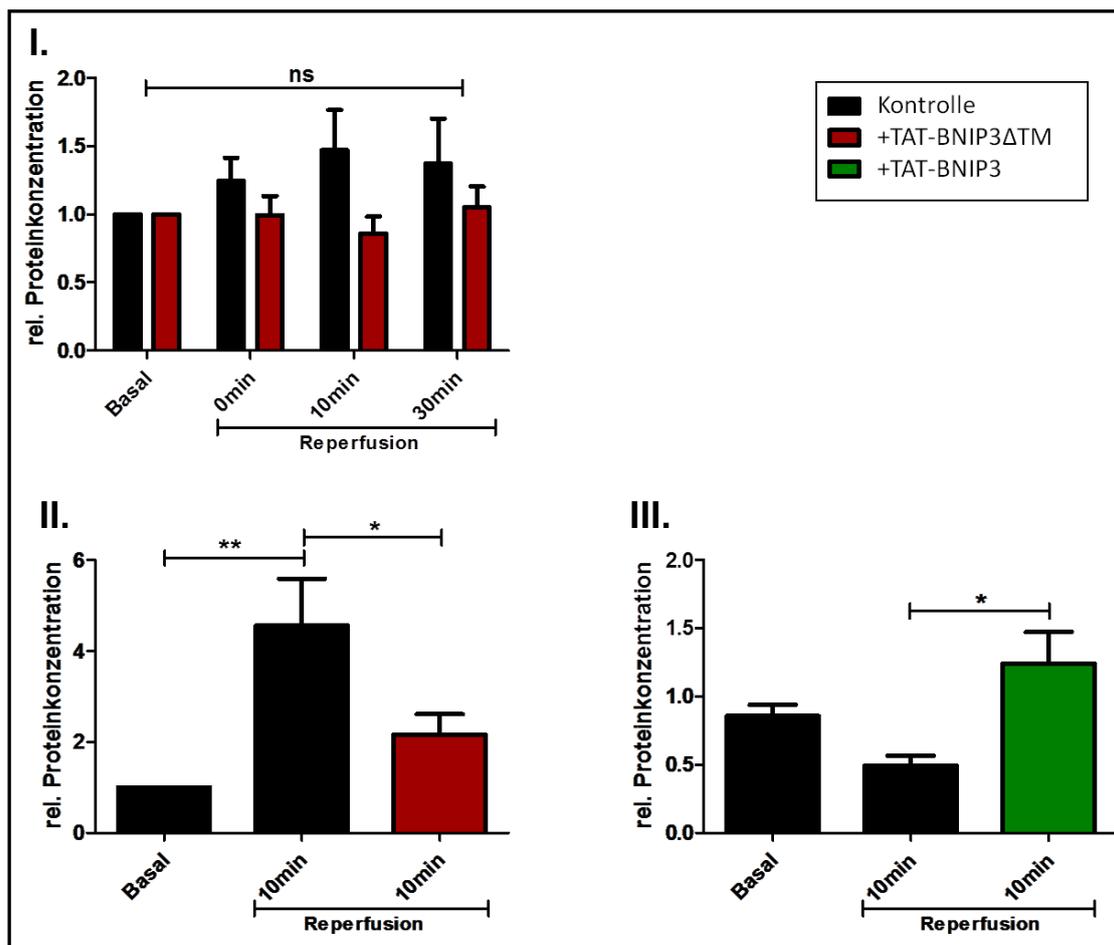
Western Blot Analyse des BAX-Proteins im Zytoplasma (I.) und Mitochondrien (II.) aus murinen, Wildtyp, im Vergleich zu *Bnip3*-defizienten, Herzen unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Als Ladekontrollen wurden  $\alpha$ -Tubulin (Zytoplasma) und Ant1 (Mitochondrien) verwendet. [WT=Wildtyp; KO=*Bnip3*<sup>-/-</sup>-Maus]

Um den Einfluss der I/R auf die Translokation von BAX zu untersuchen, wurde ein *in vivo* Mausmodell mit 30minütiger Ischämie ohne und mit 10- und 30minütiger Reperfusion verwendet. Um die Rolle von BNIP3 dabei untersuchen zu können, wurde BNIP3 über Zugabe von TAT-BNIP3 $\Delta$ TM inhibiert. Nach der I/R wurden die Mitochondrien aus dem gesamten Herzen isoliert und die Proteinkonzentration von BAX mittels Western Blot analysiert. Es zeigte sich hier ein tendenzieller Anstieg des BAX-Proteins in den Mitochondrien (Abb. 3.11/I.). Unter Analyse der gesamten Mitochondrien der Herzen konnte jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Daher wurde in einem weiteren Versuchsansatz gezielt die Konzentration von BAX in Mitochondrien aus dem durch die I/R betroffenen Bereich des Herzens, die AAR, untersucht. Dazu wurde nach der Reperfusion die Ligation wieder geschlossen und *in vivo* über die Arteria carotis Evansblue-Lösung injiziert. Dies ermöglichte nach Entnahme des Herzens eine Trennung der unbetroffenen (blauen) von den betroffenen (ungefärbten) Arealen. Hier wurden die Zeitpunkte Basal gegen 30min Ischämie und folgender 10min Reperfusion  $\pm$  TAT-BNIP3 $\Delta$ TM untersucht.

In der AAR konnte in der frühen Phase der Reperfusion ein signifikanter Anstieg der BAX-Proteinkonzentration in den Mitochondrien nachgewiesen werden. Es kommt

bereits in den ersten 10min der Reperfusion zu einer Translokation von BAX. Interessanterweise führte die Inhibition von BNIP3 zu einer signifikanten Reduktion des Anstiegs an BAX-Protein in den Mitochondrien (Abb.3.11/II.) (Basal=1 / 10min Reperfusion=4,6±3,0 / 10min Reperfusion+TAT-Bnip3ΔTM=2,2±1,4; p=0,002).

Neben der Inhibition von BNIP3 zeigte auch der Verlust des Proteins in der *Bnip3*<sup>-/-</sup>-Maus einen Einfluss auf die Translokation von BAX. Auch hier wurde die BAX-Proteinkonzentration in den Mitochondrien nach 30min Ischämie und folgender 10minütiger Reperfusion in der AAR der *Bnip3*<sup>-/-</sup>-Maus untersucht (Abb.3.11/III.). Wie bei der Inhibition des BNIP3-Proteins zuvor, zeigte sich auch hier eine signifikante Reduktion der BAX-Translokation. Die Injektion des full-length Fusionsproteins TAT-BNIP3 unter Verwendung einer *Bnip3*<sup>-/-</sup>-Maus dagegen erzeugte eine Wiederherstellung der Translokation von BAX zu den Mitochondrien (Basal=0,9±0,1 / 10min Reperfusion=0,5±0,2 / 10min Reperfusion + TAT-BNIP3=1,8±0,6; p=0,0126). Die BAX-Translokation zeigte sich im I/R-Schaden abhängig von BNIP3.



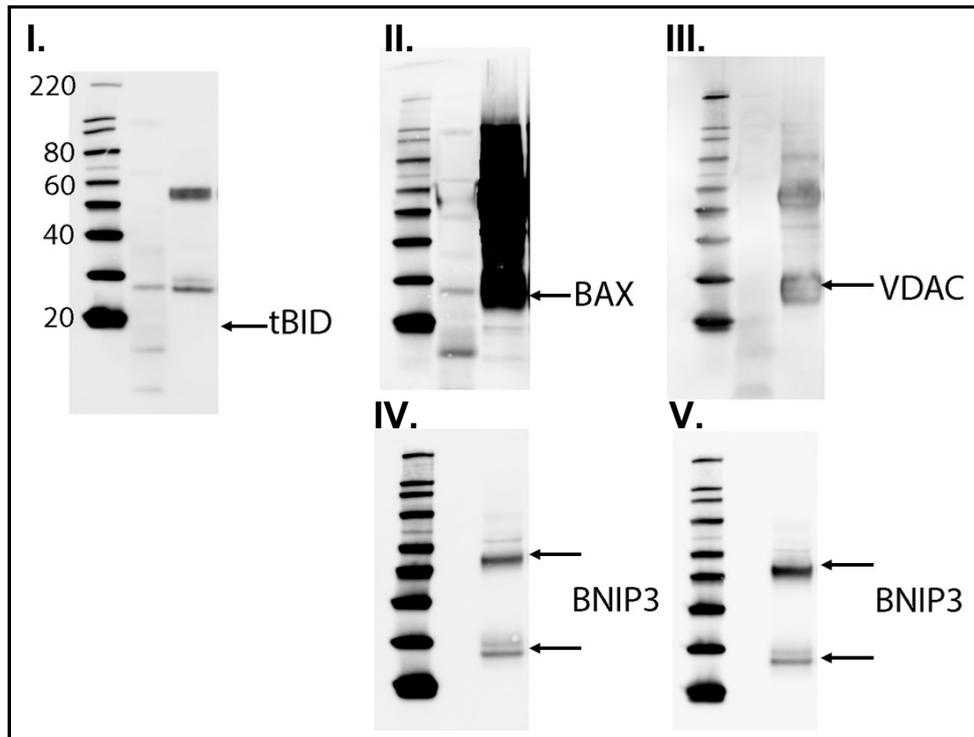
**Abb.3.11: Translokation von BAX im Verlauf der I/R**

(I.) Western Blot Analyse der BAX-Proteinkonzentration in, aus murinen Herzen isolierten, Mitochondrien. Die Mitochondrien wurden Basal, nach 30minütiger Ischämie ohne und mit

10- und 30minütiger Reperfusion isoliert  $\pm$  Inhibition von BNIP3; n=5, SD. (II.) BAX-Proteinkonzentration in Mitochondrien aus der AAR, Basal gegen 30min Ischämie mit 10min Reperfusion  $\pm$  Inhibition von BNIP3; n=5, SD (III.) Analyse der BAX-Proteinkonzentration in Mitochondrien einer *Bnip3*-defizienten Maus, aus der AAR, Basal gegen 30min Ischämie mit 10min Reperfusion  $\pm$  Zugabe von TAT-BNIP3. Die Signifikanz wurde mittels *Two-Way ANOVA*, *post hoc* Bonferroni berechnet, n=10, SD. Als Ladekontrolle wurde das mitochondriale Protein ANT1 verwendet. Die relative Proteinkonzentration setzt sich zusammen aus dem Verhältnis von BAX/ANT1.

### 3.6 BNIP3 interagiert mit BAX und VDAC

Die Aktivierung der BAX-Translokation über BNIP3 verläuft möglicherweise, wie für andere BH3-only Proteine gezeigt<sup>59-61</sup>, über eine Interaktion der beiden Proteine. Um die Interaktion von BNIP3 mit BAX zu untersuchen, wurde eine Co-IP durchgeführt. Dazu wurden die Proteine aus einem gesamten, basalen, murinen Herzen isoliert, über BNIP3-Antikörper-gelabelte Dynabeads BNIP3-Immunkonjugate aus dem Proteingemisch isoliert und mittels Western Blot analysiert. Dazu wurde das Vorhandensein des möglichen Interaktionspartners im Blot untersucht. Es konnte eine Interaktion von BNIP3 mit BAX nachgewiesen werden (Abb.3.12/II.). Diese findet bereits unter basalen Bedingungen statt. Neben BAX wurde zudem die Interaktion von BNIP3 mit VDAC und BID untersucht, da es hier Hinweise in der Literatur gibt<sup>125</sup>. Es konnte eine Interaktion von BNIP3 mit VDAC festgestellt werden (Abb.3.12/III.). Eine Interaktion zwischen BNIP3 und BID fand unter basalen Bedingungen im Herzen nicht statt (Abb.3.12/I.). Im Anschluss wurde eine Gegen-IP, eine IP mit VDAC- und BAX-gelabelten Dynabeads durchgeführt (Abb.3.12/IV.+V.). Das Ergebnis der Interaktion von BNIP3 mit BAX und VDAC konnte bestätigt werden.



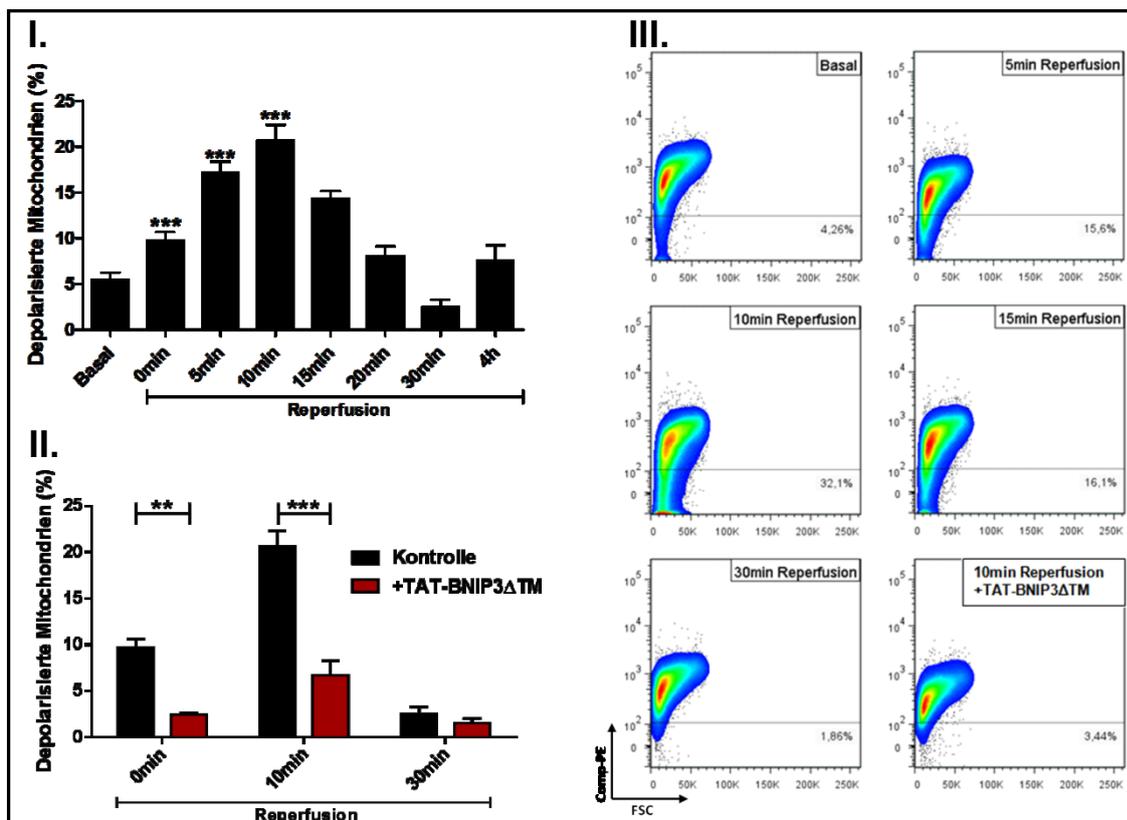
**Abb. 3.12: Interaktionspartner von BNIP3**

Analyse der Interaktion von BNIP3 mit BID (I.), BAX (II.) und VDAC (III.) mittels Co-Immünpräzipitation. Nach Isolation der BNIP3-Konjugate mittels Dynabeads wurden diese über DTT reduziert, in einem Western Blot aufgetrennt und das Vorhandensein des Interaktionspartners über spezifische Antikörper untersucht. Gegen IP: Isolation der BAX- (IV.) und VDAC- (V.) Konjugate und anschließende Analyse von BNIP3 als Kontrolle.

### 3.7 Mitochondriales Membranpotential

Die Konzentration von BNIP3 und BAX in den Mitochondrien steigt signifikant in der frühen Phase der Reperfusion nach myokardialer Ischämie an (Abb.3.9/3.11). Um den Einfluss der gesteigerten Proteinkonzentration auf die Mitochondrien zu untersuchen, wurde das mitochondriale Membranpotential analysiert. Hierzu wurden Mitochondrien aus dem gesamten Herzen von Mäusen isoliert. Es wurden die Zeitpunkte Basal und nach 30minütiger Ischämie ohne und mit 5-, 10-, 15-, 20-, 30-, 240minütiger Reperfusion analysiert. Das Membranpotential wurde mittels JC-1-FACS-Assay gemessen. Dabei zeigte sich bereits nach 5minütiger Reperfusion ein signifikanter Anstieg an depolarisierten Mitochondrien auf  $17 \pm 2\%$ ,  $p < 0,0001$ , welcher weiter anstieg. Nach 10min Reperfusion zeigten  $21 \pm 4\%$ ,  $p < 0,0001$  der gesamten isolierten Herzmitochondrien eine Depolarisierung. Im weiteren zeitlichen Verlauf nimmt die Anzahl an depolarisierten Mitochondrien wieder ab (Abb.3.13/I.). Bereits nach 30min konnte keine gesteigerte Membrandepolarisierung der Mitochondrien

mehr gemessen werden ( $2,5 \pm 2\%$ ). Um den Einfluss von BNIP3 auf die Depolarisierung zu untersuchen, wurde der BNIP3-Anstieg in den Mitochondrien über die Zugabe von TAT-BNIP3 $\Delta$ TM unterdrückt. Hier wurden die Zeitpunkte 30min Ischämie ohne und mit 10 und 30min Reperfusion untersucht. Es zeigte sich, dass die Inhibition von BNIP3 die Depolarisierung der mitochondrialen Membran signifikant reduziert (Abb.3.13/II.) (10min Reperfusion: Kontrolle= $21 \pm 4$  / BNIP3 Inhibition  $7 \pm 4\%$   $p < 0,0001$ ). Im Verlauf der I/R kommt es zu einer BNIP3-abhängigen Depolarisierung der Mitochondrien.



**Abb.3.13: Der Einfluss von BNIP3 auf das mitochondriale Membranpotential**

Analyse der depolarisierten Mitochondrien, isoliert aus murinen Herzen nach I/R, mittels JC-1-FACS-Assay. (I.) Quantitative Analyse der depolarisierten Mitochondrien (%) Basal und nach 30minütiger Ischämie ohne und mit 5-, 10-, 15-, 20-, 30-, 240minütiger Reperfusion. Die Signifikanz zum basalen Wert wurde mittels *One-Way ANOVA, post hoc* Bonferroni berechnet,  $n=5$ , SD. (II.) Depolarisierte Mitochondrien (%) nach 30minütiger Ischämie ohne und mit 10- und 30minütiger Reperfusion  $\pm$  BNIP3-Inhibition über TAT-BNIP3 $\Delta$ TM. Die Signifikanz wurde mittels *Two-Way ANOVA, post hoc* Bonferroni berechnet,  $n=5$ , SD. (III.) Repräsentative Dot Plots gemessener Mitochondrien. Zu sehen ist FSC gegen PE-Fluoreszenz.

### 3.8 Mitochondriale Struktur

Mittels Elektronenmikroskopie wurde parallel zu der Messung der mitochondrialen Depolarisierung auch die Struktur der Mitochondrien analysiert. Nach 30minütiger Ischämie ohne und mit 10- und 30minütiger Reperfusion wurden die Mitochondrien isoliert, fixiert, eingebettet und untersucht. Die Mitochondrien wurden anhand ihrer Struktur in drei Klassen eingeteilt. Es wurde unterschieden zwischen intakten Mitochondrien (gut definierte, dünne, parallel angeordnete Cristaen, welche senkrecht zur Längsachse der Mitochondrien verlaufen) geschwollenen Mitochondrien (gesteigerter Flüssigkeitsanteil und desorganisierte Cristaen) und Mitochondrien mit einer zerstörten Membranintegrität<sup>126</sup>. Jeweils drei Aufnahmen der unterschiedlichen Klassen sind im Folgenden beispielhaft abgebildet (Abb.3.14/I.-III.). Um den Einfluss von BNIP3 auf die mitochondriale Struktur im I/R Schaden analysieren zu können, wurden neben Wildtyp auch Mitochondrien aus *Bnip3*<sup>-/-</sup>-Mäusen klassifiziert.

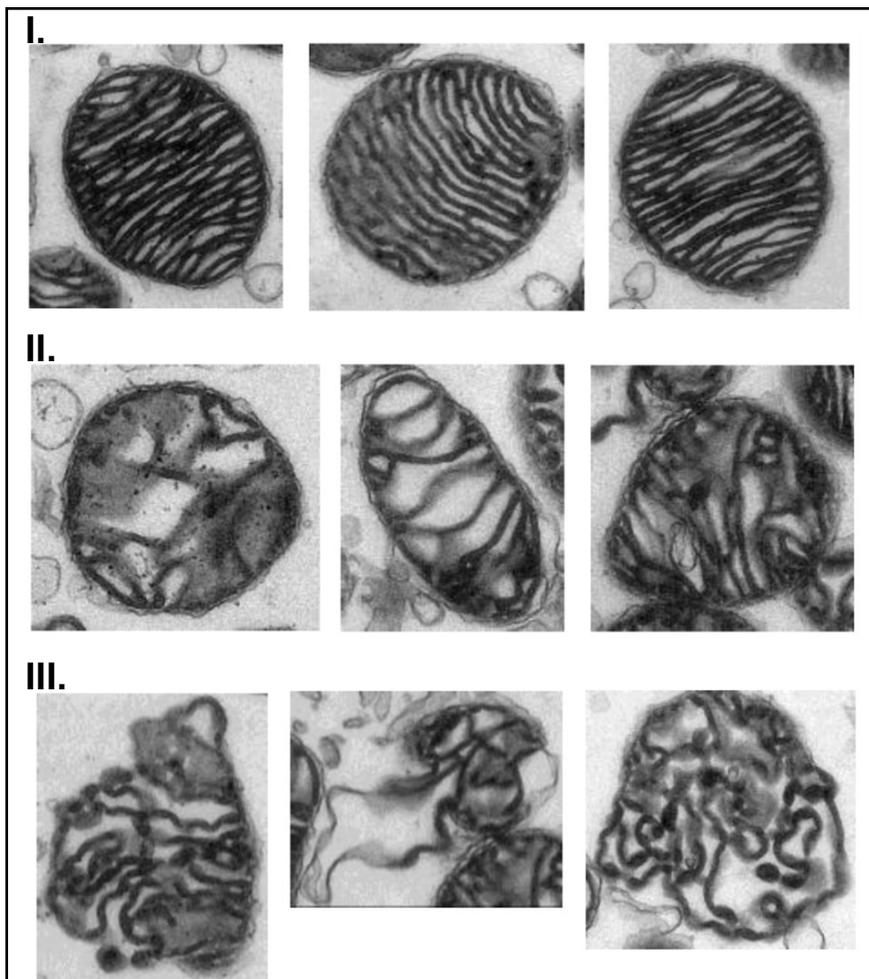
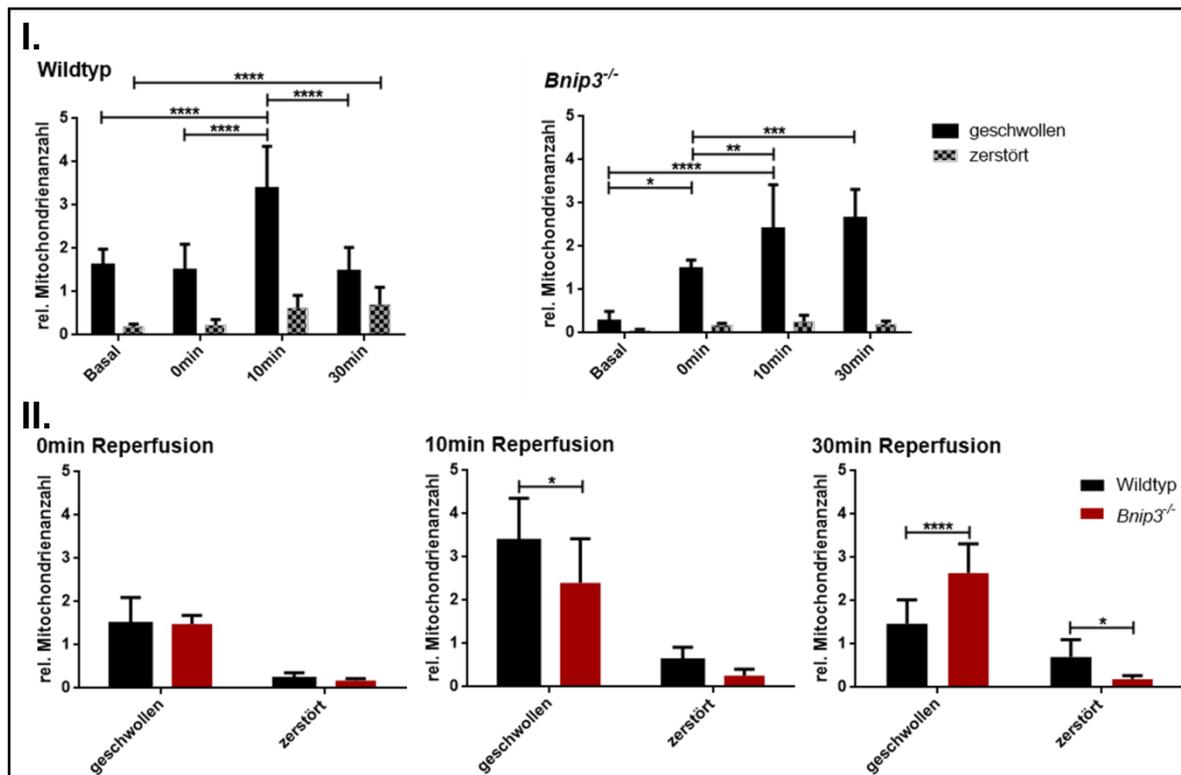


Abb. 3.14: Einteilung der Mitochondrien

Beispiele von elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Anhand ihrer Struktur wurden die Mitochondrien in (I.) intakte Mitochondrien (II.) geschwollene Mitochondrien mit desorganisierter Cristae und (III.) Mitochondrien mit einer zerstörten Membranintegrität eingeteilt.

Zunächst wurden die Mitochondrien aus WT-Mäusen analysiert. Dabei zeigte sich, dass eine 30minütige Ischämie ohne anschließende Reperfusion keinen Einfluss auf die mitochondriale Struktur nimmt. Die Einleitung der Reperfusion führte nach einer 10minütigen Phase zu einem signifikanten Anstieg an geschwollenen Mitochondrien (Basal= $1,6 \pm 0,4$  / 10min Reperfusion= $3,4 \pm 1$ ;  $p < 0,0001$ ). Nach einer 30minütigen Reperfusion konnte keine erhöhte Anzahl an geschwollenen Mitochondrien mehr festgestellt werden. Allerdings wurde hier ein signifikanter Anstieg an zerstörten Mitochondrien verzeichnet (Basal= $0,2 \pm 0,1$  / 30min Reperfusion= $0,8 \pm 0,4$ ;  $p = 0,0219$ ) (Abb.3.15/I.). Auch die *Bnip3*<sup>-/-</sup>-defiziente Maus zeigte nach 10min Reperfusion einen signifikanten Anstieg an geschwollenen Mitochondrien (Basal= $0,3 \pm 0,2$  / 10min Reperfusion= $2,4 \pm 1$ ;  $p < 0,0001$ ), welcher auch noch nach 30min verzeichnet werden konnte. Ein Anstieg an zerstörten Mitochondrien nach 30min Reperfusion konnte hier nicht notiert werden. Es kommt zwar zu einem Anschwellen, nicht aber zu einem Platzen der Mitochondrien in der frühen Phase der Reperfusion einer *Bnip3*<sup>-/-</sup>-Maus (Abb.3.15/I.).

Der Vergleich der Mäuse untereinander (Abb.3.15/II.) zeigte, dass der Anteil an geschwollenen Mitochondrien der *Bnip3*<sup>-/-</sup>-Maus nach 10min Reperfusion im Vergleich zum WT reduziert ist (WT-Maus= $3,4 \pm 1$  / *Bnip3*<sup>-/-</sup>-Maus= $2,4 \pm 1$ ;  $p = 0,0373$ ). Nach 30min Reperfusion wies die *Bnip3*<sup>-/-</sup>-Maus, im Vergleich zum WT, eine Erhöhung der geschwollenen (WT= $1,5 \pm 0,6$  / *Bnip3*<sup>-/-</sup>-Maus= $2,6 \pm 0,7$ ;  $p < 0,0001$ ) und eine Abnahme an zerstörten Mitochondrien auf (WT= $0,8 \pm 0,4$  / *Bnip3*<sup>-/-</sup>-Maus= $0,2 \pm 0$ ;  $p = 0,028$ ).



**Abb.3.15: Mitochondriale Struktur im I/R Schaden**

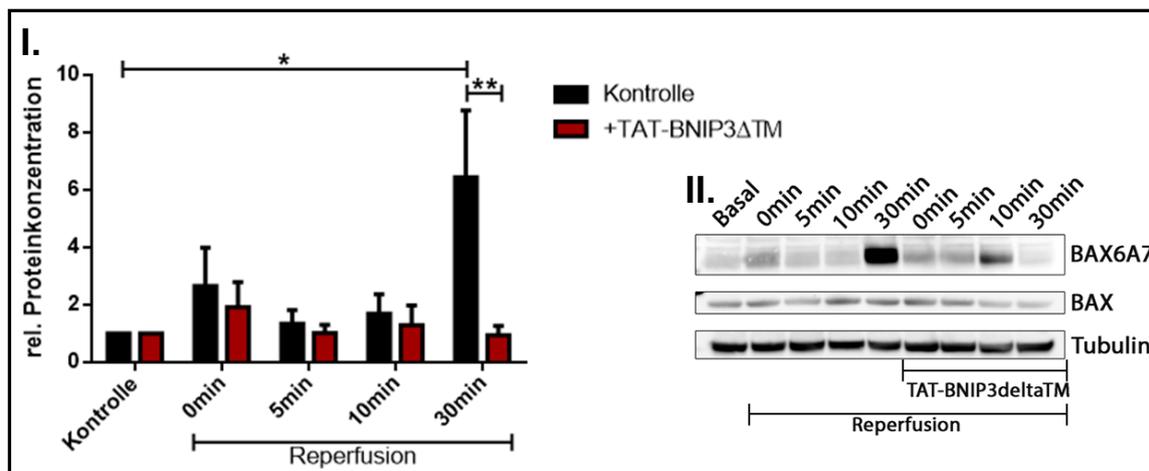
Basal, nach 30minütiger Ischämie ohne und mit 10- und 30min Reperfusion wurden Mitochondrien aus Wildtypen (WT)- und *Bnip3*-defizienten (*Bnip3*<sup>-/-</sup>)-Mäusen isoliert, elektronenmikroskopisch aufgenommen und anhand ihrer Struktur in drei Klassen unterteilt (Abb.3.14). Es wurden je nach Aufnahme 50-109 Mitochondrien ausgezählt und klassifiziert. Insgesamt wurden pro Maus durchschnittlich 10-15 Aufnahmen ausgezählt. Die Mikroskopie der angefertigten Proben erfolgte durch Ph.D. Ilkka Miinalainen im Biocenter Electron Microscopy der Universität von Oulu, Finnland. (I.) Auswertung des Anteils an Mitochondrien der drei Klassen im Verlauf der I/R des Wildtypens und der *Bnip3*-defizienten Maus. Die Signifikanz wurde mit *Two-Way ANOVA, post hoc* Bonferroni berechnet. (II.) Vergleich der WT- mit der *Bnip3*<sup>-/-</sup>-Maus. Hier wurden nur signifikante Unterschiede der Mäuse untereinander aufgezeichnet. Die Signifikanz wurde mit *Two-Way ANOVA, post hoc* Bonferroni berechnet. Relative Mitochondrienzahl=der Anteil an Mitochondrien in der jeweiligen Klasse wurde für jede Aufnahme prozentual berechnet und im Anschluss wurde jeweils die Anzahl an intakten Mitochondrien auf den Wert 1 gesetzt.

## 3.9 BNIP3-induzierte Aktivierung von BAX

### 3.9.1 In gesamten Herzzellen

BNIP3 induziert die Translokation von BAX zu den Mitochondrien (Abb.3.11). Inwieweit BNIP3 hier auch einen Einfluss auf die Aktivierung von BAX hat, wurde im Folgenden untersucht. Dazu wurde ein *in vivo* Mausmodell mit 30min Ischämie ohne und mit 5-, 10-, und 30minütiger Reperfusion ± BNIP3-Inhibition über TAT-BNIP3ΔTM verwendet. Die Aktivität von BAX wurde mittels Western Blot unter Verwendung eines Antikörpers, welcher spezifisch die aktive Form des BAX-Proteins

bindet<sup>44,127</sup> untersucht. Nach 10min Reperfusion konnte keine Veränderung der BAX-Aktivität vermerkt werden. Allerdings zeigte sich nach einer 30minütigen Phase der Reperfusion ein signifikanter Anstieg der aktiven Proteinform von BAX in den Herzzellen (Basal=1 / 30min Reperfusion=6,4±4,7; p=0,0156). Es kommt zu einem späteren Zeitpunkt in der frühen Phase der Reperfusion zu einer Aktivierung des BAX-Proteins, welche sich BNIP3-abhängig zeigte. Die Inhibition von BNIP3 führt zu einer signifikanten Reduktion der Aktivierung (30min Reperfusion+TAT-BNIP3ΔTM=0,9±0,7; p=0,0045) (Abb.3.16/I.).



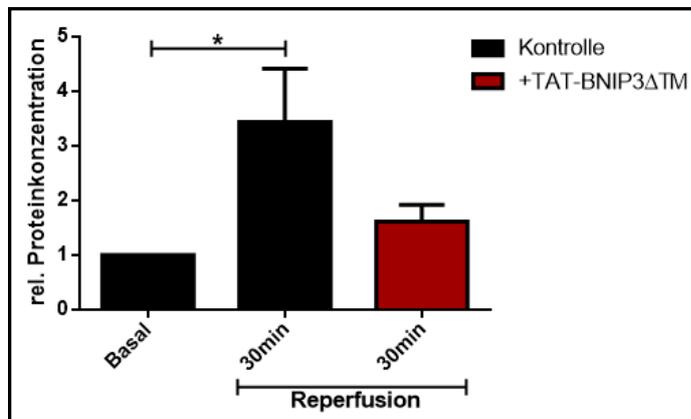
**Abb. 3.16: Aktivierung von BAX im I/R-Schaden**

(I.) Western Blot Analyse von aktivem BAX in murinen Herzen nach 30minütiger Ischämie ohne und mit 5-, 10-, und 30minütiger Reperfusion ± BNIP3-Inhibition mittels TAT-BNIP3ΔTM. Die Signifikanz wurde mittels *Two-Way* ANOVA, *post hoc* Bonferroni berechnet, n=5, SD. Als Ladekontrolle wurde das Protein α-Tubulin verwendet. Die relative Proteinkonzentration setzt sich zusammen aus dem Verhältnis von BAX6A7/BAX (II.) Repräsentativer Western Blot [BAX6A7=aktive Form detektierender Antikörper].

### 3.9.2 Im Zytoplasma

Neben dem Gesamtzelllysate wurde die Aktivierung von BAX auch separiert im Zytoplasma und den Mitochondrien des Herzens untersucht. Hierbei wurde auf die Zeitpunkte Basal und 30minütige Ischämie mit 30minütiger Reperfusion ± BNIP3-Inhibition eingegangen. Im Zytoplasma konnte ein signifikanter Anstieg, welcher über die Inhibition von BNIP3 wieder reduziert werden konnte, von aktivem BAX nach I/R gezeigt werden (Basal=1 / 10min Reperfusion=3,4±2,9; / 10min Reperfusion+TAT-BNIP3ΔTM=1,6±0,9; p=0,0204) (Abb.3.17). Die Messung erfolgte mittels eines Antikörpers, der den N-Terminus des Proteins bindet, welcher nur in der aktiven Form des Proteins zugänglich ist<sup>44,127</sup>. In den Mitochondrien dagegen konnte die

aktive Form von BAX nicht nachgewiesen werden. Das liegt daran, dass mitochondrial lokalisiertes BAX eine Oligomerisierung eingeht, die den N-Terminus des Proteins unzugänglich für den Antikörper macht<sup>43,46</sup>.



**Abb. 3.17: Aktiviertes BAX im Zytoplasma**

Western Blot Analyse von aktivem BAX im Zytoplasma aus murinen Herzen, Basal und nach 30min Ischämie mit folgender 30minütigen Reperfusion  $\pm$  BNIP3-Inhibition mittels TAT-BNIP3 $\Delta$ TM. Die Signifikanz wurde mittels *One-Way* ANOVA, *post hoc* Bonferroni berechnet, n=9, SD. Als Ladekontrolle wurde  $\alpha$ -Tubulin verwendet. Die relative Proteinkonzentration setzt sich zusammen aus dem Verhältnis von BAX/ $\alpha$ -Tubulin.

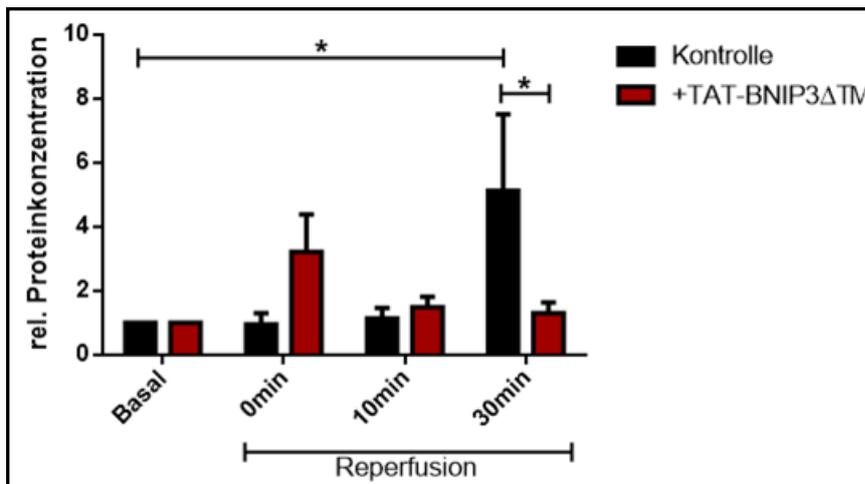
## 3.10 Cytochrom c Freisetzung

### 3.10.1 *In vivo*

Im myokardialen I/R-Schaden kommt es zu einer BNIP3-induzierten Depolarisierung der Mitochondrienmembran (Abb.3.13). Daher wurde im Folgenden untersucht, ob es im Rahmen der mitochondrialen Depolarisierung auch zu einer Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranraum der Mitochondrien in das Zytoplasma kommt und der intrinsische Apoptosesignalweg ausgelöst wird. Dazu wurde ein *in vivo* Mausmodell mit 30min Ischämie ohne und mit 10min und 30min Reperfusion untersucht. Der Einfluss von BNIP3 auf die Freisetzung von Cytochrom c wurde über die Inhibition von BNIP3 mit TAT-BNIP3 $\Delta$ TM analysiert. Nach der I/R wurde dazu das Zytoplasma, aus der zuvor isolierten AAR des Infarktes isoliert und die vorhandene Proteinkonzentration von Cytochrom c mittels Western Blot detektiert (Abb.3.18).

Nach 10min Reperfusion, der Zeitpunkt an dem sich in vorherigen Analysen die höchste Konzentration an depolarisierten Mitochondrien zeigte (Abb. 3.13), konnte kein Anstieg an Cytochrom c im Zytoplasma detektiert werden. Erst nach einer 30minütigen Phase der Reperfusion, der Zeitpunkt zu dem ein signifikanter Anstieg

der aktiven Form von BAX im Zytoplasma gemessen wurde (Abb.3.16), konnte ein signifikanter Anstieg an Cytochrom c detektiert werden (Basal=1 / 10min Reperfusion=1,1±0,7 / 30min Reperfusion=5,1±5,4; p=0,0383). Die Freisetzung des pro-apoptotischen Faktors Cytochrom c wird im myokardialen I/R Schaden nach 30min Reperfusion ausgelöst. Auch hier konnte ein Einfluss von BNIP3 verzeichnet werden. Die Inhibition des BNIP3-Proteins führte zu einer signifikanten Reduktion der Freisetzung von Cytochrom c ins Zytoplasma in den Herzzellen im I/R Schaden (30min Reperfusion+TAT-BNIP3ΔTM=1,3±0,8; p=0,0359).



**Abb. 3.18: Freisetzung von Cytochrom c im myokardialen I/R-Schaden**

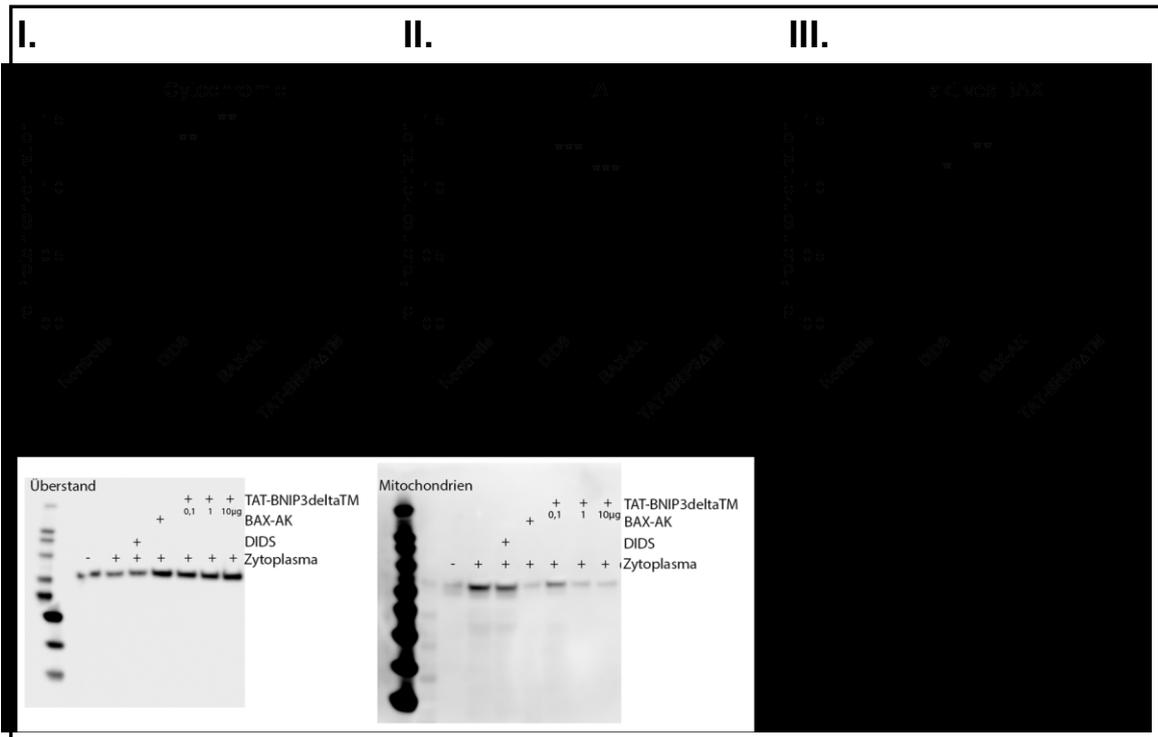
Western Blot Analyse von Cytochrom c im Zytoplasma, isoliert aus den Herzzellen, Basal und der AAR nach 30minütiger Ischämie ohne und mit 10-, und 30minütiger Reperfusion ± BNIP3-Inhibition mittels TAT-BNIP3ΔTM. Die Signifikanz wurde mittels *Two-Way ANOVA*, *post hoc* Bonferroni berechnet, n=6, SD. Als Ladekontrolle wurde α-Tubulin verwendet. Die relative Proteinkonzentration setzt sich zusammen aus dem Verhältnis von Cytochrom c/α-Tubulin.

### 3.10.2 *Ex vivo*

In vorherigen Versuchen zeigte sich, dass BNIP3 sowohl mit BAX, als auch mit VDAC interagiert (Abb.3.12). Zudem wurde sowohl für BAX<sup>43,45,46</sup>, als auch für VDAC<sup>83,84</sup> eine Cytochrom c-freisetzende Wirkung beschrieben. Daher wurde der Einfluss einer Inhibition von BNIP3, BAX und VDAC auf die Freisetzung von Cytochrom c in einem *ex vivo* Versuch mit murinen isolierten Mitochondrien analysiert. Die Analyse erfolgte *ex vivo* da die Inhibition von BAX und VDAC mittels der hier verwendeten Inhibitoren in Herzen *in vivo* bisher nicht getestet wurde. Hierzu wurden aus basalen, murinen Herzen Mitochondrien isoliert und über die Gabe eines Kalziumüberschusses apoptotische Signale ausgelöst. Dies führte zu einer Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien, welche durch den Anstieg des

Proteins im Überstand gemessen werden konnte. Neben Kalziumchlorid wurden die Mitochondrien mit dem Zytoplasma aus murinen Herzen inkubiert. Dies stellte sicher, dass alle Proteine, die die pro-apoptotischen Signale auslösen, vorhanden sind und agieren können. Der Einfluss von VDAC, BAX und BNIP3 auf die Freisetzung von Cytochrom c wurde über die Inhibition der Proteine über die entsprechenden Inhibitoren DIDS, BAX-Antikörper und TAT-BNIP3 $\Delta$ TM untersucht. Neben der Freisetzung von Cytochrom c wurde in diesem Ansatz auch das Vorhandensein der aktiven Form von BAX im Überstand und die Freisetzung von tAIF aus dem Intermembranraum der Mitochondrien analysiert. Freigesetztes und aktiviertes AIF (tAIF) bewirkt Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung<sup>50</sup>.

Die Inhibition von VDAC zeigte keinen Einfluss auf die Aktivierung von BAX und die Freisetzung von Cytochrom c und AIF. Die BAX-Inhibition zeigte sich erfolgreich. Es konnte nach Inhibition mittels BAX-Antikörper kein BAX in der aktiven Form mehr nachgewiesen werden (Basal=1 / BAX-Inhibition=0,1 $\pm$ 0,1; p=0,0045) (Abb.3.18/III.). Zudem führte die Inhibition zu einer Unterdrückung der Freisetzung von Cytochrom c (Basal=1 / BAX-Inhibition=0,0 $\pm$ 0,0; p=0,0003) (Abb.3.19/I.) und einer signifikanten Reduktion der tAIF-Freisetzung (Basal=1 / BAX-Inhibition=0,2 $\pm$ 0,1; p=0,0002) (Abb.3.19/II.). Dieses Ergebnis konnte auch über die Inhibition von BNIP3 erzielt werden. Die Aktivierung von BAX (Basal=1 / BNIP3-Inhibition=0,1 $\pm$ 0,2; p=0,0045) und die Freisetzung der pro-apoptotischen Proteine Cytochrom c (Basal=1 / BNIP3-Inhibition=0,0 $\pm$ 0,0; p=0,0003) und tAIF (Basal=1 / BNIP3-Inhibition=0,2 $\pm$ 0,2; p=0,0002) wurden über die BNIP3-Inhibition signifikant reduziert. Das *in vivo* Ergebnis konnte mit diesem Versuch bestätigt werden.



**Abb. 3.19: Cytochrom c-, AIF-Freisetzung und aktives BAX**

Aus murinen Herzen isolierte Mitochondrien wurden mit 1mM  $\text{CaCl}_2$  zur Apoptose angeregt und der Einfluss des VDAC-Inhibitors DIDS, die Inhibition von BAX mittels BAX-Antikörper und die Inhibition von BNIP3 mittels TAT-BNIP3 $\Delta$ TM auf die Freisetzung von Cytochrom c (I.) und tAIF (II.) und die BAX-Aktivierung (III.) mittels Western Blot im Überstand untersucht. Neben  $\text{CaCl}_2$  wurden die Mitochondrien zusätzlich mit dem Zytoplasma der Herzen inkubiert. Die Signifikanz wurde mittels *One-Way ANOVA, post hoc* Bonferroni berechnet,  $n=3$ , SD. Die relative Proteinkonzentration entspricht der gemessenen Pixelintensität der Western Blot Banden normiert auf den Kontrollwert. (IV.) Repräsentativer Western Blot. Zu sehen ist die Analyse von tAIF im Überstand (links) und den Mitochondrien (rechts). Hier wurden drei verschiedene Konzentrationen für TAT-BNIP3 $\Delta$ TM getestet. Ausgewertet (I.-III.) wurde jeweils 10 $\mu\text{g}$ .

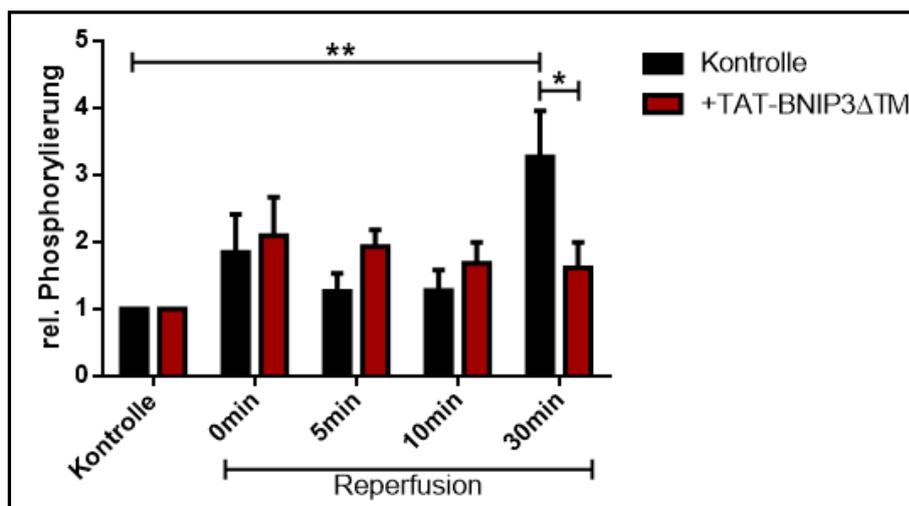
## 3.11 Posttranslationale Phosphorylierung von BNIP3

### 3.11.1 In den gesamten Herzzellen

Die Translokation von BNIP3 zu den Mitochondrien findet hauptsächlich in den ersten 10min der Reperfusion statt (Abb.3.9) und führt zu einer Depolarisierung der Membran (Abb.3.13). Nach einer 30minütigen Phase der Reperfusion kommt es zu einer Aktivierung von BAX (Abb.3.16) und einer Freisetzung von Cytochrom c (Abb.3.18). Dieser Prozess zeigte sich BNIP3-abhängig. Es muss daher zu diesem Zeitpunkt der Reperfusion eine Aktivierung des BNIP3-Proteins stattfinden. Eine Möglichkeit der Aktivierung von Proteinen stellt die Phosphorylierung dar<sup>128</sup>. BNIP3 weist einen phosphorylierbaren Serinrest auf<sup>129</sup>. Die Phosphorylierung des BNIP3-

Serinrestes im myokardialen I/R-Schaden wurde daher untersucht. Dazu wurden in einem *in vivo* Ansatz die Zeitpunkte Basal und nach 30minütiger Ischämie ohne und mit 5-, 10- und 30minütiger Reperfusion analysiert. Die Proteine der gesamten Herzen wurden isoliert, mittels Immunpräzipitation BNIP3 aus dem Proteingemisch isoliert und mittels Western Blot analysiert. Die BNIP3-Phosphorylierung wurde unter Verwendung eines phosphoSerin-spezifischen Antikörpers untersucht.

Im Verlauf der I/R konnte ein signifikanter Anstieg an phosphoryliertem BNIP3 in murinen Herzen verzeichnet werden. Dieser Anstieg konnte erst nach einer 30minütigen Reperfusion nachgewiesen werden (Basal=1 / 30min Reperfusion=3,3±1,5;  $p=0,0085$ ). Die Translokation von BNIP3 (Abb.3.9) und die BNIP3-induzierte BAX-Translokation (Abb.3.11) zu den Mitochondrien finden in den ersten 10min der Reperfusion statt und scheinen unabhängig von der Phosphorylierung zu sein (Abb.3.20). Über TAT-BNIP3 $\Delta$ TM inhibiertes BNIP3 wurde nicht phosphoryliert (30min Reperfusion+TAT-BNIP3 $\Delta$ TM=1,6±0,8;  $p=0,0274$ ).



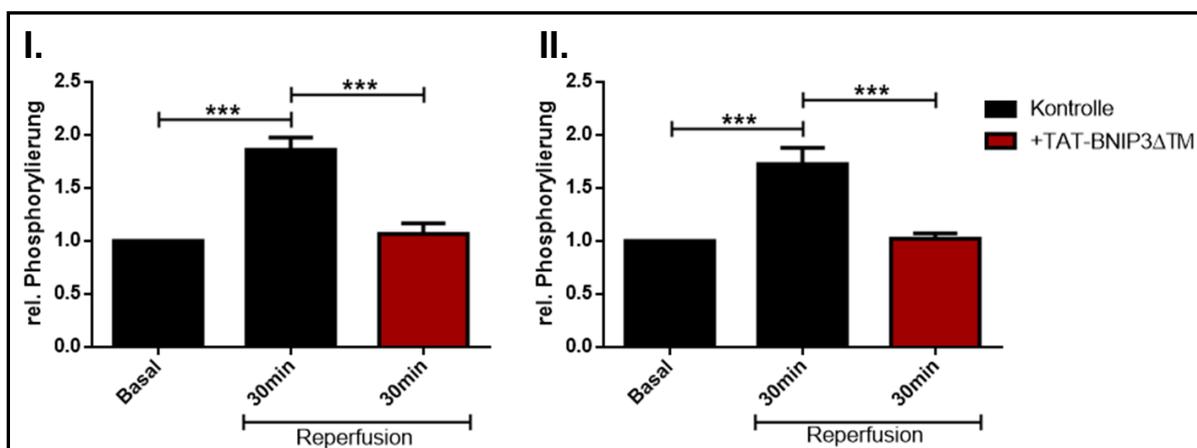
**Abb.3.20: Phosphorylierung von BNIP3**

Basal und nach 30minütiger Ischämie ohne und mit 5-, 10-, und 30minütiger Reperfusion  $\pm$  BNIP3-Inhibition mittels TAT-BNIP3 $\Delta$ TM wurde aus den gesamten Proteinen der murinen Herzen BNIP3 mittels Immunpräzipitation isoliert. Die Analyse der Phosphorylierung des Proteins erfolgte mittels Western Blot über einen phosphoSerin-spezifischen Antikörper. Die Signifikanz wurde mittels *Two-Way* ANOVA, *post hoc* Bonferroni berechnet,  $n=5$ , SD. Als Ladekontrolle wurde BNIP3 verwendet. Die relative Phosphorylierung setzt sich zusammen aus dem Verhältnis der relativen Proteinkonzentration  $p\text{BNIP3}/\text{BNIP3}$ .

### 3.11.2 In Mitochondrien und Zytoplasma aus Herzen

Neben den gesamten Herzzellen wurde die BNIP3-Phosphorylierung auch separat in den Mitochondrien und dem Zytoplasma der Herzzellen untersucht, zu den Zeitpunkten Basal und 30min Ischämie mit 30min Reperfusion  $\pm$  BNIP3-Inhibition.

Die Phosphorylierung zeigte sich unabhängig von der BNIP3-Lokalisation. Es konnte herausgestellt werden, dass nach 30min Reperfusion sowohl im Mitochondrium als auch im Zytoplasma ein signifikanter Anstieg an phosphoBNIP3 vorliegt (Abb.3.21). Sowohl im Zytoplasma als auch in den Mitochondrien wurde die Phosphorylierung über die Inhibition des BNIP3-Proteins verhindert.



**Abb.3.21: BNIP3-Phosphorylierung im Zytoplasma und den Mitochondrien**

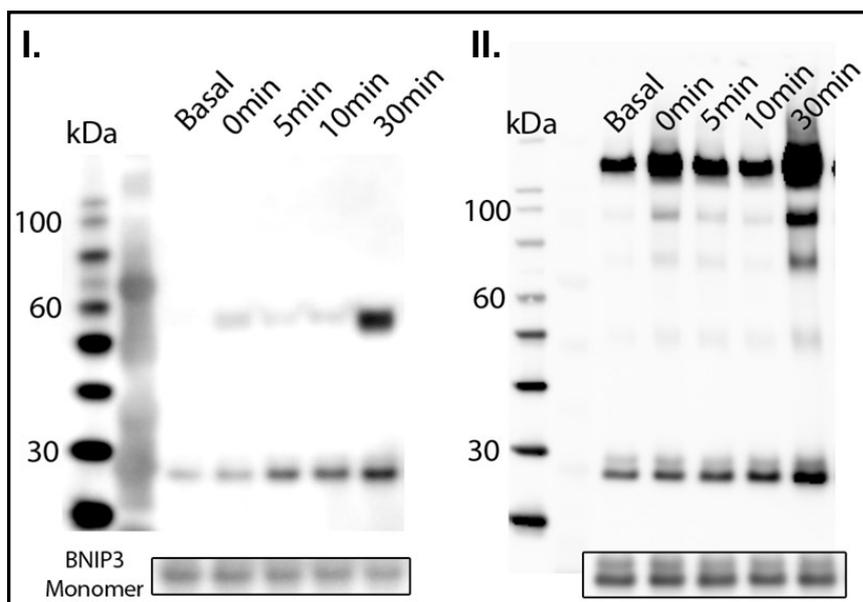
Basal und nach 30minütiger Ischämie mit folgender 30minütiger Reperfusion  $\pm$  BNIP3-Inhibition mittels TAT-BNIP3 $\Delta$ TM wurde die BNIP3-Phosphorylierung in dem Zytoplasma (I.) und den Mitochondrien (II.) der gesamten murinen Herzen mittels Western Blot untersucht. Die Signifikanz wurde mittels *Two-Way ANOVA, post hoc Bonferroni* berechnet,  $n=5$ , SD. Als Ladekontrolle wurde BNIP3 verwendet. Die relative Phosphorylierung setzt sich zusammen aus dem Verhältnis der relativen Proteinkonzentration pBNIP3/BNIP3.

### 3.11.3 Einfluss auf die Oligomerisierung von BNIP3

Der bisherige Wissensstand besagt, dass die Freisetzung von Cytochrom c über die *mitochondrial outer membrane pore* (MOMP), welche vermutlich aus BAX und BAK gebildet wird, verläuft<sup>43,45,46,49</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass die Integration von BAX in die äußere Mitochondrienmembran eine Oligomerisierung des Proteins voraussetzt<sup>43,46</sup>. Da sich die Aktivierung von BAX BNIP3-abhängig zeigte (Abb.3.16) und zum gleichen Zeitpunkt eine BNIP3-Phosphorylierung detektiert wurde (Abb.3.20), wurde im Folgenden untersucht, inwieweit die Phosphorylierung von BNIP3 Einfluss auf die BAX-Oligomerisierung nimmt. Zunächst wurde jedoch der Einfluss der Phosphorylierung auf die BNIP3-Oligomerisierung analysiert, da es

denkbar wäre, dass BNIP3 als BAX-Interaktionspartner (Abb.3.12) ebenfalls einen Teil der Pore darstellt. Hierzu wurde eine Co-Immunpräzipitation mit BNIP3-Konjugaten unter reduzierenden (Abb.3.22/I.) und nicht-reduzierenden Bedingungen (Abb.3.22/II.) durchgeführt und pBNIP3 im Western Blot untersucht.

Unter nicht-reduzierenden Bedingungen konnten im Western Blot neben Monomeren (25kDa) phosphoBNIP3-Oligomere mit einer Größe von 50, 70, 100 und 170kDa detektiert werden (Abb.3.22/II.). Dagegen konnten keine phosphorylierten Dimere nachgewiesen werden. Die Oligomere zeigten sich nicht unter reduzierenden Bedingungen. Sie zeigten sich DTT-sensitiv und wurden zu Dimeren aufgespalten (Abb.3.22/I.). Die Dimere sind DTT-resistent und konnten auch noch unter reduzierenden Bedingungen detektiert werden. Ob es sich hierbei um BNIP3-Homooligomere oder Heterooligomere, bestehend aus BNIP3 und BAX handelt, wurde im Folgenden untersucht.

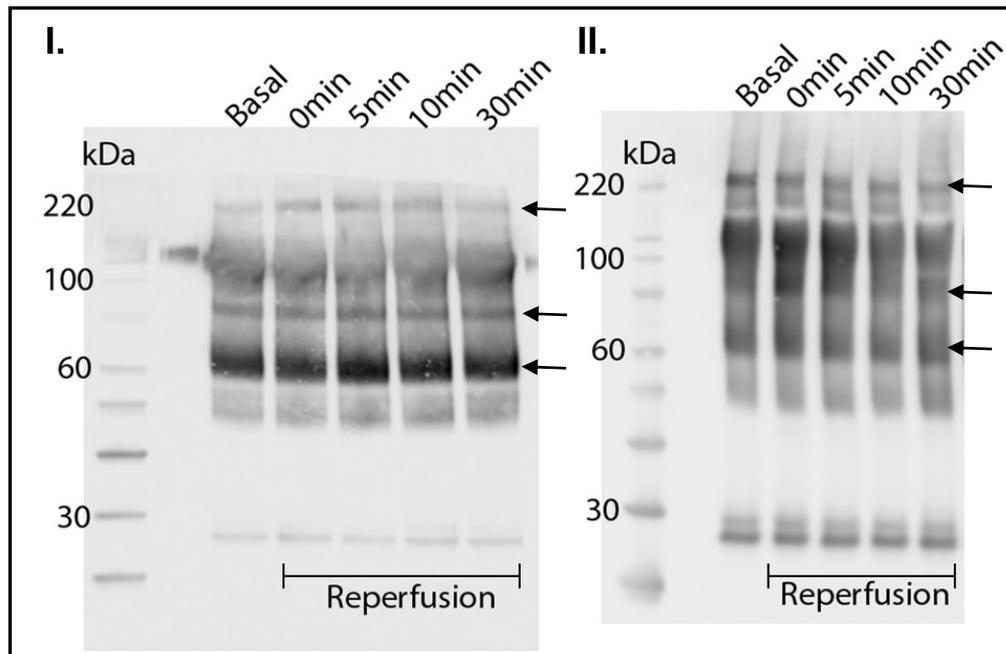


**Abb.3.22: phosphoBNIP3-Oligomere**

Basal und nach 30minütiger Ischämie ohne und mit 5-, 10-, und 30minütiger Reperfusion wurde aus den gesamten Proteinen der murinen Herzen BNIP3 mittels Immunpräzipitation isoliert. Im Anschluss folgte ein Western Blot und die Analyse der Phosphorylierung des Proteins über einen phosphoSerin-spezifischen Antikörper. Die Proben wurden unter reduzierenden (+50mM DTT) (I.) und nicht-reduzierenden (-DTT) (II.) Bedingungen untersucht. Als Ladekontrolle diente das Monomer von BNIP3.

Dazu wurden unter dem gleichen Versuchsansatz nach der Co-Immunpräzipitation unter nicht-reduzierenden Bedingungen die Proteine BAX und BNIP3 im Western Blot angefärbt. Dabei zeigten sich Heterooligomere aus BAX und BNIP3 bei einer Höhe von 60, 80 und 220kDa, nachgewiesen über das Vorhandensein beider

Proteine auf dieser Höhe im Blot nach der BNIP3-IP (Abb.3.23). Diese Oligomere zeigten kein phosphoryliertes BNIP3 (Abb.3.22/II). Dies lässt vermuten, dass phosphoBNIP3 im Gegensatz zu BNIP3 keine Interaktion mit BAX eingeht, beziehungsweise die Phosphorylierung auf die Interaktion destabilisierend wirkt.



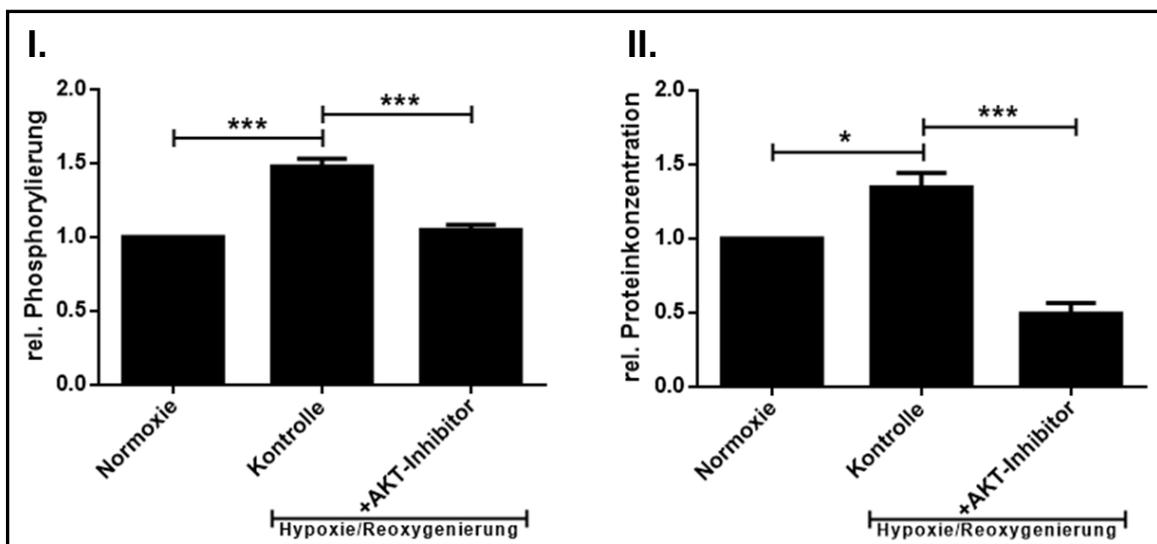
**Abb.3.23: Heterooligomere aus BNIP3 und BAX**

BNIP3-Co-Immunpräzipitation und anschließende Western Blot Analyse von BAX (I.) und BNIP3 (II.), Basal und nach 30minütiger Ischämie ohne und mit 5-, 10-, und 30minütiger Reperfusion aus dem gesamten murinen Herzen, unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Die Pfeile markieren die Proteinbanden bei 60, 80 und 220kDa.

### 3.12 AKT-vermittelte Phosphorylierung von BNIP3

Da es zu einer Phosphorylierung eines Serinrestes kommt und in der Literatur erste Hinweise einer Beteiligung der ProteinkinaseB (AKT) bei der BNIP3-Phosphorylierung beschrieben wurden<sup>129</sup>, wurde dies hier genauer untersucht. Dazu wurde ein *in vitro* Ansatz mit HL-1 Zellen durchgeführt unter Verwendung eines AKT-Inhibitors, welcher *in vivo* bisher nicht getestet wurde. Die Phosphorylierung von BNIP3 wurde unter Normoxie und 24h Hypoxie/1h Reoxygenierung  $\pm$  AKT-Inhibitor mittels Western Blot analysiert (Abb.3.24/I.). Neben der Phosphorylierung wurde zudem das Vorhandensein der aktiven Form von BAX untersucht (Abb.3.24/II.). Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit Christine Angermund, Universitätsklinikum Düsseldorf, Klinik für Kardiologie, Angiologie und Pneumologie erhoben.

In den HL-1 Zellen führte die Hypoxie/Reoxygenierung im Vergleich zur Normoxie zu einem signifikanten Anstieg an phosphoBNIP3 (Normoxie=1 / Hypoxie/Reoxy.=  $1,5 \pm 0,1$ ;  $p < 0,0001$ ) und an der aktiven Form von BAX (Normoxie=1 / Hypoxie/Reoxy.=  $1,3 \pm 0,2$ ;  $p < 0,0001$ ). Die Inhibition von AKT führte zu einer signifikanten Reduktion der BNIP3-Phosphorylierung (Hypoxie/Reoxy.+AKT Inhibitor= $1,0 \pm 0,1$ ;  $p < 0,0001$ ) und auch der BAX-Aktivierung (Hypoxie/Reoxy.+AKT Inhibitor= $0,5 \pm 0,1$ ;  $p < 0,0001$ ). BNIP3 wird durch Hypoxie/Reoxygenierung induziert über die AKT phosphoryliert. Die Aktivität von BAX ist abhängig von der BNIP3-Phosphorylierung.



**Abb. 3.24: AKT-vermittelte Phosphorylierung**

Western Blot Analyse von phosphoBNIP3 (I.) und der aktiven Form von BAX (II.) in HL-1 Zellen. Die Proteinkonzentration wurde nach 24h Hypoxie und 1h Reoxygenierung  $\pm$  Zugabe von  $10 \mu\text{M}$  AKT-Inhibitor, 5min vor Hypoxie, gemessen. Als Kontrolle dienten Zellen, welche unter Normoxie inkubiert wurden. Die Signifikanz wurde mittels *One-Way ANOVA, post hoc* Bonferroni berechnet,  $n=5$ , SD. Die relative Phosphorylierung setzt sich zusammen aus dem Verhältnis von pBNIP3/BNIP3. Die relative Proteinkonzentration setzt sich zusammen aus dem Verhältnis von BAX/ $\alpha$ -Tubulin.

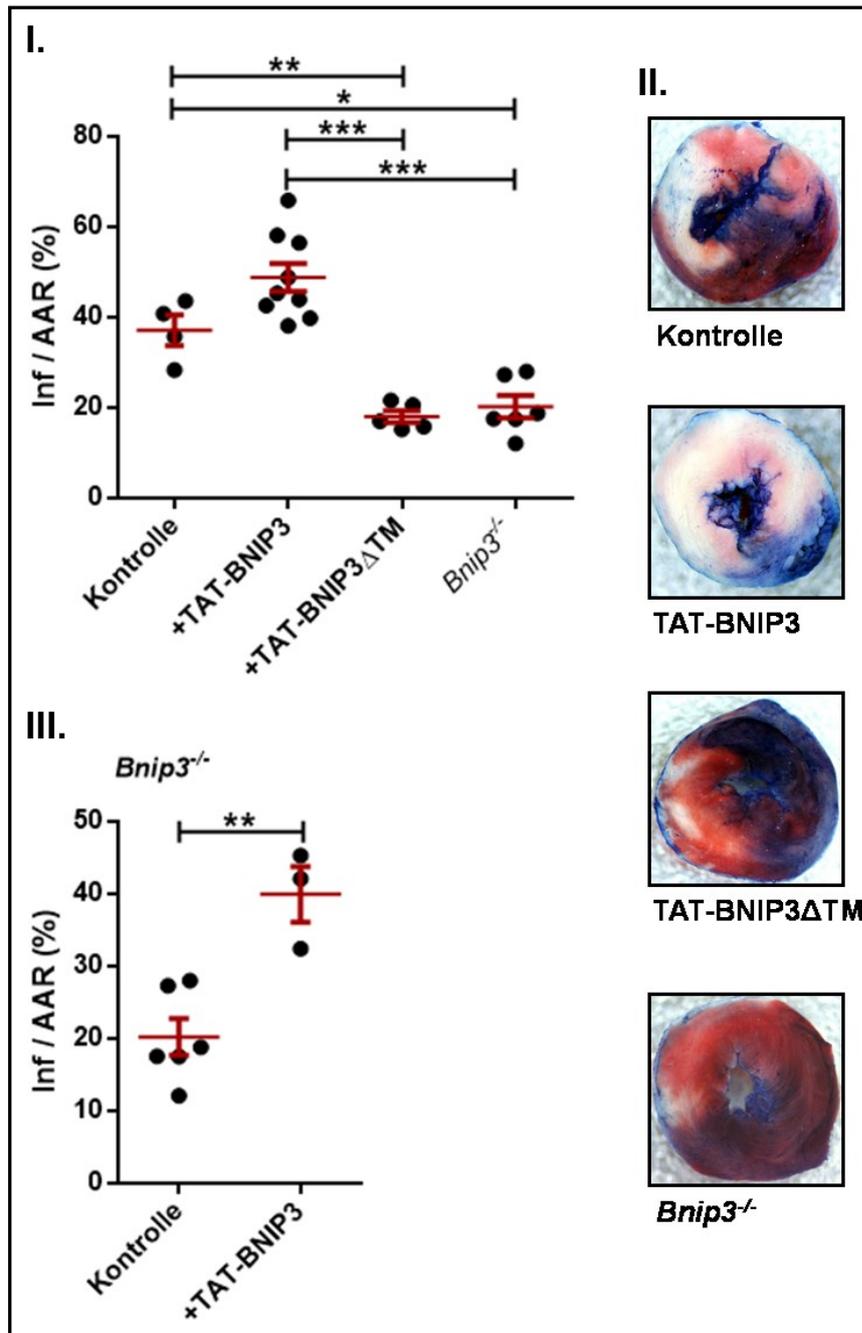
### 3.13 Biologische Relevanz der BNIP3-Inhibition

In den vorausgegangenen Versuchsansätzen konnte gezeigt werden, dass BNIP3 eine entscheidende Rolle bei dem Zelltod der Herzzellen im myokardialen I/R-Schaden spielt. Inwieweit sich diese Effekte auf die Infarktgröße auswirken, wurde im Folgenden untersucht. Dazu wurde ein *in vivo* Mausmodell mit 30min Ischämie und 24h Reperfusion verwendet. Verglichen wurde die Infarktgröße, welche über Evansblue und TTC-Färbung analysiert wurde, von WT-Mäusen ohne und mit der

Injektion von 2nmol TAT-BNIP3 oder TAT-BNIP3 $\Delta$ TM 5min vor Ischämie. Zudem wurde die Infarktgröße von *Bnip3*<sup>-/-</sup>-Mäusen analysiert (Abb.3.25/I.).

Die unbehandelten Wildtypen wiesen eine Infarktgröße von 37±7% auf. Die Zugabe von TAT-BNIP3 führt zu einem tendenziellen Anstieg auf 49±9%. Die Inhibition von BNIP3 mittels TAT-BNIP3 $\Delta$ TM dagegen, führte zu einer signifikanten 49%igen Reduktion des Infarktes auf 18±3%, p=0,0072. Auch die *Bnip3*<sup>-/-</sup>-Maus zeigte eine signifikante 41%ige Reduktion des Infarktes auf 20±6%, p=0,0151, womit das Ergebnis der Inhibition über TAT-BNIP3 $\Delta$ TM bestätigt werden konnte. Die BNIP3-Inhibition zeigt einen deutlichen Effekt auf die Infarktgröße *in vivo*.

Zur weiteren Kontrolle, ob sich der Effekt BNIP3 abhängig darstellt, oder aus Nebeneffekten resultiert, wurde einer *Bnip3*<sup>-/-</sup>-Maus über die Gabe von TAT-BNIP3 das Protein wieder zugefügt und die Infarktgröße bestimmt (Abb.3.25/III.). Hier konnte eine Wiederherstellung des Wildtypens verzeichnet werden. Die Zugabe von BNIP3 führte zu einem signifikanten Anstieg der Infarktgröße zurück auf 40±7%, p=0,0032.



**Abb.3.25: Einfluss von BNIP3 auf die Infarktgröße *in vivo***

Die Infarktgröße nach 30min Ischämie und anschließender 24stündiger Reperfusion wurde mittels Evansblue und TTC-Färbung bestimmt. Als Modell wurden Wildtyp und *Bnip3*<sup>-/-</sup>-Mäuse verwendet. Berechnet und angegeben wurde der Infarkt (totes Gewebe) in der AAR (*area at risk*) in %. 2nmol der Fusionsproteine TAT-BNIP3 und TAT-BNIP3 $\Delta$ TM wurden 5min vor Ischämie in den linken Ventrikel injiziert. (I.) Vergleich der Infarktgrößen von C57BL/6 WT-Kontrollen, nach Injektion von TAT-BNIP3 / TAT-BNIP3 $\Delta$ TM und der *Bnip3*<sup>-/-</sup>-Maus. Die Signifikanz wurde mittels *One-Way ANOVA*, *post hoc* Bonferroni berechnet. (II.) Exemplarische Herzschnitte der TTC-Färbung. (III.) Vergleich der Infarktgröße einer *Bnip3*<sup>-/-</sup>-Maus mit und ohne Injektion von TAT-BNIP3.

## 4 Diskussion

Im Rahmen des I/R-Schadens kommt es insbesondere in der frühen Phase der Reperfusion zu einem Untergang von Kardiomyozyten über Zelltod<sup>15,18</sup>. Um die Überlebenschancen der Patienten zu erhöhen und die klinische Symptomatik zu verbessern, ist ein neuer therapeutischer Ansatz von großer Bedeutung. Um den Untergang der Zellen zu verhindern, ist es wichtig, die Mechanismen, die den Zelltod induzieren, zu verstehen. Über welche Signalwege der Zelltod der Kardiomyozyten im I/R-Schaden ausgelöst wird, wird heute noch kontrovers diskutiert. In der Diskussion sind sowohl nekrotische<sup>130</sup> als auch apoptotische<sup>25</sup> Prozesse als Auslöser des Zelltods. Andere Gruppen bringen zudem die Autophagy mit dem I/R-Schaden in Zusammenhang<sup>103</sup>. Insbesondere in den letzten Jahren stellte sich heraus, dass eine klare Trennung dieser Signalwege nicht möglich ist. Die klassischen Modelle gestalten sich als viel komplexer und stärker miteinander assoziiert als bisher angenommen.

Das Protein BNIP3 stellt ein interessantes Target zur Entwicklung eines neuen Wirkstoffes dar. BNIP3 gehört zwar zur Gruppe der pro-apoptischen BCL-2 Proteine<sup>89</sup>, interagiert aber über die Funktionen der Gruppe hinaus und weist weitere wichtige Aufgaben in der Zelle auf. Neben der Apoptose<sup>106</sup> induziert das Protein auch Nekrose<sup>99</sup> und Autophagy<sup>103</sup> und scheint im I/R-Schaden eine wichtige Rolle zu spielen. Therapeutika, welche derzeit im I/R-Schaden getestet werden, inhibieren nur einen der Zelltod-aktivierenden Mechanismen. Zudem zeigen sie nicht die erhoffte Wirkung. Ein Beispiel dafür stellt der mPTP-Inhibitor Cyclosporin A dar<sup>131,132</sup>. Über die Inhibition von BNIP3 könnte man auf verschiedene Zelltod-aktivierende Mechanismen Einfluss nehmen und so das Überleben einer größeren Anzahl an Kardiomyozyten gewährleisten. Da es bisher erst wenige Studien über BNIP3 im *in vivo* Modell gibt und die Wirkungsweise des Proteins zellabhängig zu sein scheint<sup>97,98,103,118</sup>, wurde in dieser Arbeit die Rolle des Proteins direkt im Herzen im I/R-Schaden in einem Mausmodell untersucht.

### 4.1 Expression, Lokalisation und Translokation von BNIP3

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass BNIP3 in adulten murinen Herzen unter basalen Bedingungen exprimiert wird. Das Protein konnte nicht nur generell in

murinen Herzen, sondern spezifischer in den Kardiomyozyten nachgewiesen werden (Abb.3.1). Auch in Herzen aus Ratten konnte durch Hamacher-Brady *et al.* ein endogenes BNIP3-Level festgestellt werden<sup>103</sup>. Bei der Studie wurden allerdings nur die gesamten Zellen des Herzens untersucht und es wurde nicht spezifisch auf Kardiomyozyten eingegangen. In neonatalen Kardiomyozyten dagegen wird BNIP3 nicht unter basalen Bedingungen exprimiert<sup>101,103</sup>. Auch verschiedene Zelllinien, wie MEF-<sup>104</sup> und HeLa-Zellen<sup>97</sup> zeigten kein endogenes BNIP3-Level. Hier führte erst eine Hypoxie/Reoxygenierung zu einer Expression von BNIP3 in den Zellen. Auch isolierte ventrikuläre Kardiomyozyten zeigten eine gesteigerte Expression des Proteins unter Hypoxie<sup>100</sup>. Erstmals wurde in dieser Arbeit das *Bnip3*-mRNA-Level (Abb.3.3) und die BNIP3-Proteinkonzentration (Abb.3.4) im Verlauf der I/R im *in vivo* Modell analysiert. Es zeigte sich eine konstante Expression von BNIP3. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Beobachtungen von Hamacher-Brady *et al.*, die in einem *ex vivo* Langendorff-Modell mit Rattenherzen nach 30minütiger Ischämie und 120minütiger Reperfusion auch keinen Anstieg der BNIP3-Proteinkonzentration verzeichnen konnten<sup>103</sup>. Regula *et al.* konnten dagegen in isolierten, ventrikulären Kardiomyozyten aus Ratten und in einem über Langendorff perfundierten Rattenherzen unter Hypoxie einen Anstieg an BNIP3 detektieren. Der Anstieg erfolgte jedoch erst nach einer 24stündigen Hypoxie im *in vitro* und einer 1stündigen Hypoxie im *ex vivo* Modell<sup>100</sup>. Da hier der Einfluss von BNIP3 auf den Reperfusionsschaden in der frühen Phase der Reperfusion untersucht wurde, wurde das BNIP3-Proteinlevel bereits nach einer 30minütigen Ischämie und anschließender maximaler Reperfusion von 4h untersucht. Es ist nicht auszuschließen, dass es in der späten Phase der Reperfusion auch hier zu einem Anstieg der Expression kommt. In der frühen Phase der Reperfusion liegt BNIP3 *in vivo* endogen in einer inaktiven Form vor. Die Wirkung des Proteins muss über einen aktivierenden Prozess induziert werden und ist nicht mit einer gesteigerten Expression assoziiert.

BNIP3 wird als mitochondriales Protein beschrieben<sup>107,112</sup>, konnte hier jedoch neben den Mitochondrien auch im Zytoplasma der Herzzellen lokalisiert werden. Vielmehr konnte BNIP3 auf der äußeren Mitochondrienmembran detektiert werden. Dies erfolgte über die erfolgreiche Trennung der inneren von der äußeren mitochondrialen Membran (Abb.3.6). Hierzu wurde ein Protokoll etabliert. BNIP3 zeigte sich dabei unter nicht-reduzierenden Bedingungen (-DTT) (Abb.3.1) in einer dimeren Form. Die Zugabe von DTT als Reduktionsmittel zeigte im Zytoplasma neben der dimeren auch

eine monomere Form des Proteins (Abb.3.6). Auch andere Gruppen konnten BNIP3 sowohl in der monomeren, als auch der dimeren Form im SDS-Gel detektieren, welche sich bei 30kDa und 60kDa zeigten<sup>101,106,107</sup>. Hier wurde jedoch immer das Protein der gesamten Zellen untersucht und kein Unterschied zwischen mitochondrial und zytoplasmatisch lokalisiertem BNIP3 gemacht. Das in den Mitochondrien befindliche Dimer zeigte sich, im Vergleich zu dem zytoplasmatischem, DTT-resistent. Hier konnte keine Aufspaltung in die monomere Form erfolgen. Das gibt einen Hinweis darauf, dass BNIP3-Dimere mit einer unterschiedlichen Stabilität vorliegen. Ein Grund dafür könnte sein, dass ein Teil der zytoplasmatischen Dimere die stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Ser172 und His173<sup>109</sup> aus einem unbekanntem Grund nicht ausbilden können. Die dimere Form und die mitochondriale Lokalisation scheint eine Notwendigkeit für die zelltodaktivierende Wirkung von BNIP3 zu determinieren<sup>102,106</sup>.

Unter unverändert bleibender Proteinkonzentration von BNIP3 im gesamten Herzen kommt es in der frühen Phase der Reperfusion zu einem Anstieg an BNIP3 in den Mitochondrien (Abb.3.9). Die Inhibition von BNIP3 über das Fusionsprotein TAT-BNIP3 $\Delta$ TM verhindert den Anstieg der BNIP3-Konzentration in den Mitochondrien vollständig. Diese Wirkung der Transmembrandeletionsmutante konnte auch von Regula *et al.* in isolierten ventrikulären<sup>100</sup> und Kubasiak *et al.* in neonatalen Rattenkardiomyozyten<sup>99</sup> unter Hypoxie beschrieben werden. In dieser Arbeit konnte erstmalig die Wirkung der BNIP3-Mutante *in vivo* gezeigt werden. Es wurde ein TAT-Fusionsprotein verwendet. Die TAT-Sequenz ist *in vivo* von Nöten um den Transport durch die Zellmembran der Kardiomyozyten und eine intrazelluläre Wirkung des Proteins zu gewährleisten. Dass nach der I/R das Protein in den Herzzellen vorlag, konnte mittels konvokaler Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden (Abb.3.8). Es wird vermutet, dass die Oligomerisierung von TAT-BNIP3 $\Delta$ TM mit endogenem BNIP3 auf Grund der fehlenden Transmembrandomäne die Integration von BNIP3 in die Mitochondrien verhindert und so als Inhibitor der BNIP3-Aktivität wirkt<sup>118</sup>. Regula *et al.* konnten mittels Alkaliextraktion unter Hypoxie einen Anstieg an fest in die Membran integrierten BNIP3 im Vergleich zu lose an die Membran gekoppeltem BNIP3-Protein zeigen. Hier konnte eine Translokation von BNIP3 beobachtet werden. Es kommt zu einem signifikanten Anstieg der Proteinkonzentration in der Mitochondrienfraktion. Ob BNIP3 hier in die Membran integriert oder mit ihr lose verankert ist, lässt sich nicht sagen.

## 4.2 BNIP3-induzierte Translokation von Bax

Neben der Translokation von BNIP3, konnte auch eine Translokation von BAX zu den Mitochondrien im I/R-Schaden detektiert werden (Abb.3.11). Dass es im Verlauf der Apoptose zu einer Translokation von BAX zu den Mitochondrien kommt, konnte bereits in *in vitro* Studien gezeigt werden<sup>44</sup> und hier *in vivo* bestätigt werden. Dabei ist es erstaunlich, dass bereits nach einer 10minütigen Reperfusion ein signifikanter Anstieg an BAX in den Mitochondrien nachgewiesen werden konnte. Kubli *et al.* erbrachten erstmals einen Zusammenhang zwischen der BAX-Translokation und BNIP3, indem sie in HL-1 Zellen zeigten, dass nach der Inhibition von BNIP3 mit BNIP3 $\Delta$ TM keine Translokation von BAX mehr stattfindet<sup>104</sup>. Auch *in vivo* zeigte sich die BAX-Translokation BNIP3-abhängig und konnte über die BNIP3-Inhibition reduziert werden (Abb.3.11). Es wird beschrieben, dass die BAX-Translokation und -Aktivierung über verschiedene BH3-only Proteine durch eine Interaktion, welche einen aktivierenden Einfluss hat, assoziiert ist. So konnte dies unter anderem für BIM<sup>133</sup>, PUMA<sup>60</sup> und BID<sup>46</sup> *in vitro* gezeigt werden. Ein weiterer Mechanismus über den BH3-only Proteine eine BAX-aktivierende Wirkung erzielen ist die Interaktion und Inhibition von anti-apoptotischen Proteinen der BCL-2-Familie<sup>134,135</sup>. Dies lässt vermuten, dass auch das BH3-only Protein BNIP3 die BAX-Translokation und -Aktivierung entweder über eine Interaktion und damit einhergehende Inhibition anti-apoptotischer BCL-2 Proteine oder über eine direkte Interaktion mit BAX determiniert. Hier konnte herausgestellt werden, dass eine Interaktion von BNIP3 mit BAX *in vivo* stattfindet (Abb.3.12). Das lässt vermuten, dass das Protein auf diese Weise die BAX-Aktivierung induziert. Eine Wirkung von BNIP3 über die Inhibition anti-apoptotischer Proteine ist jedoch auch möglich, da für BNIP3 eine Interaktion mit den anti-apoptotischen Proteinen BCL-2 und BCL-xL<sup>136</sup> gezeigt werden konnte. Dies stellt sich allerdings in Anbetracht der direkten BAX-BNIP3-Interaktion als ein eher sekundärer Wirkungsmechanismus dar. Zudem liegen noch keine Daten vor, ob die Interaktion von BNIP3 mit den anti-apoptotischen Proteinen auch *in vivo* stattfindet. Da die BNIP3-BAX-Interaktion in dieser Arbeit bereits unter basalen Bedingungen verzeichnet werden konnte, muss neben der Interaktion ein weiterer aktivierender Mechanismus in der Reperfusion stattfinden, der die Translokation bewirkt. Bisher ist sehr wenig über Mechanismen dieser Art bekannt. Dass die BAX-Translokation abhängig ist von BNIP3 konnte neben der Inhibition über die Deletionsmutante auch in der *Bnip3*<sup>-/-</sup>-Maus gezeigt werden. In der I/R konnte in der *Bnip3*<sup>-/-</sup>-Maus keine

BAX-Translokation mehr verzeichnet werden. Durch die Zugabe von BNIP3 konnte die Translokation wieder hergestellt werden, welches einen direkten Zusammenhang zwischen der Translokation von BAX und BNIP3 verdeutlicht (Abb.3.11). Eine weitere interessante Beobachtung konnte aus dem Vergleich der BAX-Proteinkonzentration in Mitochondrien und Zytoplasma aus murinen, basalen Herzen einer WT-Maus im Vergleich zu einer *Bnip3*<sup>-/-</sup>-Maus gezogen werden (Abb.3.10). BAX konnte im Zytoplasma beider Mäuse nur in der monomeren Form detektiert werden. Im Mitochondrium dagegen konnte auch eine dimere und eine oligomere Form des Proteins im Bereich bei 80kDa verzeichnet werden. Dabei wurde das Oligomer hauptsächlich in der WT-Maus gefunden. Der Verlust des BNIP3-Proteins in der defizienten Maus führte zu einer stark verringerten BAX-Oligomerisierung. Das kann zwei Gründe haben. Entweder induziert BNIP3 die Homooligomerisierung von BAX, oder es kommt zur Bildung eines Heterooligomers aus BNIP3 und BAX. Ein Heterooligomer konnte in der defizienten Maus nicht mehr gebildet werden. Zweiteres ist wahrscheinlicher, da sich nach einer BNIP3-Immunpräzipitation unter nicht-reduzierenden Bedingungen ebenfalls ein Oligomer bei 80kDa zeigte (Abb.3.23). Welche Funktion dieses Oligomer aufweist ist bislang unklar.

### 4.3 Der Einfluss von BNIP3 auf die Mitochondrien im I/R Schaden

Anders als vermutet ging der Anstieg der BAX-Konzentration in den Mitochondrien zunächst nicht mit einer Freisetzung von Cytochrom c einher. Nach einer 10minütigen Reperfusion konnte kein signifikanter Anstieg der Cytochrom c-Konzentration im Zytoplasma detektiert werden (Abb.3.18). Es zeigte sich jedoch ein BNIP3-abhängiger Einfluss auf das Membranpotential der Mitochondrien (Abb.3.13). Die Depolarisierung der mitochondrialen Membran als Folge des I/R-Schadens wurde zuvor nur in über Langendorff perfundierten Rattenherzen gemessen. Das Potential wurde dabei über eine Messung von 2-deoxy[3H]glucose, welches die Membran der Mitochondrien erst nach dem Öffnen der Pore durchdringt, gemessen<sup>137</sup>. Auch erfolgte einer Messung über die Analyse einer Reduktion von NAD<sup>+</sup>, welches nach der Öffnung der Pore eine enzymatische Hydrolyse untergeht<sup>138</sup>. In dieser Arbeit wurde das mitochondriale Membranpotential direkt nach *in vivo* I/R mittels JC-1 gemessen. Bereits nach 5min Reperfusion konnte eine signifikante Änderung des Membranpotentials verzeichnet werden, welche nach

10min ihren Höhepunkt erreichte (Abb.3.13). Hausenloy *et al.* zeigten anhand eines perfundierten Rattenherzens im Langendorff-Modell, dass die Inhibition der Membrandepolarisierung mittels Sanglifehrin-A in den ersten 15min der Reperfusion erfolgen muss um einen positiven Effekt auf die Infarktgröße zu erzielen<sup>24</sup>. Dies deutet darauf hin, dass die Reperfusion einen schnellen und direkten Effekt auf die Depolarisierung der Mitochondrien hat. Dies ist jedoch nicht erstaunlich in Anbetracht dessen, dass die Bildung der ROS, welche unter anderem die Depolarisierung induzieren, innerhalb der ersten 5min der Reperfusion stattfindet<sup>19,20</sup>. Dies verdeutlicht wie wichtig eine therapeutische Induktion in der frühen Phase der Reperfusion ist. Parallel zu dem Anstieg der Depolarisierung konnte nach 10min Reperfusion mittels Elektronenmikroskopie auch ein Anschwellen der Mitochondrien beobachtet werden, welches auf einen Einstrom von Wasser hindeutet (Abb.3.14). Die Depolarisierung nahm bereits nach 15min Reperfusion wieder ab und konnte ebenso wie das Anschwellen der Mitochondrien nach 30min im WT nicht mehr detektiert werden. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen geben hier einen Hinweis darauf, dass ein Teil der geschwollenen Mitochondrien platzt. Nach 30min Reperfusion konnte ein signifikanter Anstieg an zerstörten Mitochondrien detektiert werden. Ob die Depolarisation und das Anschwellen der Mitochondrien Folgen der Öffnung des klassischen Modells der mPTP sind, oder ob es zur Öffnung der inneren Membran über einen bisher unbekannte Porenbildung kommt, lässt sich hier nicht sagen. Die Bestandteile der mPTP werden seit Jahren angezweifelt<sup>78,79</sup> und es wäre denkbar, dass BNIP3 und/oder BAX einen Bestandteil der Pore darstellen. Spektroskopische Aufnahmen von BNIP3 zeigten, dass das Dimer eine Pore in der Membran bilden kann, welche hydrophile Eigenschaften aufweist<sup>109</sup>. Über diese Pore wäre ein Einstrom von Wasser in die Mitochondrien möglich. Zhang *et al.* zeigten zudem in aus adulten Ratten isolierten Mitochondrien eine Interaktion von BNIP3 mit VDAC<sup>125</sup>, die in murinen Herzen *in vivo* bestätigt werden konnte (Abb.3.12). Kubli *et al.* zeigten in HL-1 Kardiomyozyten, dass die BNIP3-induzierte Depolarisierung der mitochondrialen Membran durch die Zugabe von Cyclosporin A inhibiert wird<sup>104</sup>. Cyclosporin A wird als Inhibitor der mPTP angesehen. Eine direkte Beteiligung von BNIP3 bei der Porenbildung in der inneren mitochondrialen Membran ist also nicht auszuschließen. Über die Inhibition der Aktivität des Proteins zeigte sich, dass BNIP3 einen Induktor der Depolarisierung darstellt. Die Gabe des TAT-BNIP3ΔTM-Fusionsproteins führte zu einer signifikanten Reduktion der Depolarisierung nach

10min Reperfusion (Abb.3.13). Auch die Analyse der mitochondrialen Struktur mittels Elektronenmikroskopie zeigte, dass die *Bnip3*-defiziente Maus einen geringeren Anteil an geschwollenen Mitochondrien nach 10min Reperfusion aufweist (Abb.3.14). Die Ergebnisse der JC-1-Analyse des Membranpotentials decken sich mit den Ergebnissen der elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Neben BNIP3 konnte auch ein Zusammenhang zwischen BAX und der mitochondrialen Membrandepolarisierung beschrieben werden. Allerdings wird nicht die Beteiligung von BAX bei der Porenbildung, sondern die BAX-Translokation als Folge der Membrandepolarisierung beschrieben. Dies ging mit einer Öffnung der MOMP und der Freisetzung von Cytochrom c einher<sup>76,77</sup>. Precht *et al.* untersuchten dies in *Cerebellar granule neurons* (CGNs)<sup>77</sup>. Ob der gleiche Mechanismus in Kardiomyozyten abläuft, ist unklar. Zudem konnte hier nach 10min Reperfusion keine Cytochrom c-Freisetzung beobachtet werden (Abb.3.18), welches die Öffnung der MOMP zu diesem Zeitpunkt ausschließt. Die Elektronenmikroskopie zeigte, dass die Mitochondrien nach 10min Reperfusion zwar angeschwollen sind, aber noch eine intakte äußere Membran aufweisen (Abb.3.14). Neben der Bildung der MOMP kann es auch zu einer Cytochrom c-Freisetzung über das Platzen der Mitochondrien kommen<sup>74,75</sup>. Ein Platzen der Mitochondrien konnte mittels Elektronenmikroskopie nach 30min Reperfusion verzeichnet werden. Der WT zeigte hier einen signifikanten Anstieg an zerstörten Mitochondrien. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Analyse der Cytochrom c-Freisetzung *in vivo* (Abb.3.18). Nach 30min Reperfusion konnte ein Anstieg an Cytochrom c im Zytoplasma gemessen werden. Ob dieser Anstieg allein durch das Platzen der Organellen verursacht wird oder parallel dazu auch eine Freisetzung der pro-apoptischen Faktoren über eine Pore in der äußeren Membran stattfindet, kann hier nicht ausgeschlossen werden. Es zeigte sich, dass nur ca. 21% der Mitochondrien nach 30min platzen (Abb.3.15). In der *Bnip3*-defizienten Maus dagegen konnte kein Platzen der Mitochondrien verzeichnet werden. Die Inhibition von BNIP3 zeigt einen Mitochondrien-erhaltenden Effekt.

Ob es (A) zu einer direkt über BNIP3-induzierten Depolarisierung und darüber vermittelten BAX-Translokation, (B) zu einer BNIP3-induzierten BAX-Translokation und dadurch vermittelten Depolarisierung kommt oder ob (C) BNIP3 beide Prozesse parallel und unabhängig voneinander induziert, konnte bislang nicht geklärt werden. Gezeigt werden konnte aber, dass die Inhibition von BNIP3 sowohl die BAX-

Translokation, als auch die Depolarisierung der mitochondrialen Membran, sowie das Anschwellen und Platzen der Mitochondrien signifikant reduziert.

#### 4.4 BNIP3-induzierte Bax-Aktivierung

Nach 30min Reperfusion kommt es zu einer Aktivierung von BAX (Abb.3.16). Zudem konnte ein Anstieg an Cytochrom c im Zytoplasma detektiert werden (Abb.3.18). Daher ist anzunehmen, dass die Aktivierung von BAX zu einer Porenbildung in der äußeren Mitochondrienmembran führt. Ein Teil des Cytochrom c-Anstiegs lässt sich auch über das Platzen der Mitochondrien erklären. Es platzen jedoch lediglich 21% der Organellen. Zudem konnte auch in dem *ex vivo* Versuch mit isolierten Mitochondrien eine über BNIP3-regulierte BAX-induzierte Cytochrom c-Freisetzung detektiert werden (Abb.3.19). Hierbei konnte eine Freisetzung über das Platzen der Mitochondrien ausgeschlossen werden, da sich der Anteil an Mitochondrien konstant zeigte. Die Inhibition von BAX über einen BAX-Antikörper führte zu einer signifikanten Reduktion der Freisetzung der pro-apoptotischen Faktoren (Abb.3.19). Dies verdeutlicht, dass die beschriebene Konformationsänderung von BAX<sup>127</sup> bei der Bildung der Pore in der äußeren Membran von entscheidender Bedeutung ist. Neben der direkten Inhibition von BAX konnte der gleiche Effekt, eine Reduktion der BAX-Aktivität sowie der Cytochrom c- und tAIF-Freisetzung, auch über die Inhibition von BNIP3 mittels TAT-BNIP3ΔTM erzielt werden. Die aktivierende Konformationsänderung von BAX ist damit abhängig von der Aktivität des Proteins BNIP3. Die Inhibition von VDAC dagegen zeigte keinen Einfluss auf die Bildung der Pore (Abb.3.19). So lässt sich, wenn man weiterhin davon ausgeht, dass VDAC ein Teil der mPTP darstellt, sagen, dass die Porenbildung in der inneren Membran keinen Einfluss auf die Aktivierung von BAX, die Bildung der MOMP und die Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren hat. Auch wenn die Translokation von BAX als Folge der Depolarisierung der mitochondrialen Membran betrachtet wird<sup>83,84</sup>, zeigte diese Translokation, welche bereits nach 10min Reperfusion stattfand, keinen Einfluss auf die Bildung der Pore in der äußeren Membran. Es konnte hier keine Freisetzung von Cytochrom c beobachtet werden (Abb.3.18). Die Translokation von BAX zu den Mitochondrien zeigte sich als unzureichend für die Bildung der Pore. Es muss ein weiterer aktivierender Mechanismus stattfinden, über den die Porenbildung induziert wird. Dieser Mechanismus zeigte sich BNIP3-abhängig (Abb.3.19). Das gleiche

Ergebnis konnte auch *in vivo* erzielt werden. Nach einer 30minütigen Phase der Reperfusion konnte sowohl ein Anstieg der aktiven Form von BAX (Abb.3.16), wie auch an Cytochrom c im Zytoplasma (Abb.3.18) detektiert werden. Die Inhibition von BNIP3 über TAT-BNIP3 $\Delta$ TM zeigte einen stark inhibierenden Effekt auf die BAX-Aktivität und die Freisetzung von Cytochrom c. Dieser Zusammenhang, der hier *in vivo* gezeigt werden konnte, konnte auch in HL-1 Zellen nachgewiesen werden<sup>104</sup>. Unter Hypoxie/Reoxygenierung führte die Überexpression von BNIP3 in den Zellen zu einem Anstieg der aktiven BAX-Form, die mit einer Cytochrom c-Freisetzung einher ging<sup>104</sup>. Neben HL-1 Zellen zeigte sich auch in über Langendorff perfundierten Rattenherzen eine BNIP3-abhängige Cytochrom c-Freisetzung<sup>103</sup>. Andere Gruppen fanden keinen Zusammenhang zwischen dem BNIP3-vermitteltem Zelltod und der Freisetzung des pro-apoptotischen Faktors<sup>97,99,102</sup>. Van de Velde *et al.* zeigten zum Beispiel, dass die Überexpression von BNIP3 in 293T-Zellen, welche zum Zelltod führt, ohne die Freisetzung von Cytochrom c einhergeht<sup>102</sup>. Hier ist jedoch zu beachten, dass die Zellen keiner Hypoxie/Reoxygenierung ausgesetzt wurden. Die Funktion von BNIP3 im myokardialen I/R-Schaden wird über die hier ablaufende Zellveränderung induziert. BNIP3 übernimmt verschiedene Funktionen und kann Zelltod über mehr als einen Mechanismus aktivieren. In dem Versuchsansatz von Van de Velde *et al.* fehlte das Signal, welches die Cytochrom c-freisetzende Funktion von BNIP3 aktiviert. Da in den verschiedenen Studien auf verschiedene Weisen der Zelltod induziert wurde, ging der BNIP3-vermittelte Untergang der Zellen mit verschiedenen sowohl apoptotisch, als auch nekrotischen Markern einher<sup>97,99,103,104,139</sup>. Die Wirkungsweise von Bnip3 als Aktivator der MOMP-Bildung muss weiter diskutiert werden. Eine Möglichkeit stellt eine aktivierende posttranslationale Modifikation von BNIP3 dar. Tatsächlich konnte eine Phosphorylierung des Proteins nach einer 30minütigen Reperfusion entdeckt werden (Abb.3.20). Diese konnte über die Inhibition der BNIP3-Aktivität mittels Fusionsprotein reduziert werden (Abb.3.20) und zeigte sich unabhängig von der Lokalisation des Proteins (Abb.3.21). Auch Graham *et al.* konnten in neonatalen Kardiomyozyten aus Ratten unter Hypoxie eine Korrelation zwischen der Zelltod-aktivierenden Wirkung von BNIP3 und der Phosphorylierung des Proteins zeigen<sup>101</sup>. Die Arbeit von Graham *et al.* zeigte eine BNIP3-Phosphorylierung, die jedoch nicht genauer klassifiziert wurde. In dieser Arbeit konnte herausgestellt werden, dass die Phosphorylierung an einem Serinrest stattfindet. Zudem konnte hier gezeigt werden,

dass diese Phosphorylierung über die Proteinkinase AKT vermittelt wird. In einem *in vitro* Ansatz mit HL-1 Zellen konnte die posttranslationale Modifikation von BNIP3 nach Inhibition der AKT nicht mehr nachgewiesen werden (Abb.3.24). Auch Reinartz *et al.* entdeckten einen Zusammenhang zwischen AKT und der Phosphorylierung von BNIP3. Sie untersuchten die Aktivität der Kinase in HL-1 Kardiomyozyten und konnten, neben 376 weiteren, BNIP3 als Zielprotein identifizieren. Die Phosphorylierung zeigte sich an dem Rest des Serins an Position 88<sup>129</sup>. Interessanterweise zeigte sich die Aktivierung von BAX, die mit der Bildung der MOMP und der Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren einherging, abhängig von der AKT-vermittelten BNIP3-Phosphorylierung. Die Inhibition von AKT führte neben der Reduktion der Phosphorylierung von BNIP3 auch zu einer Abnahme der aktiven Form von BAX (Abb.3.24). Nur phosphoryliertes BNIP3 aktiviert BAX.

Sowohl der Mechanismus, der zur Bildung der Pore in der äußeren mitochondrialen Membran führt, als auch die genaue Struktur der Pore sind bislang unklar. Wohingegen manche Gruppen eine Proteinpore beschreiben<sup>83,140</sup> zeigten andere die Bildung einer, über BAX-induzierten, Lipidpore in der äußeren mitochondrialen Membran<sup>80,81,141,142</sup>. Was die meisten Studien vereint, ist die Aussage, dass die Bildung der MOMP eine BAX-Oligomerisierung bedingt<sup>43,45,46</sup>. Zudem konnte eine Beteiligung von BH3-only Proteinen bei der Aktivierung der Oligomerisierung von BAX gezeigt werden<sup>59-61</sup>. Eskes *et al.* zeigten, dass ein apoptotischer Stimulus zu einer festen Integration von BAX in einer dimeren oder trimeren Form, welche über das BH3-only Protein BID induziert wird, in die äußere Mitochondrienmembran führt<sup>143</sup>.

Es zeigte sich, dass BNIP3 und BAX Oligomere bilden (Abb.3.23), diese wiesen jedoch kein phosphoryliertes BNIP3 auf (Abb.3.22). BAX zeigte sich nur als Bestandteil der nicht phosphorylierten Oligomere. Im Hintergrund dieser Ergebnisse wurde die Hypothese entwickelt, dass die Phosphorylierung von BNIP3 zu einer Freisetzung von BAX aus einem BNIP3-BAX-Komplex führt. Die Freisetzung führt zu einer Konformationsänderung und Aktivierung von BAX. Dies würde bedeuten, dass anders als andere BH3-only Proteine nicht die Bildung einer Interaktion, sondern die Lösung dieser zu einer BAX-Aktivierung führt. Dies würde die bereits unter physiologischen Bedingungen bestehende Interaktion der Proteine (Abb.3.12) erklären, welche hier eine inhibierende Wirkung zu haben scheint. Allerdings konnte hier keine signifikante Reduktion der Heterooligomere nach BNIP3-Phosphorylierung

verzeichnet werden. Um die Hypothese zu beweisen, müssen noch weitere Versuche diesbezüglich durchgeführt werden.

Ob die Depolarisierung der mitochondrialen Membran zu einem nekrotischen und die Freisetzung der pro-apoptotischen Faktoren zu einem apoptotischen Untergang der Zellen führt, so wie es die klassischen Modelle beschreiben<sup>25,28,30</sup>, lässt sich nicht sagen. Im I/R-Schaden konnte sowohl Nekrose<sup>24</sup> wie auch Apoptose<sup>63</sup> beschrieben werden. Wie bereits diskutiert stellt sich der Nachweis des Mechanismus, über den der Zelltod einer toten Zelle ausgelöst wurde, *in vivo* als schwierig dar<sup>87</sup>. Zudem weichen neue Modelle von den klassischen Modellen der Apoptose und Nekrose ab<sup>74,85</sup>. Es konnte eine Beteiligung von BNIP3 bei zwei zeitlich voneinander getrennten Prozessen beschrieben werden, welches eine duale Rolle von BNIP3 in der frühen Phase der Reperfusion prognostiziert.

#### 4.5 Biologische Relevanz von BNIP3

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass BNIP3 einen Zelltod-aktivierenden Einfluss im myokardialen I/R-Schaden nimmt. Somit kommt BNIP3 als Zielprotein einer neuen therapeutischen Strategie zur Reduktion des Reperfusionsschadens in Frage. Als am wirkungsvollsten wird eine direkte Inhibition des Proteins erachtet. Die Aktivität der AKT scheint im Rahmen des I/R-Schadens eher eine kardioprotektive Wirkung darzustellen<sup>144,145</sup>. Zudem zeigte sich die BNIP3-abhängige Depolarisierung der Mitochondrien unabhängig von der Phosphorylierung des Proteins. Daher eignet sich AKT nicht als Zielprotein. Es wäre auch eine Inhibition von BAX als Therapie vorstellbar. Jedoch konnte hier, anders als für BNIP3, kein direkter Zusammenhang zwischen BAX und der Depolarisierung der mitochondrialen Membran hergestellt werden. Ein BNIP3-Inhibitor als Wirkstoff würde sowohl die Depolarisierung der mitochondrialen Membran, als auch die Bildung der MOMP verhindern.

Dass die Inhibition von BNIP3 einen positiven Effekt auf die Infarktgröße hat, konnte *in vivo* bestätigt werden (Abb.3.25). Die Inhibition von BNIP3 über das Fusionsprotein, sowie die *Bnip3*-defiziente Maus zeigten eine starke Reduktion der Infarktgröße. Das es sich hierbei um einen direkt über BNIP3-induzierten Mechanismus handelt und die Reduktion nicht über Nebeneffekte induziert wurde, konnte durch den Anstieg der Infarktgröße zurück zu einem basalen Level nach Gabe von TAT-BNIP3 einer

*Bnip3*<sup>-/-</sup>-Maus dargestellt werden (Abb.3.25). Neben verschiedener *in vitro* Studien, die den Zelltod-inhibierenden Einfluss der Transmembrandeletionsmutante von BNIP3 zeigten<sup>99,104</sup>, konnte Hamacher-Brady *et al.* *ex vivo*, in einem über Langendorff perfundierten Rattenherzen, eine Reduktion der Infarktgröße durch BNIP3 $\Delta$ TM zeigen<sup>103</sup>. Hier konnte dies in einem *in vivo* Modell bestätigt werden.

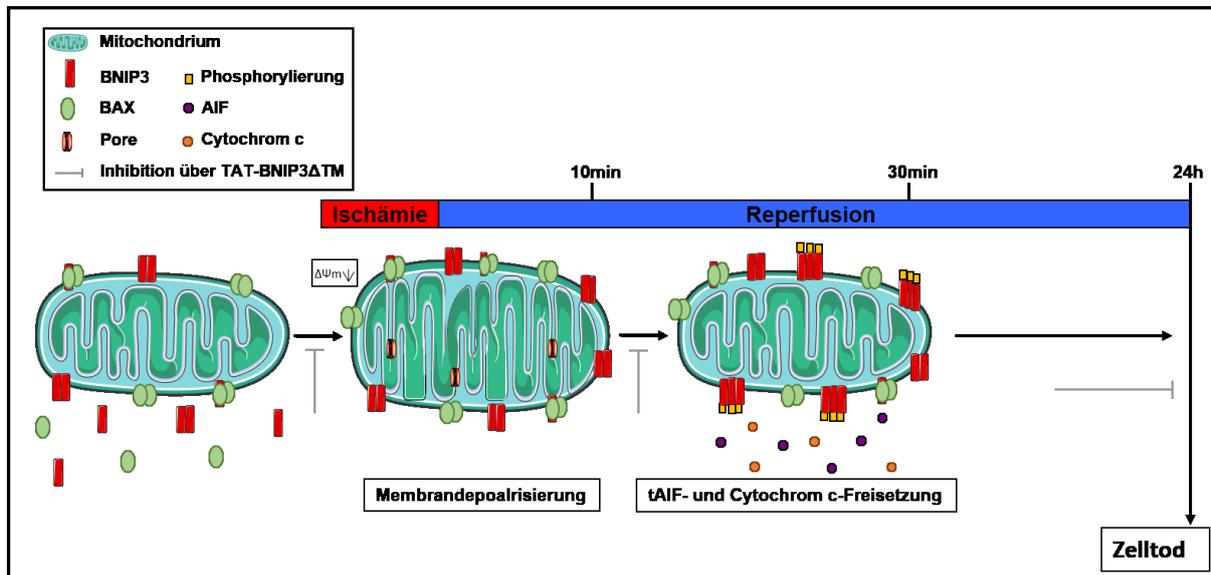
Die Gabe des Fusionsproteins TAT-BNIP3 $\Delta$ TM als Wirkstoff wurde jedoch ausgeschlossen, da es sich hierbei um ein stabiles, unter physiologischen Bedingungen lang haltbares, Protein handelt. Die Dysfunktion von BNIP3 konnte mit der Entstehung von Krebs in Verbindung gebracht werden<sup>91-96</sup>, welches eine kanzerogene Wirkung einer stabilen Inhibition von BNIP3 über TAT-BNIP3 $\Delta$ TM vermuten lässt. Daher ist es notwendig ein kurzlebigeres Therapeutikum mit der Fähigkeit BNIP3 in der frühen Phase der Reperfusion zu inhibieren zu entwickeln.

#### 4.6 Hauptaussagen und Ausblick

BNIP3 wird unter basalen Bedingungen in murinen Kardiomyozyten exprimiert und konnte im Zytoplasma und in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert werden. Es konnte heraus gestellt werden, dass BNIP3 im myokardialen I/R-Schaden eine duale Zelltod-aktivierende Rolle übernimmt. Innerhalb der ersten 10min der Reperfusion nach myokardialer Ischämie findet eine Translokation von BNIP3 und eine BNIP3-abhängige BAX-Translokation zu den Mitochondrien statt. Die Translokation geht mit einer Depolarisierung der mitochondrialen Membran und dem Anschwellen der Mitochondrien einher. Nach 30min Reperfusion führt eine AKT-vermittelte Phosphorylierung von BNIP3 zu einer BAX-Aktivierung. Es kommt zu einer Freisetzung der pro-apoptotischen Faktoren Cytochrom c und tAIF. Zudem konnte eine Interaktion von BNIP3 mit BAX und VDAC gezeigt werden. Die Inhibition von BNIP3 zeigte eine Reduktion der Zelltod-aktivierenden Mechanismen und damit einhergehend der Infarktgröße (Abb.4.1). BNIP3 konnte als ein neues Zielprotein für die Entwicklung einer Therapie zur Verbesserung des Reperfusionsschadens nach einer myokardialen Ischämie identifiziert werden.

Es gibt jedoch auch weiterhin offene Fragen. Wichtig sind weiterführende Studien, die die genaue Wirkungsweise von BNIP3 im I/R-Schaden untersuchen. Zu klären ist noch woraus sich die Poren in der inneren und äußeren Mitochondrienmembran zusammensetzen und wie BNIP3 die Porenbildung und -öffnung determiniert. Die

Entwicklung eines BNIP3-Inhibitors, dessen Verwendbarkeit bei Menschen möglich ist, steht jedoch im Vordergrund.



**Abb. 4.1: Die duale Rolle von BNIP3 im I/R Schaden**

Schematische Darstellung der Funktion von BNIP3 in der frühen Phase der Reperfusion. Dargestellt ist die Translokation von BNIP3 und BAX zu den Mitochondrien in den ersten 10min der Reperfusion mit Folge einer Membrandepolarisierung; die BNIP3-Phosphorylierung und BAX-Aktivierung nach 30min Reperfusion mit Folge einer Freisetzung von Cytochrom c und AIF und der Zelltod nach 24h Reperfusion. Diese Mechanismen zeigten sich BNIP3-abhängig und konnten über die TAT-BNIP3 $\Delta$ TM inhibiert werden.

## 5 Zusammenfassung

Der akute Myokardinfarkt geht einher mit dem Sterben von Kardiomyozyten bedingt durch eine Sauerstoffunterversorgung des Myokards (Ischämie). Die für das Überleben des Patienten wichtige Auslösung der Reperfusion über Katheterisieren der verstopften Arterie führt zu einer weiteren Schädigung des Gewebes. Der sogenannte Reperfusionsschaden entsteht über den plötzlichen Einstrom von sauerstoffreichem Blut und kann bis zu 50% des Infarktes ausmachen.

Die Mechanismen, die dabei den Tod der Zellen determinieren sind sehr komplex und auch heute noch nicht geklärt. Um das Überleben der Zellen zu sichern, scheint die Wahrung der Funktionalität und Integrität der Mitochondrien unabdingbar zu sein. In dieser Arbeit wurde der Einfluss des Proteins BNIP3 (BCL2 and adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein3) der BCL-2-Familie beim Zelltod in der frühen Phase der Reperfusion untersucht. Dargestellt werden konnte eine über Mitochondrien-vermittelte, zelltodaktivierende Wirkung von BNIP3, die einen starken Einfluss auf die Infarktgröße zeigte. Die Inhibition des Proteins führte zu einer Reduktion des Infarktes um 49% im *in vivo* Mausmodell. BNIP3 konnte im Zytoplasma und in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert werden. Das Protein translozierte in den ersten 10min der Reperfusion verstärkt zu den Mitochondrien und induziert gleichzeitig die Translokation von BAX. Dies löste eine Membrandepolarisierung der Mitochondrien, einhergehend mit dem Anschwellen der Organellen, aus. Diese Prozesse konnten über die Inhibition von BNIP3 signifikant reduziert werden. Die nach 30min Reperfusion beobachtete AKT-vermittelte Phosphorylierung eines BNIP3-Serinrestes führte zu einer Aktivierung von BAX. In Folge dessen konnte eine Freisetzung von Cytochrom c und AIF aus dem Mitochondrium verzeichnet werden. Auch hier führte die Inhibition von BNIP3 zu einer signifikanten Reduktion dieser Effekte. Das Protein übernimmt eine duale, zelltodaktivierende Rolle in der frühen Phase der Reperfusion und stellt ein interessantes Target zur Entwicklung eines neuen Wirkstoffes dar. Aufgrund des Fehlens einer wirkungsvollen Therapie stellt der Myokardinfarkt auch heute noch eine der häufigsten Todesursachen weltweit dar.

## 6 Summary

The acute myocardial infarction is attended by dying of cardiomyocytes in cause of an oxygen deficiency of the myocardium (ischemia). A quick opening of the artery by percutaneous transluminal coronary angioplasty is indispensable for the survival of the patients but leads to further cell death and tissue damage. The so-called reperfusion injury as a result of the sudden influx of oxygen rich blood can be responsible for up to 50% of the infarct.

The mechanism which determinates the death of the cells is very complex and still unclear. To ensure the survival of the cells it seems to be necessary to preserve the functionality and integrity of mitochondria. In this work the influence of the BCL-2 family member BNIP3 (BCL2 and adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein3) on cell death during the early phase of reperfusion were analyzed. It could be demonstrated that BNIP3 displays a mitochondria mediated cell death activity which showed a high influence of the infarct size. The inhibition of BNIP3 leads to a reduction of the infarct size by 49% in an *in vivo* mouse model.

BNIP3 could be localized in cytoplasm and mitochondria outer membrane. During the first 10min of reperfusion BNIP3 translocates to mitochondria and mediates the BAX translocation concomitant. This results in mitochondria membrane depolarization which is accompanied by swelling of these organelles. This process could be reduced significantly *via* inhibition of BNIP3. After 30min of reperfusion an AKT mediated phosphorylation of a BNIP3 serine residue leads to an activation of BAX protein. In consequence, a release of cytochrome c and AIF from mitochondria could be recognized. The inhibition of BNIP3 also reduces these effects significantly.

The protein shows a dual cell death activating role in the early phase of reperfusion and represents an interesting target for the development of a novel active ingredient. Based on the lack of an effective therapy, the acute myocardial infarction is still one of the leading causes of death worldwide.

## 7 Material

### 7.1 Geräte

Agarosegel-System	Invitrogen; E-Gel iBase
Arbeitsbank mit laminarer Luftströmung	Clean Air Engineering
Autoklav	
Brutschrank	Thermo Electron Corporation; HERA cell 240
Blotting System	iBlot2 Dry System, Invitrogen
Durchflusszytometer:	Becton Dickinson; FACS Verse
Feinwaage	Sartorius; CP225D-OCE
Image Quant	GE Healthcare; LAS 4000
Kaltschale	Cardio Bio Tech
Kryotom	Leica; CM3050S
Magnetrührer	VWR; Hotplate/Stirrer
Mikroskope	Elektronenmikroskop: Tecnai G2 Spirit 120 kV
	konvokal Mikroskop: Zeiss, Elyra PS
	Maus Operationen: Leica; MS5
	TTC-Färbung: Leica; MZ6
	Zellkultur: Leica; DFC425C
Modular incubator chamber	Billups
Muriner Respirator	Hugo Sachs Electronic; Mini Vent Typ 845
Gel Electrophoresis System	Invitrogen; Novex Bolt
OP-Tisch	Harvard
PCR-Machine	Eppendorf; Mastercycler gradient
pH-Meter	Schott Instruments; LAb870
Plattenphotometer	BMG Labtech; Fluostar Omega
Rollerpumpe	Ismatec
RT-PCR Gerät	AMI 7500 Fast PCR
Schüttler	Heidolph; Polymax 1040
Schüttelinkubator	Thermo Scientific; MaxQ 6000
Spannungsquelle	Bio Rad; Power Pac 200
Thermoschüttler	Eppendorf; Thermomixer comfort
Tissue Ruptor	Qiagen

Ultraschall		Bandelin
Ultra-Turrax		IKA-Werke; T25basic
Überkopfschüttler		Neolab
Vortexer		IKA; Vortex1
Wasseraufreiniger		Millipore; MilliQ
Wasserbad		GFL
Zentrifugen	Tischzentrifuge:	Hettich; Mikro 200R
	Ultrazentrifuge:	Beckman Coulter; Optima
	Zellkultur:	Hettich; Rotina 38R

## 7.2 Chemikalien/Lösungen/Enzyme

	<b>Hersteller:</b>	<b>Bestellnummer:</b>
Agar	Sigma-Aldrich	A5306
Agarose	Promega	V3121
AKT Inhibitor	Sigma-Aldrich	A6730
Ampicilin	Carl Roth	K029.3
Blue Juice Laufpuffer	Invitrogen	10816-015
BSA	Carl Roth	8076.3
Brij35	Sigma-Aldrich	CN21.1
Chemiluminescent Substrate		
SuperSignal West Femto	Thermo Scientific	34095
Chemiluminescent Substrate		
SuperSignal West Pico	Thermo Scientific	34087
Chloramphenicol	Carl Roth	3886.3
Claycomb-Medium	Sigma-Aldrich	51800C
DAPI	Life Technologies	d1306
Digitonin	Sigma-Aldrich	D141
DTT	Carl Roth	6908.2
EDTA	Sigma-Aldrich	eds
EGTA	Sigma-Aldrich	e3889
Ethanol	VWR	20905296
Evansblue	Sigma-Aldrich	E2129
FBS	Sigma-Aldrich	F2442

---

Fibronektin	Sigma-Aldrich	F1141
Formaldehyd	Sigma-Aldrich	F8775
Gasgemisch 5% CO <sub>2</sub> 95% N <sub>2</sub>	Linde	
Gelatin	Sigma-Aldrich	g9391
Glukosemonohydrat	Sigma-Aldrich	49159
Glutamin	Sigma-Aldrich	g7513
Glutaraldehyd	Carl Roth	4995.1
Heparin	WHO Collaborating	B01AB01
HEPES	Merck	1152310250
Imidazol	Sigma-Aldrich	183725
IPTG	Sigma-Aldrich	I6758
Isofluran	WHO Collaborating	N01AB06
Isopropanol	Carl Roth	CP41.4
KAPA Red. Mix	Peqlab	07-kk5701-02
Kaliumchloride	Sigma-Aldrich	P9333
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich	1551139
Kalziumchloride	Carl Roth	CN93.1
Ketamin	WHO Collaborating	
Kollagenase	Biochrom	C2-22
LB-Medium	Carl Roth	X968.4
LDS-Sample Buffer	Invitrogen	B0007
Lysozym	Carl-Roth	8259.2
Magermilchpulver	VWR	T145.2
Magnesiumsulfat	Merck	1.058.861.000
MES SDS Running Buffer	Invitrogen	B0002
Natriumazid	Carl Roth	k305.1
Natriumcarbonat	Carl Roth	27.775.293
Natriumchlorid	Carl Roth	3957.1
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth	T876.2
Natriumhydroxid	VWR	28.244.295
Norepinephrine	Sigma-Aldrich	a0937
normal goat Serum	Sigma-Aldrich	G9023
NP-40	Sigma-Aldrich	74385
Paraformaldehyd	Carl Roth	0335.2

PBS-Lösung	Sigma-Aldrich	D8537
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich	P4333
Ponceau	Sigma-Aldrich	1441194
Prolong Gold Antifade	Thermo Scientific	P36931
Proteinase K	Qiagen	19131
Proteinase- Phosphataseinhibitoren	Thermo Scientific	78440
Reducing Agent	Invitrogen	B0009
Rompun	Bayer Healthcare	6293841.00.00
SDS	Carl Roth	2326.2
SOC-Medium	Life Technologies	15544-034
Sucrose	Sigma-Aldrich	S7903
Temgesic	Essex Pharma	PZN 0345928
Tissue Tek	ClinPath	1620C
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich	T6399
Tris-HCl	Sigma-Aldrich	RES3098T
Triton-X100	Sigma-Aldrich	X100
Trypsin	Sigma-Aldrich	T3924
TTC	Carl Roth	KK13.2
Tween-20	Sigma-Aldrich	P9416

### 7.3 Assays/Kits

DC Protein Assay	Bio-Rad	1-800-424-6723
High Capacity RNA-to-cDNA Kit	Life Technologies	4368814
MitoProbe™ JC-1 Assay Kit	Invitrogen	M34152
Qproteome Mitochondria Isolation Kit	Qiagen	37612
RNeasy Mini Kit	Qiagen	74106
TaqMan Gene Expression Assay	Life Technologies	4331182

## 7.4 Antikörper

Name	Beschreibung	Verd.	App.	Hersteller
Actinin (ab109776)	rabbit polyclonal	1:200	IHC	Abcam
		1:500	WB	
AIF (sc-9416)	goat polyclonal	1:500	WB	Santa Cruz
ANT1 (ab110322)	mouse monoclonal	1:1000	WB	Abcam
BAX (ab7977)	rabbit polyclonal	1:1000	WB	Abcam
		1:12,5	IP	
BAX (6A7) (ALX-804-224)	synthetic peptide	1:500	WB	Enzo
BID (ab114051)	mouse monoclonal	1:1000	WB	Abcam
BNIP3 (ab38621)	rabbit polyclonal	1:1000	WB	Abcam
		1:100	IHC	
		1:12,5	IP	
Cytochrom c (ab13575)	mouse monoclonal	1:2000	WB	Abcam
Heavy chain cardiac Myosin (ab15)	mouse monoclonal	1:1000	WB	Abcam
TOMM22 (ab57523)	mouse monoclonal	1:1000	WB	Abcam

Troponin (ab125266)	rabbit polyclonal	1:1000	WB	Abcam
Tubulin (ab15246)	rabbit polyclonal	1:10.000	WB	Abcam
VDAC1 (ab15895)	rabbit polyclonal	1:1000 1:12,5	WB IP	Abcam

**Sekundär Antikörper:**

<b>Name</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Verd.</b>	<b>App.</b>
Anti-Mouse IgG Abcam (ab99632)	rat monoclonal (HRP)	1:4000	WB
Anti-Rabbit IgG Invitrogen (65-6120)	goat polyclonal (HRP)	1:4000	WB
Anti-Rat IgG Abcam (ab6743)	rabbit polyclonal (HRP)	1:4000	WB
Anti-Mouse IgG Abcam (ab150115)	goat polyclonal (AF647)	1:250	IHC
Anti-Rabbit IgG Abcam (ab150077)	goat polyclonal (AF488)	1:250	IHC
Anti-Rabbit IgG Abcam (97050)	goat polyclonal (FITC)	1:250	IHC

## 7.5 Verbrauchsmaterial

Agarosegele	Invitrogen	G5218-02
Deckgläschen	Merateo	
Dynabeads	Invitrogen	10003D
Gewebekulturflaschen	Carl Roth	
Filter	VWR	
Filter-Units	Millipore	
Glaspotter	Sartorius	
Glassäule	Verhees, Neuss	
Hamiltonpipette	VWR	
iBlot Transfer Stacks	Invitrogen	IB3010-01
Kanülen	VWR	
Nahtmaterial	Serrag Wiessner	
Neubauer-Zählkammer	Brand	
Ni-NTA Säule		
Magnetständer Dynabeads	Invitrogen	12001d
Objektträger	VWR	
OP-Besteck	FST	
Petrischalen	VWR	
0,6 mm Polyethylenschlauch	RCT	
Prolene	Ethicon	
Reaktionsgefäße	VWR	
Skalpell	VWR	
Spritzen	VWR	
Venenverweilkatheter	Vygon	
WB Gele	Invitrogen	NW04120BOX NW04125BOX
Well-Platten	Carl Roth	
Zell Scraper	VWR	
Zentrifugenröhrchen	Beckman Coulter	

## 8 Literaturverzeichnis

1. Thygesen, K., Alpert, J. S. & White, H. D. Universal Definition of Myocardial Infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **50**, 2173–2195 (2007).
2. Yusuf, S. *et al.* Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. *Lancet* **366**, 1640–1649 (2005).
3. Yusuf, S. *et al.* Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries ( the INTERHEART study ): case-control study. *Lancet* **364**, 937–952 (2004).
4. Hanefeld, M., Schaper, F. & Ceriello, A. History and definition(s) of metabolic syndrome. *Internist (Berl)*. **48**, 117–125 (2007).
5. Eckel, R. H., Grundy, S. M. & Zimmet, P. Z. The metabolic syndrome. *Lancet* **365**, 1415–28 (2005).
6. Kazlauskienė, L., Butnorienė, J. & Norkus, A. Metabolic syndrome related to cardiovascular events in a 10-year prospective study. *Diabetol. Metab. Syndr.* **7**, 102 (2015).
7. Schelo, S. Sterbefälle (absolut, Sterbeziffer, Ränge, Anteile) für die 10/20/50/100 häufigsten Todesursachen (ab 1998). Gliederungsmerkmale: Jahre, Region, Alter, Geschlecht, ICD-10. *destatis* (2015).
8. Alpert, J. S., Thygesen, K., Jaffe, A. & White, H. D. The universal definition of myocardial infarction: a consensus document. *Heart* **94**, 1335–1341 (2008).
9. Van de Werf, F. *et al.* Management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur. Heart J.* **24**, 28–66 (2003).
10. Davies, M. J. The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart* **83**, 361–366 (2000).
11. Rovetto, M. J., Lamberton, W. F. & Neely, J. R. Mechanisms of glycolytic inhibition in ischemic rat hearts. *Circ. Res.* **37**, 742–751 (1975).
12. Jennings, R. B., Murry, C. E., Steenbergen, C. & Reimer, K. A. Development of cell injury in sustained acute ischemia. *Circulation* **82**, II2–II12 (1990).
13. Hausenloy, D. & Yellon, D. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest* **123**, 92–100 (2013).
14. Avkiran, M. & Marber, M. S. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibitors for cardioprotective therapy: Progress, problems and prospects. *J. Am. Coll. Cardiol.* **39**, 747–753 (2002).
15. Verma, S. *et al.* Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist. *Circulation* **105**, 2332–2336 (2002).

16. Brodie, B. R. What anti-thrombotic therapy is best with primary PCI for acute ST elevation myocardial infarction: How should the HORIZONS trial change current practice? *Catheterization and Cardiovascular Interventions* **71**, 816–821 (2008).
17. Kloner, R.A. *et al.* Effect of a transient period of ischemia on myocardial cells. II. Fine Structure During the First Few Minutes of Reflow. *Am. J. Pathol.* **74**, 399–422 (1974).
18. Yellon, D. M. & Hausenloy, D. J. Myocardial reperfusion injury. *N. Engl. J. Med.* **357**, 1121–35 (2007).
19. Zweier, J. L., Flaherty, J. T. & Weisfeldt, M. L. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 1404–1407 (1987).
20. Hearse, D. J., Humphrey, S. M. & E.B. Chain. Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: A study of myocardial enzyme release. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **5**, 395–407 (1973).
21. Lemasters, J. J. *et al.* The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes. *EXS* **76**, 99–114 (1996).
22. Miyamae, M., Camacho, S. A., Weiner, M. W. & Figueredo, V. M. Attenuation of postischemic reperfusion injury is related to prevention of  $[Ca^{2+}]_m$  overload in rat hearts. *Am J Physiol Hear. Circ Physiol* **271**, H2145–2153 (1996).
23. De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabò, I. & Rizzuto, R. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* **476**, 336–340 (2011).
24. Hausenloy, D. J., Duchon, M. R. & Yellon, D. M. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia – reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* **60**, 617–625 (2003).
25. Kajstura, J. *et al.* Necrotic and apoptotic myocyte cell death in the aging heart of Fischer 344 rats. *Am. J. Physiol.* **271**, H1215–H1228 (1996).
26. Saraste, A. *et al.* Apoptosis in Human Acute Myocardial Infarction. *Circulation* **95**, 320–323 (1997).
27. Van der Meer, F. J. *et al.* Apoptosis- and necrosis-induced changes in light attenuation measured by optical coherence tomography. *Lasers Med. Sci.* **25**, 259–267 (2010).
28. Krysko, D. V., Vanden Berghe, T., D’Herde, K. & Vandenabeele, P. Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. *Science (80-. )*. **44**, 205–221 (2008).
29. Gill, C., Mestril, R. & Samali, A. Losing heart: the role of apoptosis in heart disease--a novel therapeutic target? *FASEB J.* **16**, 135–146 (2002).
30. Saraste, A. Morphologic Criteria and Detection of Apoptosis. *Herz* **24**, 189–195 (1999).

31. Crow, M. T., Mani, K., Nam, Y.-J. & Kitsis, R. N. The Mitochondrial Death Pathway and Cardiac Myocyte Apoptosis. *Circ. Res.* **95**, 957–970 (2004).
32. Gustafsson, A. B. & Gottlieb, R. a. Mechanisms of apoptosis in the heart. *J. Clin. Immunol.* **23**, 447–59 (2003).
33. Hsu, H., Xiong, J. & Goeddel, D. V. The TNF Receptor I-Associated Protein TRADD Signals Cell Death and NF-KB Activation. *Cell* **81**, 495–504 (1995).
34. Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M. & and Dixit, V. M. FADD , a Novel Death Domain-Containing Interacts with the Death Domain of Fas and Initiates Apoptosis Protein ,. *Cell* **81**, 505–512 (1995).
35. Ashkenazi, A. & Dixit, V. Death Receptors : Signaling and Modulation. **281**, 1305–1308 (1998).
36. Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S. & Dixit, V. M. An Induced Proximity Model for Caspase-8 Activation \*. *J. Biol. Chem.* **273**, 2926–2930 (1998).
37. Lee, P. *et al.* Fas pathway is a critical mediator of cardiac myocyte death and MI during ischemia-reperfusion in vivo. *Am J Physiol Hear. Circ Physiol* **284**, H456–463 (2003).
38. Green, D. R. & Reed, J. C. Mitochondria and Apoptosis. *Science (80-. )*. **281**, 1309–1313 (1998).
39. Lomonosova, E. & Chinnadurai, G. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene* **27**, S2–19 (2009).
40. Reed, J. C., Zha, H., Aime-Sempe, C., Takayama, S. & Wang, H. G. Structure-function analysis of Bcl-2 family proteins. Regulators of programmed cell death. *Adv. Exp. Med. Biol.* **406**, 99–112 (1996).
41. Chao, D. T. & Korsmeyer, S. J. BCL-2 FAMILY : Regulators of Cell Death. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 395–419 (1998).
42. Boyd, J. M. *et al.* Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene* **11**, 1921–1928 (1995).
43. Oltvai, Z. N. *et al.* Bcl-2 heterodimerizes In Vivo with a conserved homolg, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**, 609–619 (1993).
44. Wolter, K. G. *et al.* Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J. Cell Biol.* **139**, 1281–1292 (1997).
45. Wei, M. C. *et al.* Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**, 727–730 (2001).
46. Kuwana, T. *et al.* Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* **111**, 331–342 (2002).

47. García-Sáez, A. J. *et al.* Peptides corresponding to helices 5 and 6 of Bax can independently form large lipid pores. *FEBS J.* **273**, 971–981 (2006).
48. Bleicken, S., Landeta, O., Landajuela, A., Basañez, A., García-Sáez, A. J. Proapoptotic Bax and Bak proteins form stable protein-permeable pores of tunable size. *J. Biol. Chem.* **288**, 33241–33252 (2013).
49. Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R. & Wang, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* **86**, 147–157 (1996).
50. Susin, S. A. *et al.* Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**, 441–446 (1999).
51. Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. & Wang, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**, 33–42 (2000).
52. Hegde, R. *et al.* Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J. Biol. Chem.* **277**, 432–438 (2002).
53. Li, L. Y., Luo, X. & Wang, X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**, 95–99 (2001).
54. Wang, X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* **15**, 2922–2933 (2001).
55. Rodriguez, J. & Lazebnik, Y. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev.* **13**, 3179–3184 (1999).
56. Acehan, D. *et al.* Three-Dimensional Structure of the Apoptosome : Implications for Assembly , Procaspase-9 Binding , and Activation. *Mol. Cell* **9**, 423–432 (2002).
57. Willis, S. N. Apoptosis Initiated When BH3 Ligands Engage Multiple Bcl-2 Homologs, Not Bax or Bak. *Science (80- )*. **315**, 856–859 (2007).
58. Youle, R. J. & Strasser, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 47–59 (2008).
59. Cheng, E. H. *et al.* BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell* **8**, 705–11 (2001).
60. Jabbour, A. M. *et al.* Puma indirectly activates Bax to cause apoptosis in the absence of Bid or Bim. *Cell Death Differ.* **16**, 555–63 (2009).
61. Whelan, R. S., Kaplinskiy, V. & Kitsis, R. N. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu. Rev. Physiol.* **72**, 19–44 (2010).

62. Brocheriou, V. *et al.* Cardiac functional improvement by a human Bcl-2 transgene in a mouse model of ischemia/reperfusion injury. *J. Gene Med.* **2**, 326–33 (2000).
63. Hochhauser, E. *et al.* Bax deficiency reduces infarct size and improves long-term function after myocardial infarction. *Cell Biochem. Biophys.* **47**, 11–20 (2007).
64. Chen, M. *et al.* Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion. *J. Biol. Chem.* **276**, 30724–30728 (2001).
65. Toth, A. *et al.* Targeted deletion of Puma attenuates cardiomyocyte death and improves cardiac function during ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Hear. Circ Physiol* **291**, H52–H60 (2006).
66. Li, Z. & Sheng, M. Caspases in synaptic plasticity. *Mol. Brain* **5**, 15 (2012).
67. Miura, T. & Tanno, M. The mPTP and its regulatory proteins: Final common targets of signalling pathways for protection against necrosis. *Cardiovasc. Res.* **94**, 181–189 (2011).
68. Oerlemans, M. I. F. J. *et al.* Targeting cell death in the reperfused heart: pharmacological approaches for cardioprotection. *Int. J. Cardiol.* **165**, 410–22 (2013).
69. Halestrap, A. A pore way to die. *Nature* **434**, 578–579 (2005).
70. Dahout-Gonzalez, C. *et al.* Molecular, functional, and pathological aspects of the mitochondrial ADP/ATP carrier. *Physiology (Bethesda)*. **21**, 242–249 (2006).
71. Crompton, M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death. *J. Physiol.* **529**, 11–21 (2000).
72. Borutaite, V., Jekabsone, A., Morkuniene, R. & Brown, G. C. Inhibition of mitochondrial permeability transition prevents mitochondrial dysfunction, cytochrome c release and apoptosis induced by heart ischemia. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **35**, 357–366 (2003).
73. Baines, C. P. *et al.* Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* **434**, 658–662 (2005).
74. Kim, J., He, L. & Lemasters, J. J. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *BBRD* **304**, 463–470 (2003).
75. Bernardi, P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol. Rev.* **79**, 1127–55 (1999).
76. De Giorgi, F. D. E. *et al.* The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization 1. *FASEB J.* **16**, 607–609 (2002).
77. Precht, T. A. *et al.* The permeability transition pore triggers Bax translocation to mitochondria during neuronal apoptosis. *Cell Death and Differentiation* **12**, 255–265 (2005).

78. Baines, C. P., Kaiser, R. A., Sheiko, T., Craigen, W. J. & Molkenin, J. D. Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat. Cell Biol.* **9**, 550–555 (2007).
79. Kokoszka, J. E. *et al.* The ADP / ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature* **427**, 461–465 (2004).
80. Terrones, O. *et al.* Lipidic pore formation by the concerted action of proapoptotic BAX and tBID. *J. Biol. Chem.* **279**, 30081–30091 (2004).
81. Schafer, B. *et al.* Mitochondrial Outer Membrane Proteins Assist Bid in Bax-mediated Lipidic Pore Formation. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 2276–2285 (2009).
82. Lartigue, L. *et al.* Caspase-independent Mitochondrial Cell Death Results from Loss of Respiration, Not Cytotoxic Protein Release. *Mol. Biol. Cell* **20**, 4871–4884 (2009).
83. Shimizu, S., Narita, M. & Tsujimoto, Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **399**, 483–487 (1999).
84. Rostovtseva, T. K. *et al.* Bid, but not Bax, regulates VDAC channels. *J. Biol. Chem.* **279**, 13575–83 (2004).
85. Vandenamee P., Galluzzi L., V. den B. T. & K. G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 700–714 (2010).
86. Kung, G., Konstantinidis, K. & Kitsis, R. N. Programmed necrosis, not apoptosis, in the heart. *Circ. Res.* **108**, 1017–36 (2011).
87. Columbano, A. Cell death: current difficulties in discriminating apoptosis from necrosis in the context of pathological processes in vivo. *J. Cell. Biochem.* **58**, 181–90 (1995).
88. Gustafsson, A. B. & Gottlieb, R. A. Heart mitochondria: gates of life and death. *Cardiovasc. Res.* **77**, 334–343 (2007).
89. Boyd, J. M. *et al.* Adenovirus E1B 19 kDa and Bcl-2 proteins interact with a common set of cellular proteins. *Cell* **79**, 341–51 (1994).
90. Vasagiri, N. & Kutala, V. K. Structure, function, and epigenetic regulation of BNIP3: a pathophysiological relevance. *Mol. Biol. Rep.* **41**, 7705–7714 (2014).
91. Swiderek, E. *et al.* The interplay between epigenetic silencing, oncogenic KRas and HIF-1 regulatory pathways in control of BNIP3 expression in human colorectal cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **441**, 707–712 (2013).
92. Liu, F. *et al.* Verticillin A overcomes apoptosis resistance in human colon carcinoma through DNA methylation-dependent upregulation of BNIP3. *Cancer Res.* **71**, 6807–6816 (2011).

93. Choi, J., Kim, D. H., Jung, W. H. & Koo, J. S. Metabolic interaction between cancer cells and stromal cells according to breast cancer molecular subtype. *Breast Cancer Res.* **15**, R78 (2013).
94. Ern, Y. T. *et al.* BNIP3 as a progression marker in primary human breast cancer opposing functions in in situ versus invasive cancer. *Clin. Cancer Res.* **13**, 467–474 (2007).
95. Chen, X. *et al.* MicroRNA145 targets BNIP3 and suppresses prostate cancer progression. *Cancer Res.* **70**, 2728–2738 (2010).
96. Akada, M. *et al.* Intrinsic Chemoresistance to Gemcitabine Is Associated with Decreased Expression of BNIP3 in Pancreatic Cancer. *Clin. Cancer Res. cancer res* **11**, 3094–3101 (2005).
97. Guo, K. *et al.* Hypoxia induces the expression of the pro-apoptotic gene BNIP3. *Cell Death Differ.* **8**, 367–376 (2001).
98. Graham, R. M. *et al.* A unique pathway of cardiac myocyte death caused by hypoxia-acidosis. *J. Exp. Biol.* **207**, 3189–200 (2004).
99. Kubasiak, L. a, Hernandez, O. M., Bishopric, N. H. & Webster, K. a. Hypoxia and acidosis activate cardiac myocyte death through the Bcl-2 family protein BNIP3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 12825–30 (2002).
100. Regula, K. M. Inducible Expression of BNIP3 Provokes Mitochondrial Defects and Hypoxia-Mediated Cell Death of Ventricular Myocytes. *Circ. Res.* **91**, 226–231 (2002).
101. Graham, R. M., Thompson, J. W., Wei, J., Bishopric, N. H. & Webster, K. a. Regulation of Bnip3 death pathways by calcium, phosphorylation, and hypoxia-reoxygenation. *Antioxid. Redox Signal.* **9**, 1309–15 (2007).
102. Van de Velde, C. *et al.* BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 5454–68 (2000).
103. Hamacher-Brady, a *et al.* Response to myocardial ischemia/reperfusion injury involves Bnip3 and autophagy. *Cell Death Differ.* **14**, 146–57 (2007).
104. Kubli, D. a, Ycaza, J. E. & Gustafsson, A. B. Bnip3 mediates mitochondrial dysfunction and cell death through Bax and Bak. *Biochem. J.* **405**, 407–15 (2007).
105. Diwan, A. *et al.* Inhibition of ischemic cardiomyocyte apoptosis through targeted ablation of Bnip3 restrains postinfarction remodeling in mice. *The Journal of Clinical Investigation* **117**, 2825–2833 (2007).
106. Kubli, D. A., Quinsay, M. N., Huang, C., Lee, Y. & Gustafsson, A. B. Bnip3 functions as a mitochondrial sensor of oxidative stress during myocardial ischemia and reperfusion. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **295**, H2025–31 (2008).
107. Chen, G. *et al.* The E1B 19K/Bcl-2-binding Protein Nip3 is a Dimeric Mitochondrial Protein that Activates Apoptosis. *J Exp Med* **186**, 1975–1983 (1997).

108. Yurkova, N. *et al.* The cell cycle factor E2F-1 activates Bnip3 and the intrinsic death pathway in ventricular myocytes. *Circ. Res.* **102**, 472–479 (2008).
109. Bocharov, E. V. *et al.* Unique dimeric structure of BNip3 transmembrane domain suggests membrane permeabilization as a cell death trigger. *J. Biol. Chem.* **282**, 16256–16266 (2007).
110. Sulistijo, E. S. & MacKenzie, K. R. Sequence Dependence of BNIP3 Transmembrane Domain Dimerization Implicates Side-chain Hydrogen Bonding and a Tandem GxxxG Motif in Specific Helix-Helix Interactions. *J. Mol. Biol.* **364**, 974–990 (2006).
111. Zhang, J. & Ney, P. a. Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy. *Cell Death Differ.* **16**, 939–46 (2009).
112. Gustafsson, A. B. Bnip3 as a dual regulator of mitochondrial turnover and cell death in the myocardium. *Pediatr. Cardiol.* **32**, 267–74 (2011).
113. Matsui, Y. *et al.* Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circ. Res.* **100**, 914–22 (2007).
114. Kammouni, W., Wong, K., Ma, G., Firestein, G.S., Gibson, S.B., El-Gabalawy, H.S. Regulation of apoptosis in fibroblast-like synoviocytes by the hypoxia-induced Bcl-2 family member Bcl-2/adenovirus E1B 19-kd protein-interacting protein 3. *Arthritis Rheum* **56**, 2854–63 (2007).
115. Schmidt-Kastner, R. *et al.* Nuclear localization of the hypoxia-regulated pro-apoptotic protein BNIP3 after global brain ischemia in the rat hippocampus. *Brain Res.* **1001**, 133–42 (2004).
116. Zhang, Z., Yang, X., Zhang, S., Ma, X. & Kong, J. BNIP3 upregulation and EndoG translocation in delayed neuronal death in stroke and in hypoxia. *Stroke* **38**, 1606–1613 (2007).
117. Ha, S. D. *et al.* Mitochondrial proteins Bnip3 and Bnip3L are involved in anthrax lethal toxin-induced macrophage cell death. *J. Biol. Chem.* **282**, 26275–26283 (2007).
118. Regula, K. M., Ens, K. & Kirshenbaum, L. A. Inducible Expression of BNIP3 Provokes Mitochondrial Defects and Hypoxia-Mediated Cell Death of Ventricular Myocytes. *Circ. Res.* **91**, 226–231 (2002).
119. Debaisieux, S., Rayne, F., Yezid, H. & Beaumelle, B. The Ins and Outs of HIV-1 Tat. *Traffic* **13**, 355–363 (2012).
120. Claycomb, W. C. *et al.* HL-1 cells : A cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 2979–2984 (1998).
121. Severs, N. J. The cardiac muscle cell. *Bioessays* **22**, 188–199 (2000).

122. Stephen, M. J., Poindexter, B. J., Moolman, J. A., Sheikh-Hamad, D. & Bick, R. J. Do binucleate cardiomyocytes have a role in myocardial repair? Insights using isolated rodent myocytes and cell culture. *Open Cardiovasc. Med. J.* **3**, 1–7 (2009).
123. Sudji, I., Subburaj, Y., Frenkel, N., García-Sáez, A. & Wink, M. Membrane Disintegration Caused by the Steroid Saponin Digitonin Is Related to the Presence of Cholesterol. *Molecules* **20**, 20146–20160 (2015).
124. Benga, G. *et al.* FRACTIONATION OF HUMAN LIVER MITOCHONDRIA : ENZYMIC AND MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF THE INNER AND OUTER MEMBRANES AS COMPARED TO RAT LIVER MITOCHONDRIA. *J. Cell Sci.* **429**, 417–429 (1979).
125. Zhang, X., Bian, X. & Kong, J. The Proapoptotic Protein BNIP3 Interacts with VDAC to Induce Mitochondrial Release of Endonuclease G. *PLoS One* **3**, 1–14 (2014).
126. Agier, V. *et al.* Defective mitochondrial fusion, altered respiratory function, and distorted cristae structure in skin fibroblasts with heterozygous OPA1 mutations. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1822**, 1570–1580 (2012).
127. Yethon, J. A., Epand, R. F., Leber, B., Epand, R. M. & Andrews, D. W. Interaction with a membrane surface triggers a reversible conformational change in Bax normally associated with induction of apoptosis. *J. Biol. Chem.* **278**, 48935–48941 (2003).
128. Johnson, L. N. & Barford, D. The effects of phosphorylation on the structure and function of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **22**, 199–232 (1993).
129. Reinartz, M., Raupach, A., Kaisers, W. & Go, A. AKT1 and AKT2 Induce Distinct Phosphorylation Patterns in HL - 1 Cardiac Myocytes. *J. proteome* **13**, 4232–4245 (2014).
130. Shanmuganathan, S., Hausenloy, D. J., Duchon, M. R. & Yellon, D. M. Mitochondrial permeability transition pore as a target for cardioprotection in the human heart. *Am J Physiol Hear. Circ Physiol* **289**, 237–242 (2005).
131. Cung, T.-T. *et al.* Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction. *N. Engl. J. Med.* **373**, 1121–1131 (2015).
132. Karlsson, L. O. *et al.* Cyclosporine does not reduce myocardial infarct size in a porcine ischemia-reperfusion model. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **15**, 182–9 (2010).
133. Kim, H. *et al.* Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell* **36**, 487–99 (2009).
134. Oltvai, Z. N., Milliman, C. L. & Korsmeyer, S. J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**, 609–19 (1993).
135. Vela, L., Gonzalo, O., Naval, J. & Marzo, I. Direct interaction of Bax and Bak proteins with Bcl-2 homology domain 3 (BH3)-only proteins in living cells revealed by fluorescence complementation. *J. Biol. Chem.* **288**, 4935–46 (2013).

136. Ray, R. *et al.* BNIP3 Heterodimerizes with Bcl-2/Bcl-XL and Induces Cell Death Independent of a Bcl-2 Homology 3 (BH3) Domain at Both Mitochondrial and Nonmitochondrial Sites. *J. Biol. Chem.* **275**, 1439–1448 (2000).
137. Griffiths, E. J. & Halestrap, A. P. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem. J.* **307**, 93–98 (1995).
138. Di Lisa, F., Menabò, R., Canton, M., Barile, M. & Bernardi, P. Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore Causes Depletion of Mitochondrial and Cytosolic NAD<sup>+</sup> and Is a Causative Event in the Death of Myocytes in Postischemic Reperfusion of the Heart. *J. Biol. Chem.* **276**, 2571–2575 (2001).
139. Van de Velde, C. *et al.* BNIP3 and Genetic Control of Necrosis-Like Cell Death through the Mitochondrial Permeability Transition Pore BNIP3 and Genetic Control of Necrosis-Like Cell Death through the Mitochondrial Permeability Transition Pore. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 5454–68 (2000).
140. Saito, M., Korsmeyer, S. J., Schlesinger, P. H., Farber, D. & Hughes, H. Bax-dependent transport of cytochrom c reconstituted in pure liposomes. *Nat. Cell Biol.* **2**, 553–555 (2000).
141. Basañez, G. *et al.* Bax, but not Bcl-xL, decreases the lifetime of planar phospholipid bilayer membranes at subnanomolar concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 5492–5497 (1999).
142. Basañez, G. *et al.* Bax-type apoptotic proteins porate pure lipid bilayers through a mechanism sensitive to intrinsic monolayer curvature. *J. Biol. Chem.* **277**, 49360–49365 (2002).
143. Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B. & Martinou, J. C. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 929–935 (2000).
144. Fujio, Y., Nguyen, T., Wencker, D., Kitsis, R. N. & Walsh, K. Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Circulation* **101**, 660–667 (2000).
145. Matsui, T. *et al.* Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia in vivo. *Circulation* **104**, 330–335 (2001).

## 9 Danksagungen

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Tienush Rassaf für die Überlassung des Themas und der Gelegenheit meine Dissertation unter seiner Betreuung in der Klinik für Kardiologie anfertigen zu dürfen. Ich danke für die Möglichkeit des Erlernens vieler verschiedener und neuartiger Methoden, die anregenden Besprechungen und Diskussionen in der Arbeitsgruppe und auch für die Möglichkeit, meine Ergebnisse auf nationalen und internationalen Kongressen vortragen zu können.

Bei Prof. Dr. Ulrich Rütter bedanke ich mich für die Übernahme der Zweitbetreuung und die Bereitschaft mir jederzeit mit nützlichen Anregungen zur Seite zu stehen.

Ein großer Dank geht zudem an Dr. Ulrike Hendgen-Cotta, welche als Laborleiterin ebenfalls meine Arbeit mit betreut hat und mir dabei eine sehr große Hilfe war. Ich danke für die vielen anregenden und hilfreichen Gespräche, das Teilen des Enthusiasmus für dieses Thema und auch persönlich für Ihre Herzlichkeit dabei.

Danke an meine Kollegen des kardiologischen Labors der Klinik für Kardiologie, Angiologie und Pneumologie des Universitätsklinikums Düsseldorf und des CardioScienceLabs der Klinik für Kardiologie des Universitätsklinikums Essen für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung.

Auch danke ich dafür, dass ich ein Mitglied des Graduiertenkollegs "vivid" sein durfte. Ich möchte mich bei allen Mitgliedern für die schöne Zeit und die hilfreichen Seminare, in denen wir auch viel Spaß zusammen hatten, bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen lieben Eltern Claudia und Markus Ecken bedanken. Sie haben mir diesen Weg ermöglicht, mich moralisch, mit Ihrem Vertrauen in mich und auch finanziell unterstützt und waren mir so während meines gesamten Studiums und der Zeit als Doktorandin eine große Hilfe.

Als letztes möchte ich mich noch bei den Menschen bedanken, die mich neben meinen Eltern privat in dieser Zeit begleitet, an mich geglaubt, mitgefiebert und für Zerstreuung gesorgt haben, wie mein Verlobter Marius Esfeld.

## 10 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Sonja Ecken
Geburtsdatum	04.02.1987
Geburtsort	Viersen
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

### Studium und Schule

Seit 08/2015	Naturwissenschaftliche Doktorandin, CardioScienceLabs der Klinik für Kardiologie, Westdeutsches Herz- und Gefäßzentrum Essen, Prof. Dr. med. Tienush Rassaf
03/2012 – 07/2015	Naturwissenschaftliche Doktorandin, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, kardiologisches Labor der Klinik für Kardiologie, Angiologie und Pneumologie, Heisenberggruppe der DFG, Prof. Dr. med. Tienush Rassaf Thema: Die Rolle des Proteins BNIP3 im Myokardialen Ischämie/Reperfusionsschaden
05/2012 – 07/2015	Stipendiatin des HHU-Graduiertenkollegs vivid ( <i>in vivo</i> investigations in metabolic pathomechanisms and diseases in Düsseldorf)
03/2010 – 09/2011	Masterarbeit in der Arbeitsgruppe translationale Sarkomforschung, Innere Klinik Tumorforschung, Universitätsklinikum Essen, PD. Dr. med. Sebastian Bauer Titel: Untersuchung der Modulation von ETV1 bei Gastrointestinalen Stromatumoren (Note: 1,0)
10/2009 – 09/2011	Studium der Biochemie (Master of Science), Ruhr-Universität Bochum Schwerpunkt: Molekulare Medizin (Note: sehr gut)
05/2009 – 08/2009	Bachelorarbeit am Lehrstuhl der Zellphysiologie, Ruhr- Universität Bochum, Prof. Dr. Dr. Dr. H. Hatt Titel: Charakterisierung rekombinant exprimierter olfaktorischer Rezeptorproteine von Insekten (Note: 1,3)
10/2006 – 09/2009	Studium der Biochemie (Bachelor of Science), Ruhr-Universität Bochum (Note: gut)
08/1997 – 06/2006	Anne-Frank-Gesamtschule Viersen, Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Note: 2,0)

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Düsseldorf, den 18.01.2016

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'S. Ecken', is enclosed in a light blue rectangular box.

(Sonja Ecken)