

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

Die Rolle von BNIP3 im myokardialen  
Ischämie/Reperfusionsschaden

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Christine Angermund  
2018

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan.: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Tienush Rassaf

Zeitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Payam Akhyari

„Der Fortgang der wissenschaftlichen Entwicklung ist im Endeffekt eine ständige Flucht  
vor dem Staunen.“  
(Albert Einstein)

## 1. Zusammenfassung

Der akute Myokardinfarkt, eine der häufigsten Todesursachen weltweit [1], ist definiert als eine plötzliche Ischämie von Herzmuskelzellen, welche deren Absterben zur Folge hat [2]. Die schnelle Reperfusion des ischämischen Myokards ist essentiell für das Überleben der Kardiomyozyten, wobei es durch den Einstrom von sauerstoffreichem Blut zu einer weiteren Schädigung, dem sogenannten Reperfusionsschaden kommt. Die genauen Mechanismen sind aktuell noch Gegenstand der Forschung. Eine wichtige Rolle scheinen dabei die Proteine der *B-cell lymphoma 2* (BCL-2) Familie innezuhaben, wobei besonders das pro-apoptotische Protein *BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3* (BNIP3) in den Fokus der Herz-Kreislauf-Forschung gerückt ist. Seine Rolle im Ischämie/Reperfusionsschaden (I/R-Schaden) wurde hier *in vitro* in *heart-like-1* (HL-1) Zellen auch unter dem Aspekt seiner Tauglichkeit als Zielprotein für die Entwicklung einer pharmakologischen Therapie des Reperfusionsschadens untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass BNIP3 endogen in den Mitochondrien sowie im Zytoplasma von HL-1-Zellen vorhanden ist. Simulierte I/R (sI/R) führt zu einem Anstieg der intrazellulären Konzentration von BNIP3. Des Weiteren ergaben sich Hinweise für eine Translokation von BNIP3 zu den Mitochondrien. Gleichzeitig konnte unter sI/R eine ProteinkinaseB-abhängige Phosphorylierung von BNIP3 nachgewiesen werden. Diese scheint einen aktivierenden Einfluss zu haben. BNIP3 beeinflusst die Translokation von *B-cell lymphoma 2-associated X protein* (BAX) zu den Mitochondrien, sowie die Transformation dieses pro-apoptotischen Proteins in seine aktive Form. Für Letzteres muss BNIP3 in seiner modifizierten, phosphorylierten Form vorliegen. In einem weiteren Schritt kommt es durch BNIP3 zur Depolarisation der Mitochondrien. Im Verlauf konnte die Freisetzung von Cytochrom c sowie eine Aktivierung der Caspasen 3 und 7 nachgewiesen werden, welche sich BNIP3-abhängig darstellten. BNIP3 ist also entscheidend am Untergang von HL-1-Zellen im I/R-Schaden beteiligt und stellt somit ein mögliches pharmakologisches Zielprotein für die Entwicklung einer Therapie im Rahmen des akuten Myokardinfarktes dar. Dabei kommt besonders die aktivierende Phosphorylierung von BNIP3 mittels ProteinkinaseB als Ansatzpunkt für die weitere Erforschung eines Therapeutikums infrage.

## 2. Summary

The acute myocardial infarction, one of the most common causes of death world wide [1], is defined as a sudden ischemia of heart muscle cells, which leads to their destruction [2]. The rapid reopening of the occluded coronary arteries proves to be essential to the cardiac myocytes' survival. The influx of oxygen rich blood however results in further damage to the heart muscle; the so-called reperfusion injury. The exact mechanisms of which are still subject to research.

Proteins of the B-cell lymphoma 2 (BCL-2) family appear to play an important role in this reperfusion injury. Especially the pro-apoptotic BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3 (BNIP3) has lately been the center of attention in cardio vascular research. In this thesis the role of BNIP3 in the ischemia reperfusion injury located in heart-like-1 (HL-1) cells was investigated in an *in vitro* setting focusing especially on its aspect for a potential use as a pharmacological target in the development of a reperfusion injury therapy.

I was able to demonstrate that BNIP3 exists in the mitochondria as well as in the cytoplasm of HL-1 cells on an endogenous level. Simulated ischemia/reperfusion (sI/R) leads to an increase in the overall cellular concentration of BNIP3 as well as increased mitochondrial level of this protein. Furthermore an analysis of a cytoplasm sample revealed a decrease in the BNIP3 concentration under sI/R which points to a sI/R-induced translocation of the protein to the mitochondria. Concurrently the increase in protein kinase B dependent phosphorylation of BNIP3 influenced the translocation of B-cell lymphoma 2-associated X protein (BAX) to the mitochondria as well as the transformation of BAX to its active form. Under sI/R BNIP3 also generated depolarization of the mitochondrial membrane in the course of which cytochrom c was released into the cytoplasm followed by the activation of caspase 3 and 7.

Conclusively I conveyed BNIP3's important role in the death of HL-1 cells under ischemia/reperfusion is thus a valid target for the development of a pharmacological therapy for acute myocardial infarction; especially the protein kinase B dependent phosphorylation of BNIP3 acting as an activating switch.

### 3. Abkürzungsverzeichnis

<b>A1/BFL-1</b>	<i>BCL-2-related protein A1</i>
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>AIF</b>	<i>apoptosis inducing factor</i>
<b>AKT</b>	Proteinkinase B
<b>ANOVA</b>	<i>analysis of variance</i>
<b>ANT1</b>	<i>adenine nucleotide translocase 1</i>
<b>APA-1</b>	<i>apoptotic protease activating factor 1</i>
<b>AT1-Maus</b>	<i>atrial cardiomyocyte tumor lineage 1 mouse</i>
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>BAD</b>	<i>B-cell lymphoma 2-antagonist of cell death</i>
<b>BAK</b>	<i>B-cell lymphoma 2-antagonist/killer</i>
<b>BAX</b>	<i>B-cell lymphoma 2-associated X protein</i>
<b>BCL-2</b>	<i>B-cell lymphoma 2</i>
<b>BCL-w</b>	<i>BCL2-like protein 2</i>
<b>BCL-xL</b>	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
<b>BH</b>	<i>Btk homology</i>
<b>BID</b>	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
<b>Bis-Tris</b>	Bis(2-hydroxyethyl)-amino-tris(hydroxymethyl)-methane
<b>BNIP3</b>	<i>BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3</i>
<b>BOK</b>	<i>BCL-2 related ovarian killer</i>
<b>BSA</b>	<i>bovine serum albumin</i>
<b>C-Terminus</b>	Carboxy-Terminus
<b>Ca</b>	Calcium
<b>CCCP</b>	Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon
<b>Cys</b>	Cystein
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-phenylindole
<b>dATP</b>	Desoxyadenosintriphosphat
<b>DNS</b>	Desoxyribunucleinsäure
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>ECL</b>	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EGTA</b>	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
<b>et al.</b>	<i>et alii</i> (und andere)
<b>FACS</b>	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
<b>FADD</b>	<i>fas-associated protein with death domain</i>
<b>FAS</b>	auch <i>cluster of differentiation 95</i>
<b>FITC</b>	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
<b>H</b>	Wasserstoff
<b>h</b>	Stunde
<b>H. AKT1/2-Inhibitor</b>	<i>heart-like-1-cells</i> mit Proteinkinase-B-Inhibitor unter simulierter Ischämie/Reperfusion
<b>H. TAT-BNIP3</b>	<i>heart-like-1-cells</i> mit Fusionsprotein aus BNIP3 und TAT, der Transduktionsdomäne des <i>human immunodeficiency virus</i> unter simulierter Ischämie/Reperfusion
<b>HDL</b>	<i>high-density lipoprotein</i>
<b>HeLa-Zellen</b>	menschliche Epithelzellen aus einem Zervixkarzinom
<b>HePa</b>	<i>mouse hepatoma</i>

<b>HEPES</b>	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<b>HI</b>	<i>human immunodeficiency</i>
<b>HL1-Zellen</b>	<i>heart-like-1-cells</i>
<b>HRP</b>	<i>horseradish peroxidase</i>
<b>I/R</b>	Ischämie/Reperfusion
<b>IP</b>	Immunpräzipitation
<b>JC-1</b>	5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarocyanin Iodid
<b>kDA</b>	Kilo Dalton
<b>LDS</b>	<i>lithium dodecyl sulfate</i>
<b>MCL-1</b>	<i>induced myeloid leukemia cell differentiation protein</i>
<b>MEF</b>	<i>mouse embryonic fibroblast</i>
<b>MES</b>	<i>2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid</i>
<b>min</b>	Minuten
<b>MOMP</b>	<i>mitochondria outer membrane pore</i>
<b>mPTP</b>	<i>mitochondrial permeability transition pore</i>
<b>N</b>	Normoxie
<b>N-Terminus</b>	Amino-Terminus
<b>Na</b>	Natrium
<b>NP-40</b>	Nonylphenoethoxylat mit MO=40
<b>O</b>	Sauerstoff
<b>OMI</b>	auch <i>high temperature requirement A2</i>
<b>PBS</b>	<i>phosphate buffered saline</i>
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>pH</b>	<i>potentia Hydrogenii</i>
<b>PTCA</b>	perkutane transluminale Koronarangioplastie
<b>PUMA</b>	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
<b>RIPA</b>	<i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
<b>ROS</b>	reaktive Sauerstoffspezies
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>SD</b>	Standardabweichung
<b>SDS-Page</b>	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
<b>sI/R</b>	simulierte Ischämie/Reperfusion
<b>SMAC</b>	<i>second mitochondria-derived activator of caspases</i>
<b>SR</b>	sarkoplasmatisches Retikulum
<b>TAT-BNIP3</b>	Fusionsprotein aus Bnip3 und TAT, der Transduktionsdomäne des HI-Virus
<b>TAT-BNIP3<math>\Delta</math>TM</b>	TAT-Bnip3 $\Delta$ TM ist eine Mutante von BNIP3, welcher die Transmembrandomäne fehlt, was zu einer inhibierenden Wirkung führt
<b>TBS-T</b>	Lösung aus <i>Tris-Buffered Saline</i> und 0,1% Tween 20
<b>WB</b>	<i>Western Blot</i>
<b>XIAP</b>	<i>x-linked inhibitor of apoptosis protein</i>

## 4. Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	I
2. Summary.....	II
3. Abkürzungsverzeichnis.....	III
4. Inhaltsverzeichnis.....	V
5. Einleitung.....	1
5.1 Der akute Myokardinfarkt.....	1
5.2 Der Reperfusionsschaden.....	2
5.3 Formen des Zelluntergangs im Reperfusionsschaden.....	5
5.3.1 Nekrose.....	5
5.3.2 Die mitochondrial permeability transition pore (mPTP).....	5
5.3.3 Autophagie.....	6
5.3.4 Apoptose.....	6
5.4 Proteine der B-cell lymphoma-2 (BCL-2)-Familie.....	9
5.5 Überschneidungen.....	9
5.6 BCL-2 and adenovirus E1B 19-kDA-interacting protein3 (BNIP3).....	10
5.7 BNIP3 im I/R-Schaden.....	12
5.8 Ziel dieser Arbeit.....	13
6. Material und Methoden.....	15
6.1 Material.....	15
6.1.1 Chemikalien.....	15
6.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	16
6.1.3 Geräte.....	16
6.1.4 Software.....	17
6.2 Modell.....	18
6.3 Zellkultur.....	18
6.4 Herstellung von TAT-BNIP3.....	18
6.5 Simulierte Ischämie/Reperfusion (sI/R).....	19
6.6 Isolation von Mitochondrien und Zytoplasma.....	20
6.7 SDS-Page und Western Blot.....	21
6.7.1 Herstellung von Proteinlysaten.....	21
6.7.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	22
6.7.3 Western Blot.....	23



6.8 Immunpräzipitation (IP).....	24
6.9 JC-1- Assay.....	24
6.10 Caspase-Assay.....	25
7. Ergebnisse.....	27
7.1 Fragestellung der Arbeit.....	27
7.2 Endogene BNIP3-Konzentration.....	27
7.3 Veränderung der BNIP3-Konzentration unter si/R.....	28
7.4 Translokation von BNIP3 zu den Mitochondrien.....	29
7.5 AKT-abhängige Phosphorylierung von BNIP3.....	31
7.6 BNIP3-abhängige Translokation von BAX zu den Mitochondrien.....	32
7.7 BNIP3-abhängige BAX-Aktivierung.....	34
7.8 BNIP3-abhängiger Abfall des mitochondrialen Membranpotentials.....	35
7.9 BNIP3-abhängige Cytochrom c Freisetzung aus den Mitochondrien.....	36
7.10 BNIP3-abhängige Aktivierung der Caspasen 3 und 7.....	37
8. Diskussion.....	40
8.1 BNIP3 in HL-1-Zellen.....	40
8.2 Einfluss von BNIP3 auf BAX.....	43
8.3 Auswirkungen von BNIP3 auf die Mitochondrien.....	44
8.4 Ausblick.....	46
9. Literaturverzeichnis.....	48
10. Danksagung.....	56

## 5. Einleitung

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) schätzt, dass allein 2015 weltweit über 8 Millionen Menschen aufgrund einer chronisch ischämischen Herzerkrankung ums Leben gekommen sind [1]. Das statistische Bundesamt beziffert die Todesrate in Deutschland für diese Gruppe von Krankheiten im selben Jahr mit ca. 76.000. Akute ischämische Herzerkrankungen und Myokardinfarkte stehen in Deutschland an dritter Stelle der häufigsten Todesursachen im Jahr 2015 [3]. Aus den Statistiken geht außerdem hervor, dass mehrheitlich Einwohner westlicher Industrienationen betroffen sind [1]. Dies wird auf den besonders dort herrschenden Lebensstil aus Bewegungsmangel und Überangebot von Nahrungsmitteln zurückgeführt. Dadurch kommt es zu (stammbetonter) Adipositas, Hypertonie und Hypertriglyceridämie, welche zusammen mit verminderten HDL-Cholesterinwerten (*high density lipoprotein*) und gestörter Glukosetoleranz als metabolisches Syndrom bezeichnet werden [4]. Neben Tabakkonsum stellt dieser Symptom-Komplex den größten Risikofaktor für ischämische Herzerkrankungen dar [5, 6]. Zwar ist die Mortalität aufgrund eines akuten Myokardinfarktes durch verbesserte und strukturiertere Versorgung insgesamt rückläufig und die Anzahl an Überlebenden eines ersten Myokardinfarktes steigend. Dennoch geht dieser weiterhin mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten von Herz- Kreislauf-Erkrankungen einher [7]. Zudem zeigt die insgesamt alternde Bevölkerung und der weiterhin praktizierte kardiovaskulär-riskante Lebensstil in westlichen Industrienationen, dass auf diesem Gebiet noch Forschungsbedarf besteht.

### 5.1 Der akute Myokardinfarkt

Der akute Myokardinfarkt ist definiert als eine plötzliche Ischämie von Herzmuskelzellen, welche deren Absterben zur Folge hat [2]. Meistens geschieht dies aufgrund einer vorbestehenden arteriosklerotischen Veränderung der Herzkranzgefäße, wobei die Ruptur einer der Plaques zur Verminderung des Blutflusses und damit zur Unterversorgung des Myokards mit Sauerstoff führt [8].

Durch den Sauerstoffmangel kommt es zu einer herabgesetzten oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien, welche zu einer Reduktion der Adenosintriphosphat (ATP) Produktion, ATP-Hydrolyse und damit zum Anstieg von anorganischem Phosphat führt. Es kommt zum Verlust der myokardialen

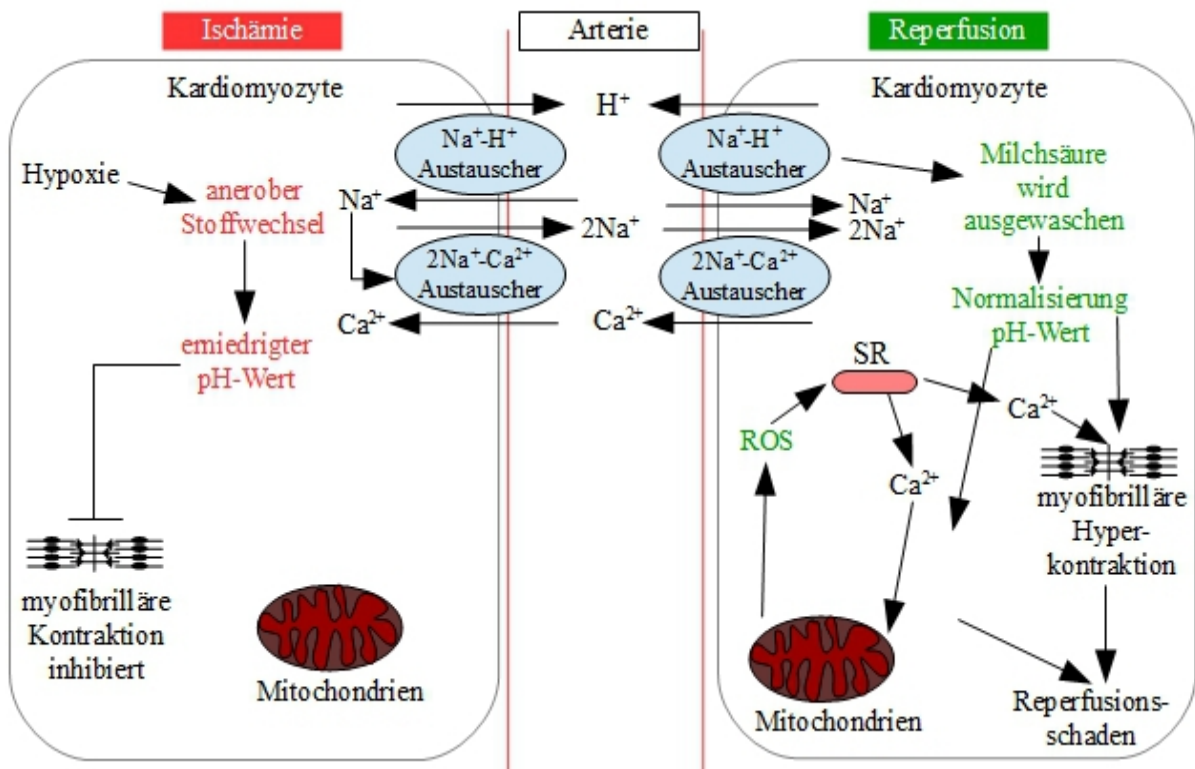
Kontraktionsfähigkeit [9]. In der Folge findet eine Umstellung des zellulären Metabolismus auf anaerobe Glykolyse statt [10], die zur vermehrten Ansammlung von Laktat in den Kardiomyozyten führt. Daraus resultiert eine Störung der intrazellulären pH-Wert-Homöostase, wodurch es zu einem Abfall des pH-Werts in den azidotischen Bereich kommt [11]. Der Anfall von Protonen aktiviert den Natrium-Protonen-Austauscher, welches einen Anstieg der Natriumkonzentration zur Folge hat. Gleichzeitig führt der ATP-Mangel zu einer verminderten Funktion der Natrium-Kalium-ATPase, die den Natriumspiegel weiter ansteigen lässt. Die Volumenregulation der Zelle wird gestört, es kommt zum osmotischen Anschwellen der Kardiomyozyte [12]. Durch den steigenden Natriumspiegel wird der Natrium-Kalzium-Austauscher aktiviert und es kommt zu einer Ansammlung von Kalzium in der Zelle [13] (Abb. 1). Daraus resultiert eine weitere Herabsetzung der myokardialen Kontraktilität. Bereits nach 20minütiger Ischämie kommt es zum Untergang von Kardiomyozyten, welcher sich wellenförmig vom Endokard zum Epikard ausbreitet [14]. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Vorgang nach ungefähr 3 Stunden abgeschlossen ist [15]. Längere Ischämiezeiten führen außerdem zur Schädigung von vaskulären Endothelzellen und damit zu einem weiteren Untergang von Gewebe [16]. Eine schnelle Wiedereröffnung der okkludierten Herzkranzgefäße mittels perkutaner transluminaler Koronarangioplastie (PTCA) bzw. thrombolytischer Therapie ist daher von essentieller Bedeutung um die Myokardfunktion zu erhalten [9].

## **5.2 Der Reperfusionsschaden**

Eine schnelle Wiedereröffnung der Koronararterien und somit frühzeitige Reperfusion des ischämischen Myokards ist entscheidend für den Erhalt von funktionalem myokardialem Gewebe und somit der linksventrikulären Funktion zur Vermeidung einer postischämischen Herzinsuffizienz [9, 14]. Dabei ist die Dauer des Gefäßverschlusses entscheidend für die Größe des ischämischen und damit dysfunktionalen Areals [15]. Paradoxerweise kommt es jedoch durch die Wiederherstellung des physiologischen Blutflusses zu weiterem, erheblichem Zelluntergang, dem sogenannten Reperfusionsschaden [17-19]. Dieser kann bis zu 50% des Infarktareals ausmachen [9]. Im Rahmen der Reperfusion können dabei folgende pathophysiologische Vorgänge beobachtet werden: es kann sowohl zu starken kardialen Arrhythmien [19, 20], als auch zu post-ischämischer myokardialer kontraktile Dysfunktion durch Kalziumüberladung der Zellen kommen [21]. Auch nach Wiedereröffnung der Koronararterien können weiterhin ischämische Areale durch

mikrovaskuläre Obstruktionen aufgrund von ischämischen Kapillarschäden oder Druck von osmotisch geschwollenen Zellen bestehen [22]. Gleichzeitig ist es aber auch möglich, dass es nach längerer Ischämiezeit und Schädigung der Endothelzellen zu Hämorrhagien kommt, welche die Dehnungsfähigkeit des betroffenen Ventrikels herabsetzen können [23, 24]. Den größten Teil des Reperfusionsschadens verursachen jedoch die metabolischen Vorgänge in den Kardiomyozyten selbst [17] (Abb. 1). Die Wiedereröffnung der okkludierten Herzkranzgefäße und Reperfusion führen zu einem Sauerstoffüberschuss im nachfolgenden Gewebe, wobei die Kardiomyozyten noch anaerobe Glykolyse betreiben [25]. In den ersten Minuten nach Reperfusion bilden sich unter anderem über die mitochondriale Atmungskette reaktive Sauerstoffspezies (ROS) [9, 26]. Durch die inkomplette Reduktion von Sauerstoff in den Mitochondrien kommt es zur Bildung von Superoxidanionradikalen, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikalen [27], welche über eine peroxidative Schädigung der Lipide unter anderem zum Funktionsverlust von zellulären Membranen führen. Dies hat durch die Schädigung des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) den Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration zur Folge. Gleichzeitig werden Enzyme und die Desoxyribonukleinsäure (DNS) oxidativ geschädigt [9].

Zum letztendlichen Untergang der Kardiomyozyte kann es auf folgenden Wegen kommen: das in der ischämischen Phase angefallene Laktat wird über den Natrium-Protonen-Antiporter und Natrium-Hydrogencarbonat-Symporter aus der Zelle geschleust, wodurch es zu einer schnellen Normalisierung des pH-Wertes kommt. Dabei führen pH-Wert-Schwankungen und hohe Kalziumkonzentrationen zur Hyperkontraktion der Kardiomyozyte, die zu deren Untergang führen können [28]. Gleichzeitig kommt es durch die Zufuhr von Sauerstoff zur Normalisierung des mitochondrialen Membranpotentials, das wiederum zur Aktivierung des Kalzium-Uniporter und zu einem Anstieg der mitochondrialen Kalziumkonzentration zur Folge hat. Dies kann die mitochondriale Zelltodaktivierung auslösen [29].



**Schematische Darstellung des Ischämie/Reperfusionsschaden in Kardiomyozyten im akuten Myokardinfarkt, Abb. 1**

Im akuten Myokardinfarkt kommt es in Abwesenheit von Sauerstoff zur Umstellung des zellulären Stoffwechsels auf anaerobe Glykolyse, welche zur Produktion von Laktat und Abfall des intrazellulären pH-Wertes führt. Dies aktiviert den Natriumionen-Wasserstoffionen ( $\text{Na}^+\text{-H}^+$ ) Austauscher, welcher  $\text{H}^+$  aus der Zelle schleust. Dies führt zur intrazellulären Überladung mit  $\text{Na}^+$  aktiviert den Natriumionen-Kalziumionen ( $2\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ ) Austauscher und führt zu einem Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Die Natriumionen-Kaliumionen-Adenosintriphosphatase ( $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ ) stellt unter Ischämie ihre Funktion ein, welches zu einem weiteren Anstieg der  $\text{Na}^+$ -Überladung führt. In der Reperfusionsphase wird die Elektronentransportkette reaktiviert, es kommt zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). ROS tragen unter anderem durch eine Beschädigung der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) durch Peroxidation der Lipide, Enzymdenaturierung und direkte oxidative Schädigung der Desoxyribonukleinsäure zum Reperfusionsschaden bei. Es kommt zum weiteren Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Die angefallene Milchsäure wird über den  $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Austauscher ausgewaschen, welches in einer schnellen Wiederherstellung des physiologischen pH-Wertes resultiert. Dies führt zur Normalisierung des mitochondrialen Membranpotentials, Anstieg des mitochondrialen  $\text{K}^+$ -Gehaltes und Zelluntergang. (nach [9]).

## 5.3 Formen des Zelluntergangs im Reperfusionsschaden

### 5.3.1 Nekrose

Nekrose wird als ungeordneter zellulärer Prozess ausgelöst durch toxische oder physikalische Schädigung beschrieben. Morphologisch ist diese Form des Zelluntergangs durch eine Vergrößerung des zellulären Volumens, das Anschwellen der einzelnen Zellorganellen, sowie die Ruptur der Zytoplasmamembran und dezente Chromatinkondensation charakterisiert [30]. Dieser auch als pathologisch beschriebene Zelluntergang führt durch die Freisetzung zytosolischer Bestandteile zu einer lokalen Inflammation [31] und weiterem Zelluntergang in der Umgebung [32].

### 5.3.2 Die *mitochondrial permeability transition pore* (mPTP)

Ein wichtiger Mechanismus, über welchen es zu nekrotischem Zelluntergang kommen kann, ist die Öffnung der *mitochondrial permeability transition pore* (mPTP). Sie ist definiert als nicht-selektiver Kanal in der inneren mitochondrialen Membran, dessen Öffnung die Depolarisation der inneren mitochondrialen Membran zur Folge hat. Durch die Unterbrechung der oxidativen Phosphorylierung kommt es zum ATP-Mangel und damit schlussendlich zum Untergang der Zelle [33-35]. Der genaue Aufbau der Pore wird kontrovers diskutiert. Lange wurde eine Zusammensetzung aus *voltage dependant anion channel* (VDAC), Cyclophilin D (CypD) und *adenine nucleotide translocator 1* (ANT1) angenommen. An *knock-out* Mäusen konnte jedoch eine Beteiligung von VDAC und ANT1 widerlegt werden [36]. Studien zu CypD konnten zeigen, dass durch die Inhibition des Proteins mittels Cyclosporin A eine Öffnung der mPTP unterdrückt werden kann [37, 38]. Gesichert ist außerdem, dass die geöffnete Pore für Moleküle bis zu einer Größe von 1,5kDA durchlässig ist [39].

Im Rahmen des Myokardinfarktes bleibt die Pore unter ischämischen Bedingungen geschlossen und öffnet erst in der Reperfusionsphase. Dies wird auf die zelluläre Überladung mit Kalzium und Phosphat, sowie oxidativen Stress, ATP-Mangel und die schnelle pH-Wert-Änderung zurückgeführt [26]. Die Öffnung der Pore führt zur Umverteilung von osmotisch wirksamen Stoffen und Wasser, welches dem osmotischem Gradienten folgt [40]. Es kommt zum Anschwellen der Mitochondrien sowie zum Abfall des mitochondrialen Membranpotentials, welches den Zusammenbruch der ATP-Produktion über die Atmungskette, für welche ein Protonengradient zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran entscheidend ist, zur Folge hat. Der Verlust von ATP führt

schließlich zusammen mit dem Verlust der Membranintegrität durch gesteigerte Protease-Aktivität zu nekrotischem Zelltod [30, 40].

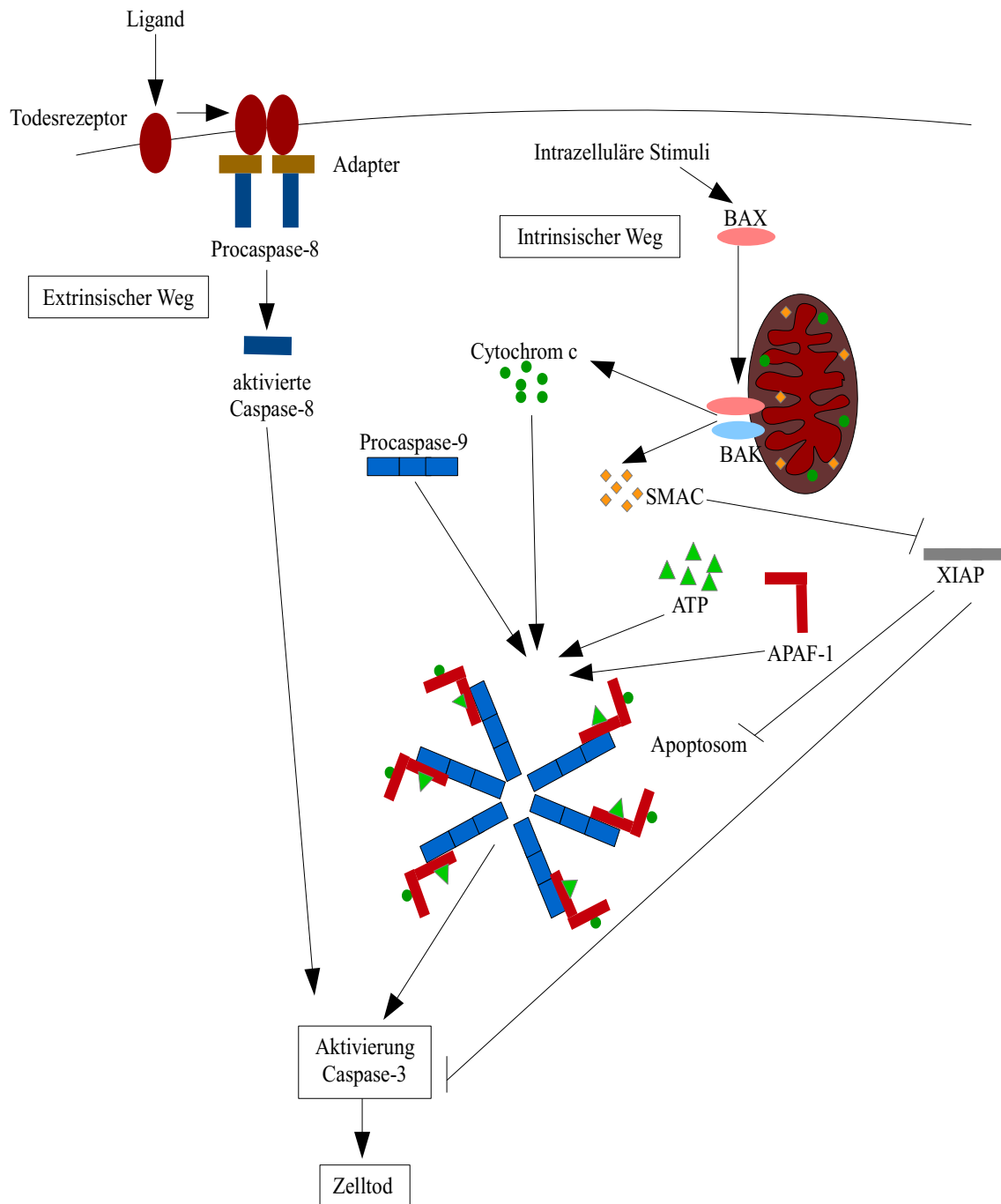
Ursprünglich dachte man, dass es im Rahmen von I/R hauptsächlich zum Zelltod durch Nekrose kommt [41]. Heute geht man jedoch davon aus, dass auch andere Formen des Zelltods entscheidend beteiligt sind [42, 43].

### **5.3.3 Autophagie**

Neben Nekrose wird auch Autophagie als möglicher Mechanismus für den Zelltod im Reperfusionsschaden diskutiert [44]. Dabei beschreibt Autophagie einen katabolen Prozess, bei dem es zur lysosomalen Zersetzung von beschädigten oder dysfunktionalen Zellorganellen kommt. Autophagie spielt physiologischerweise eine wichtige Rolle in der zellulären Homöostase [35]. Charakteristisch ist die Zersetzung von zytoplasmatischem Material durch die Aufnahme in sogenannte Autophagosomen, welche durch die Fusion mit Lysosomen durch saure Hydrolasen zersetzt werden und der Zelle so wieder als Energiequelle dienen [35, 45]. Es konnte gezeigt werden, dass es zur Steigerung von Autophagie durch mitochondriale Dysfunktion unter I/R kommt [35, 44].

### **5.3.4 Apoptose**

Eine dritte Form des Zelltods im Reperfusionsschaden stellt die Apoptose dar. Der Begriff Apoptose wurde ursprünglich von Kerr *et al.* eingeführt, um einen besonderen morphologischen Aspekt des Zelltods zu beschreiben [45, 46]. Dabei ist Apoptose definiert als physiologischer Prozess eines Organismus zur selektiven Elimination von Zellen, die nicht mehr benötigt werden bzw. beschädigt oder dysfunktional sind [46]. Der sogenannte programmierte Zelltod geht einher mit einem Schrumpfen der Zelle (*Pyknose*), Kondensation von Chromatin, Zersetzung des Nukleus (*Karyorrhexis*) und Blasenbildung der Plasmamembran (*Blebbing*). Es bilden sich sogenannte Apoptoskörper, welche durch Makrophagen abtransportiert werden [45]. Der Ablauf dieses strukturierten Zersetzungsprozesses kann über einen intrinsischen und einen extrinsischen Weg eingeleitet werden [47] (Abb. 2). Über welchen Weg die Zelle abgebaut wird, hängt sowohl von dem auslösenden Signal als auch von dem jeweiligen Zelltyp ab [48]. Im Rahmen von I/R konnten apoptotische Zellen unter Reperfusion, nicht aber unter Ischämie, nachgewiesen werden [41].



### Extrinsischer und intrinsischer Apoptosignalweg, Abb. 2

Schematische Darstellung des extrinsischen und intrinsischen Apoptosignalwegs. Beim extrinsischen Signalweg kommt es zur Bindung eines Liganden an den Todesrezeptor. Es bildet sich der sogenannte Todeskomplex, welcher über eine Aktivierung der Caspase-8 zur Aktivierung der Caspase-3 und schlussendlich zum Zelltod führt. Beim intrinsischen Weg kommt es durch intrazelluläre Stimuli zur Translokation von *B-cell lymphoma 2-associated X protein* (BAX) zu den Mitochondrien, wo es mit dem dort lokalisierten *B-cell lymphoma 2-antagonist/killer* (BAK) eine Pore in der äußeren Mitochondrienmembran bildet. Es kommt zur Freisetzung von u.a. Cytochrom c und *second mitochondria-derived activator of caspases* (SMAC). Cytochrom c bildet zusammen mit Desoxyadenosintriphosphat (dATP), *apoptotic protease activating factor 1* (APAF-1) und der Procaspase-9 ein sogenanntes Apoptosom, welches wiederum die Caspase-3 aktiviert und schlussendlich zum Zelltod führt. Gleichzeitig inhibiert SMAC *x-linked inhibitor of apoptosis protein* (XIAP), welches unter physiologischen Bedingungen die Bildung eines Apoptosoms sowie die Aktivierung der Caspase-3 unterdrückt (nach [51])



### **Extrinsischer Weg**

Der extrinsische Apoptoseweg wird durch die Bindung eines Liganden an den sogenannten Todesrezeptor ausgelöst [49]. Dabei binden der Tumornekrosefaktor (TNF) und FAS (auch *Cluster of differentiation 95* genannt) an den TNF-Rezeptor, wodurch es zur Trimerisierung des assoziiertes *Fas-Associated protein with Death Domain* (FADD)-Adaptermoleküls kommt. Dies führt zur Translokation von Procaspase-8 zum Rezeptor, welcher autokatalytisch homooligomerisiert und im Rahmen der Caspasen-Kaskade weitere Caspasen aktiviert. Letzteres wird auch als gemeinsame Endstrecke des extrinsischen und intrinsischen Apoptosewegs bezeichnet [47]. Caspasen sind Cystein-abhängige Proteasen, die Strukturproteine im Zytoplasma und Nukleus nach Aspartat spalten können [50, 51]. Der extrinsische Weg spielt im Reperfusionsschaden wahrscheinlich eine eher untergeordnete Rolle [41].

### **Intrinsischer Weg**

Der intrinsische Apoptoseweg wird auch als mitochondrial-vermittelter Weg beschrieben [49]. Ausgelöst durch intrazelluläre Signale wie ROS und erhöhte Kalziumkonzentrationen [32] kommt es zur Translokation von *B-cell lymphoma 2-associated X protein* (BAX), einem Protein der *B-cell lymphoma-2* (BCL-2) Familie, zu den Mitochondrien. Dort oligomerisiert das Protein mit dem mitochondrialen Membranprotein *B-cell lymphoma 2-antagonist-killer* (BAK), einem weiteren Protein der BCL-2-Familie. Dies führt zur Bildung der *mitochondria outer membrane pore* (MOMP) [52]. Der genaue Aufbau der MOMP ist noch Gegenstand der Forschung, es wird jedoch eine Beteiligung des ebenfalls zur BCL-2-Proteinfamilie gehörenden *BH3 interacting domain death agonist* (BID) diskutiert [53]. Durch Öffnung der Pore kommt es zur Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren wie Cytochrom c, *second mitochondria-derived activator of caspases* (SMAC), Omi (auch *high-temperature requirement A2* genannt), Endonuklease G und *apoptosis inducing factor* (AIF) ins Zytoplasma der Zelle [48]. Cytochrom c bildet mit *apoptotic protease activating factor 1* (APAF-1) und Desoxyadenosintriphosphat (dATP) bzw. ATP einen Komplex (Apoptosom), der die Caspasen-Kaskade durch Aktivierung der Caspase-9 als Ausgangsprotein in Gang setzt [41, 48]. Endonuklease G und AIF führen zu Chromatinkondensation und DNS-Fragmentierung, während SMAC und Omi Apoptoseinhibitoren wie *X-linked inhibitor of apoptosis protein* (XIAP) supprimieren und somit die Aktivität der Effektorcaspasen steigern [48]. Es konnte gezeigt werden, dass ein

großer Anteil des Zelluntergangs im Reperfusionsschaden auf diesen Weg zurückzuführen ist [41]. Eine wichtige Rolle spielen dabei die Proteine der BCL-2-Familie, welche nicht nur am Aufbau der MOMP sondern auch an ihrer Regulation beteiligt zu sein scheinen [54-56].

#### **5.4 Proteine der *B-cell lymphoma-2* (BCL-2)-Familie**

Die Proteine der Bcl-2-Familie definieren sich über ihre BCL-2 Homology (BH)-Domäne und die gemeinsame Eigenschaft Homo- und Heterooligomere bilden zu können. Sie sind wichtige Regulatoren der Apoptose, wobei sowohl pro- als auch anti-apoptotische Proteine vertreten sind [57]. Der C-Terminus nimmt die Funktion einer Transmembrandomäne ein, die eine Verankerung in der mitochondrialen Membran ermöglicht [58]. In Abhängigkeit von der Anzahl ihrer BH-Domänen können die Proteine in drei Untergruppen gegliedert werden: die erste Gruppe umfasst anti-apoptotische Proteine mit 4 BH-Domänen, zu denen unter anderem *B-cell lymphoma 2* (BCL-2), *BCL2-like protein 2* (BCL-w), *B-cell lymphoma extra large* (BCL-xL), *BCL-2-related protein A1* (A1/BFL-1) und *induced myeloid leukemia cell differentiation protein 1* (MCL-1) gezählt werden. Pro-apoptotische Proteine mit 3 BH-Domänen werden in der zweiten Untergruppe zusammengefasst (unter anderem *Bcl-2 related ovarian killer* (BOK), BAX, BAK). Die dritte und größte Gruppe umfasst sowohl pro- als auch anti-apoptotische Proteine mit einer BH-Domäne zu der BID, *B-cell lymphoma 2-antagonist of cell death* (BAD), *p53 upregulated modulator of apoptosis* (PUMA), *BCL2/adenovirus E1B 19kDA interacting protein 3* (BNIP3) und andere gehören [57].

#### **5.5 Überschneidungen**

Die klassische Trennung von Apoptose, Nekrose und Autophagie ist heute so nicht mehr aufrechtzuerhalten. Es gibt einige Überschneidungen, die ein wesentlich komplexeres und bisher unzureichend erforschtes System vermuten lassen. So konnten Lartigue *et al.* einen Caspase-unabhängigen Zelltod durch Öffnung der MOMP nachweisen [59]. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass es durch Öffnung der mPTP zu einer BAX-Translokation zu den Mitochondrien und Öffnung der MOMP kommen kann, welches einen apoptotischen Zelluntergang zur Folge hat [60]. Außerdem kann eine Öffnung der mPTP zum Platzen der äußeren Mitochondrienmembran durch starken osmotischen Wassereinstrom und Freisetzung von Cytochrom c führen. Dies hat ebenfalls einen apoptotischen Zelluntergang

zur Folge [61, 62]. Generell muss die bisherige Annahme, Nekrose sei eine unkontrollierte Form des Zelltods, revidiert werden. Es wurde gezeigt, dass die Bindung von Liganden an Todesrezeptoren wie FAS und TNF besonders in Anwesenheit von Caspase-Inhibitoren zu nekrotischem Zelltod führt [30, 63, 64]. Einige Autoren sprechen in diesem Zusammenhang auch von einer eigenständigen Form des Zelltods, der Nekroptose [65]. Sperandio *et al.* beschreiben in ihren Arbeiten eine weitere Form des nicht-apoptotischen programmierten Caspase-9-abhängigen Zelltods, der durch Bildung von Zytoplasmavakuolen und Resistenz gegen Apoptose-Inhibitoren gekennzeichnet ist [66]. Auch der Zusammenhang von Autophagie und Apoptose ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Boya *et al.* konnten nachweisen, dass es durch die Inhibition von Autophagie zu gesteigerter Apoptose-Aktivität kommt [67]. Gleichzeitig zeigte sich, dass eine gesteigerte Autophagie vor Apoptose schützen kann [68].

In der Zusammenschau entsteht der Eindruck, dass eine Vielzahl von Signalwegen zu unterschiedlichen Anteilen am Reperfusionsschaden beteiligt zu sein scheinen, wobei die genauen Mechanismen noch weiterer Forschung bedürfen. Ein interessanter Ansatzpunkt sind dabei die Proteine der BCL-2-Familie, für welche es Hinweise auf eine Beteiligung an den unterschiedlichen Signalwegen gibt [54-56]. Dabei ist besonders das pro-apoptotische Protein BNIP3 in den letzten Jahren in den Fokus gerückt.

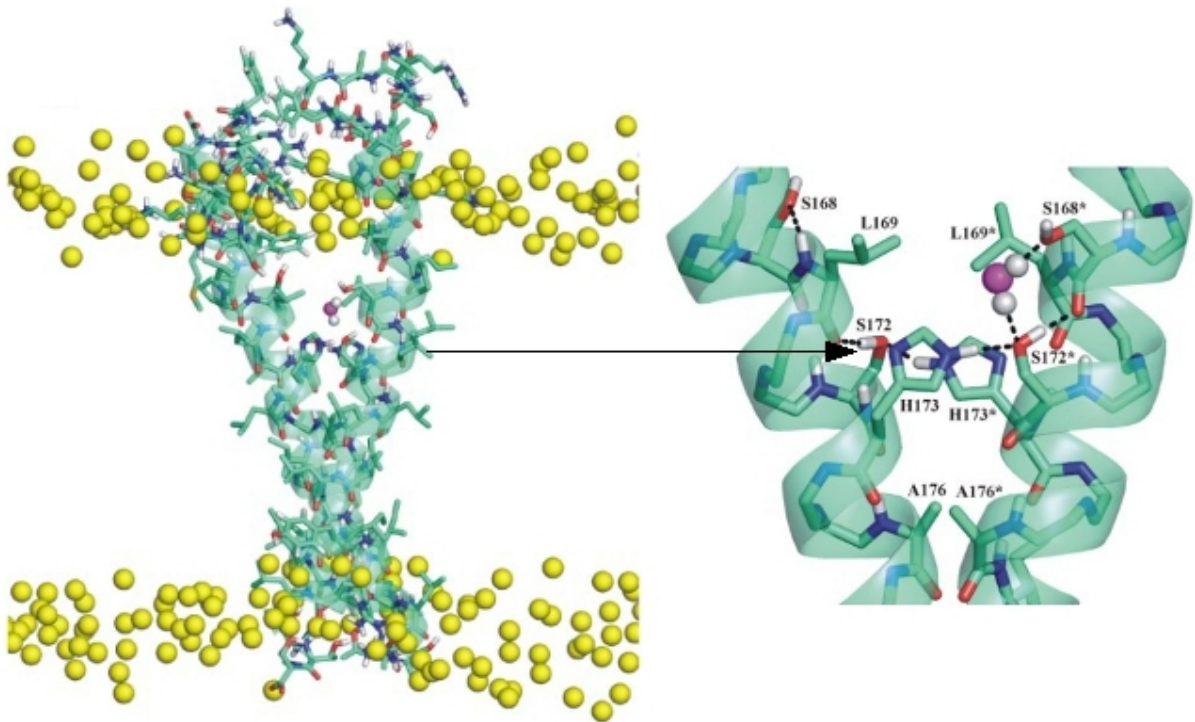
### **5.6 BCL-2 and adenovirus E1B 19-kDA-interacting protein3 (BNIP3)**

Ein Protein das bei verschiedenen Untersuchungen zum Zelltod an den unterschiedlichen Signalwegen beteiligt zu sein scheint ist BNIP3 aus der BCL2-Proteinfamilie. Es konnte zunächst in verschiedenen soliden Tumorgeweben von Organen wie Larynx [69], Brust [70], Lunge [71], Magen [72], Pankreas [73], Kolon [74], Rektum [75], Prostata [76] und Uterus [77] nachgewiesen werden. Außerdem wird ihm eine Rolle bei hypoxischen Vorgängen in Neuronen [78] sowie bei rheumatischer Arthritis zugeschrieben [79].

Das Protein selbst besteht bei einer Größe von 21,54kDA aus 194 Aminosäuren [80]. Dabei bilden die Aminosäuren 110-118 die BH-Domäne, durch welche sich das Protein der BH3-only Gruppe innerhalb der BCL-2-Proteinfamilie zuordnen lässt [81]. Die Aminosäuren 164-184 kodieren am C-Terminus eine Transmembrandomäne [82], die eine Verankerung in der mitochondrialen Membran ermöglicht und dem Anschein nach entscheidend für die pro-apoptotischen Eigenschaften ist [58]. Studien konnten zeigen, dass BNIP3 nach Entfernung oder Veränderung der Aminosäuresequenz der Transmembrandomäne keinen

Einfluss mehr auf den Untergang von Zellen hat [80, 83, 84]. Am N-Terminus weist BNIP3 einen Cysteinrest auf (Cys64), der über die Bildung einer Disulfidbrücke die Bildung von BNIP3 Homo- und Heterodimeren stabilisiert [84]. Auch scheint der N-Terminus für die Zelltod-aktivierenden Eigenschaften wichtig zu sein. So konnte gezeigt werden, dass eine Veränderungen der Aminosäuresequenz am N-Terminus zu einer verminderten Dimerisierung und damit zu reduziertem Zelluntergang führt [84].

Der genaue Mechanismus, über welchen BNIP3 am Zelltod beteiligt ist, konnte bisher noch nicht vollständig aufgeklärt werden und scheint abhängig vom jeweiligen Zelltyp. Einen ersten Hinweis konnten Bocharov *et al.* aus der Struktur des Proteins ableiten. Sie konnten nachweisen, dass BNIP3 in der äußeren Mitochondrienmembran homodimerisiert und dort strukturell eine hydrophile Pore bildet (Abb. 3). Diese ermöglicht die Passage von Wassermolekülen über die Membran, wobei die Leitfähigkeit pH-Wert-abhängig zu sein scheint [85]. In der Literatur gibt es außerdem erste Hinweise, dass die Aktivität von BNIP3 über eine posttranslationale Phosphorylierung beeinflusst werden kann [86]. Dabei soll ein Serinrest entscheidend sein [87].



***BCL2/adenovirus E1B 19kDa protein-interacting protein 3 (BNIP3) Dimer bildet hydrophile Pore in einer Lipiddoppelschicht, Abb. 3***

Schematische Darstellung eines BNIP3-Dimers in einer Lipiddoppelschicht. Die  $\alpha$ -Helices werden durch spiralförmige Bänder repräsentiert. Kohlenstoffatome sind grün, Stickstoffatome blau, Sauerstoffatome rot, Wassermoleküle magenta und Lipidköpfe gelb dargestellt. Das Bild rechts zeigt eine Vergrößerung der von den BNIP3-Dimeren gebildeten hydrophilen Pore. Die Wasserstoff-Stickstoff (HN), Kohlenstoff-Sauerstoff (CO) und Bindungen der schweren Seitenketten der Aminosäurereste Serin168, Serin172, Leucin169, Histidin173, und Alanin176 sind dargestellt. Die jeweiligen Aminosäurereste des zweiten Monomers sind mit \* gekennzeichnet. Wasserstoffbrückenbindungen werden durch gestrichelte Linien dargestellt (nach [85])

### 5.7 BNIP3 im I/R-Schaden

Seit einiger Zeit wird BNIP3 auch in der Herz- Kreislauf-Forschung vermehrt untersucht. So konnte BNIP3 in neonatalen Kardiomyozyten nach Hypoxie und in postnatalen Kardiomyozyten aus Ratten unter endogenen Bedingungen nachgewiesen werden. *Ex vivo* perfundierten Rattenherzen zeigten einen Anstieg der BNIP3-Proteinkonzentration nach Hypoxie [88-90]. *In vitro* konnte das Protein ebenfalls unter basalen Bedingungen in *heart like-1* (HL-1) Zellen detektiert werden [90]. Besonderes Interesse weckte BNIP3, als gezeigt werden konnte, dass es unter Hypoxie zu einer verstärkten Expression des Proteins in neonatalen Kardiomyozyten aus Ratten kommt [89]. Dieser Mechanismus konnte *in vitro* auch in anderen Zellen festgestellt werden [91]. Im klinischen Kontext wurden Myokardproben von Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz im

Endstadium untersucht, wobei sich ebenfalls ein Zusammenhang zwischen Ischämie und erhöhten BNIP3-Proteinkonzentrationen ergab [86]. In einem zweiten Schritt konnte außerdem ein Zusammenhang zwischen erhöhten intrazellulären BNIP3-Proteinkonzentrationen und vermehrtem Zelltod aufgezeigt werden [88-90]. Der zugrundeliegende Mechanismus scheint abhängig von der Art der Zelle und wird kontrovers diskutiert. Hamacher-Brady *et al.* konnten nachweisen, dass es unter I/R und einer erhöhten BNIP3-Expression zu vermehrtem Autophagie-ähnlichem Zelltod kommt. Dies wird als Schutzmechanismus der Zelle gegen Apoptose verstanden [44]. Kubasiak *et al.* konnten in neonatalen Kardiomyozyten aus Ratten unter I/R und Azidose gesteigerte BNIP3-Proteinkonzentrationen feststellen, welche zur Öffnung der mPTP und DNS Fragmentierung ohne Caspase-Aktivierung führten [89]. Im Gegensatz dazu konnte in postnatalen ventrikulären Ratten-Kardiomyozyten ein ähnlicher Zelltodmechanismus aufgezeigt werden, der sich aber Caspase-abhängig zeigte [88]. Analog dazu konnten Vande Velde *et al.* weder eine Aktivierung der Caspasen 3 und 9 noch die Freisetzung von Cytochrom c bei gleichzeitiger mitochondrialer Dysfunktion nachweisen. Die Zugabe von Cyclosporin A als Inhibitor der mPTP führte hier zu einer Reduktion des Zelltods [92]. Einen wichtigen Teil des BNIP3-abhängigen Signalwegs stellen möglicherweise BAX und BAK dar, wobei es über eine Öffnung der mPTP und Freisetzung von Cytochrom c (je nach Zelltyp) schließlich zum Untergang der Zelle kommt [88, 89, 92, 93]. Ein interessanter Ansatzpunkt für die Unterdrückung der Wirkung von BNIP3 scheint seine Inhibition mittels Transmembrandeletionsmutante (BNIP3 $\Delta$ TM) zu sein, durch deren Einsatz es sowohl in HL-1-Zellen [44, 90] als auch in postnatalen [88] und neonatalen Kardiomyozyten aus Ratten [89] zu reduziertem Zelltod kommt.

Wie diese Aufstellung, zeigt ist der genaue Wirkungsmechanismus von BNIP3 unter I/R noch nicht hinlänglich geklärt. Es bedarf weiterer Forschung, um seine Rolle im Reperfusionsschaden aufzuklären und gegebenenfalls einen Ansatzpunkt für eine pharmakologische Therapie zu finden.

## **5.8 Ziel dieser Arbeit**

Der akute Myokardinfarkt zählt immer noch zu den häufigsten Todesursachen weltweit [1]. Zwar ist die Mortalität durch verbesserte und strukturiertere Versorgung insgesamt rückläufig, eine effektive pharmakologische Therapie des Ischämie/Reperfusionsschadens konnte bisher aber noch nicht entwickelt werden. In den letzten Jahren hat sich die Herz-

Kreislauf-Forschung zunehmenden den Proteinen der BCL-2-Familie zugewandt [54-56], wobei besonders BNIP3 in den Fokus gerückt ist [88-90]. Es scheint in diversen Zellen an deren Untergang beteiligt zu sein und wirkt auch im kardialen I/R-Schaden Zelltod-aktivierend. Dabei wird der genaue Signalweg kontrovers diskutiert [88-90].

In dieser Arbeit soll die Rolle von BNIP3 im I/R-Schaden *in vitro* in HL-1-Zellen besonders auch im Hinblick auf sein Potential als pharmakologisches Zielprotein bei der Entwicklung eines Therapeutikums untersucht werden. Dazu sollen folgende Ziele verfolgt werden:

- 1) Untersuchung der endogenen BNIP3-Konzentration und Lokalisation sowie der Einfluss von sI/R auf diese.
- 2) Erforschung von posttranslationaler Modifikation als mögliches aktivierendes Signal für BNIP3.
- 3) Analyse des Einflusses von sI/R und BNIP3 auf BAX und seine Lokalisation.
- 4) Auswirkungen von BNIP3 auf die Mitochondrien unter sI/R mit Analyse des mitochondrialen Membranpotentials, Freisetzung von Cytochrom c und Aktivität der Caspasen 3 und 7.

## 6. Material und Methoden

### 6.1 Material

#### 6.1.1 Chemikalien

##### Flüssigkeiten

Akt1/2 Kinase Inhibitor A6730-5MG	Sigma-Aldrich, MO, USA
Albumine Standard	Thermo Scientific, IL, USA
Anti- alpha Tubulin antibody (ab176560)	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Adenine Nucleotide Translocase 1 antibody (ab110322)	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Bax (active monomer) mAb(6A7)	Enzo Life Sciences Inc., NY, USA
Anti-Bax antibody (ab7977)	Abcam, Cambridge, UK
Anti-BNIP3 antibody (ab38621)	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Cytochrome C [7H8.2C12] antibody	Abcam, Cambridge, UK
Dynabeads® Protein G (10003D)	Life Technologies AS, Oslo
Bolt® LDS Sample Buffer (4x) (B0007)	Life Technologies, CA, USA
Bolt® MES SDS Running Buffer (20x) (B0002)	Life Technologies, CA, USA
Bolt® Sample Reducing Agent (10x) (B0004)	Life Technologies, CA, USA
Brij™-35 Surfact-Amps™ Detergent Solution (85117)	Thermo Scientific, IL, USA
CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent (C10423)	Life Technologies, CA, USA
Claycomb Medium without L-Glutamine	Sigma-Aldrich, MO, USA
DC™ Protein Assay Kit II (5000112)	Bio-Rad Laboratories, CA, USA
DPBS/Modified HyClone 0,1µm Sterile Filtered	Thermo Scientific, IL, USA
Goat Anti-Mouse IgG (y), HRP	Life Technologies, CA, USA
Goat Anti-Rabbit IgG-HRP	Life Technologies, CA, USA
L-Glutamine 200mM	GE Healthcare Europe GmbH, München
MagicMark™ XP Western Protein Standard (LC5602)	Invitrogen, CA, USA
Milli-Q	Bio-Rad Laboratories, CA, USA
Mito-Lysepuffer	200mM Sucrose, 10mM HEPES, 1mM EGTA, 1% TritonX, pH7,4
MitoProbe™ JC-1 Assay Kit (M34152)	Life Technologies, CA, USA
Ms mAb to GAPDH [6C5] ab 8245	Abcam, Cambridge, UK
ProLong® Gold Antifade Mountant with DAPI (P-36931)	Life Technologies, CA, USA
Qproteome Mitochondria Isolation Kit (37612)	Qiagen, Hilden
RIPA-Puffer	50mM Tris-HCL, 150mM NaCl, 0,5mM EDTA, 1% NP-40, Proteaseinhibitor ohne EDTA 1:100
SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard (1x) (LC5925)	Invitrogen, CA, USA
Staurosporine from Streptomyces sp.	Sigma-Aldrich, MO, USA



SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (34095)	Thermo Scientific, CA, USA
SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (34080)	Thermo Scientific, CA, USA
Supplimentiertes Claycomb-Medium ( 87% Claycomb-Medium, 10% Fetal Bovine Serum Albumine (BSA), 1% Norepinephrine, 1% L-Glutamine, 1% Penicillin-Streptomycin)	Sigma-Aldrich, MO, USA
TBS-T: 20ml 20xTBS (200mM Tris, 2M NaCl, pH 7,5 mit HCl eingestellt) und 1ml 0,1% Tween 20 mit H <sub>2</sub> O auf 1l aufgefüllt	
Trypan Blue Solution 0,4%	Sigma-Aldrich, MO, USA
Trypsin-EDTA solution	Sigma-Aldrich, MO, USA
Anti-Monoamine Oxidase A antibody [EPR7101] (ab126751)	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Phosphoserine antibody (ab9332)	Abcam, Cambridge, UK
<b>Gase</b>	
5% Kohlenstoffdioxid in Stickstoff	Linde AG, Unterschleißheim
<b>Feststoffe</b>	
Milchpulver blotting Grade	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
<b>6.1.2 Verbrauchsmaterialien</b>	
6 Well Cellstar Cell Culture Plate	Sigma-Aldrich, MO, USA
96-Well ELISA Microplates	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich
Blaubrand-Zählkammer	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Bolt™ 4-12% Bis-Tris Plus Gels, 10 Well (NW04120BOX)	Life Technologies, CA, USA
Cellstar Cell Culture Flask 75cm <sup>2</sup>	Sigma-Aldrich, MO, USA
Deckgläschen	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde
iBind™ Cards (SLF1010)	Life Technologies, CA, USA
iBlot® 2 Transfer Stacks (IB23001)	Life Technologies, CA, USA
Injekt F Tuberkulin 1ml	B. Braun Melsungen AG, Wertheim
Objektträger 76mmx26mmx1mm	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde
<b>6.1.3 Geräte</b>	
BD FACS Verse™ System	BD Biosciences CA, USA
Mini Gel Tank (A25977)	Life Technologies, CA, USA
Flow BSB 6A	Gelaire Flow Laboratories, Meckenheim
Fluostar Omega	BMG Labtech GmbH, Ortenberg
iBind™ Western Device (SLF1000)	Life Technologies, CA, USA

iBlot® 2 Gel Transfer Device (IB21001)

Image Quant LAS 400

Inkubator Hera Cell 240

Mikroskop Leica DFC 450

Modular Incubator Chamber

Pipette Controller-Accurpette

Power PAC 30

Test Tube Heater SHTD

Vortex-Schüttler

Vortex-Schüttler M8-1

Wage CP225D-0CE

Wärmebad 1012

Zentrifuge Rotina 35R

Life Technologies, CA, USA

GE Healthcare Europe GmbH,  
München

Thermo Fischer Scientific, MA,  
USA

Leica Camera AG, Solms

Billups-Rothenberg Inc., CA, USA

VWR International GmbH,  
Darmstadt

Bio-Rad Laboratories, CA, USA

Bibby Scientific Limited,  
Staffordshire, UK

VWR International GmbH,  
Darmstadt

OKA Works Inc., NC, USA

Sartorius AG, Göttingen

Gesellschaft für Labortechnik GmbH  
& Co., Burgwedel

Hettich Holding GmbH & Co. oHG,  
Kirchlengern

#### **6.1.4 Software**

Flow Joe (Version 7.6.5)

Leica Application Suite V4.3

BD FACS Software (Version 1.0.5)

Image J, Image Processing and Analysis in

Java (Version 1,46r)

GraphPad Prism Version 6.05

Tree Star, Inc., CA, USA

Leica Camera AG, Solms

BD Sciences, CA, USA

National Institutes of Health, USA

GraphPad Software Inc., CA, USA

## 6.2 Modell

Als Modell wurden *heart-like-1-cells* (HL-1-Zellen) verwendet, eine Zelllinie von atrialen Kardiomyozyten-Tumorzellen der *atrial cardiomyocyte tumor lineage 1 mouse* (AT1-Maus). Die Zellen sind hinsichtlich ihrer morphologischen, biochemischen und elektrophysiologischen Eigenschaften mit regulären Kardiomyozyten vergleichbar [94].

## 6.3 Zellkultur

Die adhärent-wachsenden Zellen wurden in mit Gelatin-Fibronectin beschichteten Gewebekulturflaschen mit gewinkeltm Hals und Filterdeckel im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Gearbeitet wurde unter einer sterilen Arbeitsbank mit laminarer Luftströmung. Die Zellen wurden in supplementiertem Claycomb-Medium (siehe Tab. Seite 16) gehalten, das täglich gewechselt wurde. Alle 7 Tage erfolgte eine 1/3 Spaltung der Zellpopulation. Dazu wurde zunächst das gesamte Medium entfernt und Medienreste durch Waschen mit 37°C warmer *phosphate buffered saline* (PBS) Lösung entfernt, die Zellen mit Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure-Lösung (Trypsin-EDTA-Lösung) abgelöst, bei 500xg, 5min, Raumtemperatur (RT) (Hettich/Rotina 35R) abzentrifugiert, in frisches Medium aufgenommen und in eine neue Gewebekulturflasche überführt.

## 6.4 Herstellung von TAT-BNIP3

Um die Zelltod-aktivierenden Mechanismen von BNIP3 untersuchen zu können, wurde über die Zugabe von BNIP3 (TAT-BNIP3) ein Überschuss des Proteins erzeugt. Die TAT-Sequenz stammt aus dem *human immunodeficiency* (HI) Virus und ermöglicht dem Protein über die Zellmembran in die Zelle zu gelangen [95, 96].

Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Raphael Stoll, Biomolekulare NMR, Ruhr-Universität Bochum, übernahm dabei die Klonierung der Plasmide für die Expression von TAT-BNIP3 in E. Coli-Bakterien und Etablierung des Protokolls für die nachfolgende Aufreinigung.

Bei der Klonierung wurde pGEX 48-1 als Ausgangsvektor verwendet und eine Ampicillin-Resistenz zur Selektion eingefügt. Folgendes Proteinprodukt wurden kodiert:

HIS(6x)-TAT-BNIP3-Intein

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Tienush Rassaf, Klinik für Kardiologie, Angiologie und Pneumologie, Uniklinikum Düsseldorf fand die Expression und die Aufreinigung mittels Nickel-Nitrilotriessigsäure-Affinitätschromatographie statt, wobei der Intein-Tag entfernt

wurde. Die entstandenen Proteine weisen folgende Aminosäuresequenzen auf:

TAT-BNIP3:

HHHHHHGRKKRRRQRRRPQMSQSGEENLQGSWVELHFSNGNGSSVPASVSIYNGD  
MEKILLDAQHESGRSSSKSSHCDSPPRSQTPQDTNRAEIDSHSFGKKNSTLSEEDYIE  
RRREVESILKKNSDWIWDWSSRPENIPPKEFLFKHPKRTATLSMRNTSVMKKGIFG  
ADFLKVFLPSLLLSHLLAIGLGIYIGRRLTTSTSTF

### **6.5 Simulierte Ischämie/Reperfusion (sI/R)**

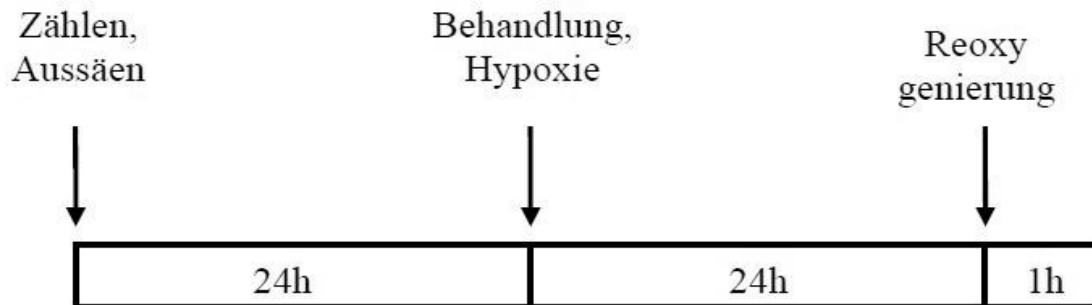
Um den Einfluss von BNIP3 auf den Zelltod von HL-1-Zellen unter Hypoxie/Reoxygenierung zu untersuchen, wurden die Zellen mittels einer speziell angefertigten Kammer in hypoxische Bedingungen gebracht und anschließend reoxygeniert.

Dazu wurden jeweils 1,5 Millionen Zellen in 6-*Wells* ausgesät, wobei jeweils 2 6-*Wells* zu einer Probe von insgesamt 3 Millionen Zellen zusammengefasst wurde. Die Anzahl der Zellen wurde mit Hilfe einer Neubauerkammer bestimmt. Zur Überprüfung der Vitalität der Zellen wurden diese zuvor mit Tryphanblau, einem Diazofarbstoff, welcher in Zellen mit beschädigter Zellmembran diffundiert und diese blau darstellt, angefärbt. Die Zellen wuchsen über Nacht an, wonach eine Behandlung nach folgendem Schema folgte:

1. In supplementiertem Claycomb-Medium unter Normoxie:
  - 1.1. Kontrolle
  - 1.2. TAT-BNIP3 0,5mM
2. In supplementiertem Claycomb-Medium unter Hypoxie:
  - 2.1. Kontrolle
  - 2.2. TAT-Bnip3 0,5mM
  - 2.3. AKT1/2-Inhibitor 10µM
  - 2.4. TAT-BNIP3 0,5µM + AKT1/2-Inhibitor 10µM

Zur Generierung der hypoxischen Bedingungen wurden die Zellen in den 6-*Well*-Platten ohne Deckel in eine Hypoxiekammer (Billups-Rothenberg/*Modular incubator chamber*) gesetzt und 5 Minuten mit 5% Kohlendioxid in Stickstoff begast. Anschließend wurde die Hypoxiekammer verschlossen und in den Inkubator (37°C) gestellt. Nach 24-stündiger Inkubation erfolgte eine Reoxygenierung der Zellen. Dazu wurden die Zellen aus der

Hypoxiekammer entnommen und mit frischem supplementiertem Claycomb-Medium für eine Stunde in den Inkubator gestellt. Daraus ergibt sich folgendes Hypoxie-Reoxygenierungs-Schema (Abb. 4):



**Hypoxie-Reoxygenierungs-Schema, Abb. 4**

Dieses Schema wurde zur Simulation von Ischämie/Reperfusion in *heart-like-1-cells* (HL-1-Zellen) implementiert. h=Stunde(n)

## 6.6 Isolation von Mitochondrien und Zytoplasma

Zur Isolation der Mitochondrien und des Zytoplasmas aus HL-1-Zellen wurde das *Kit Qproteome Mitochondria Isolation* (Qiagen/37612) nach Herstellerangaben verwendet. Dazu wurden die Zellen in jeweils 500µl *Lyse-Buffer* (+ Proteaseinhibitor 1:100) abgekratzt. Anschließend erfolgte eine 10minütige Inkubation der Proben auf einem Überkopfschüttler. Im Anschluss wurde das Zytoplasma abzentrifugiert (1000xg, 4°C, 10min). Das Pellet wurde in 1ml *Disruption-Buffer* (+ Proteaseinhibitor 1:100) resuspendiert und durch mehrmaliges Aufziehen durch eine Kanüle die restlichen Zellbestandteile weiter aufgeschlüsselt. Es folgte erneut eine Zentrifugation (1.000xg, 4°C, 10min). Hierbei wurde der Zellschrott von den sich nun im Überstand befindenden Mitochondrien getrennt. Mittels Zentrifugation (6.000xg, 4°C, 10min) wurden die Mitochondrien pelletiert. Zur Aufreinigung wurden die Mitochondrien in 1ml *Storage-Buffer* resuspendiert und erneut abzentrifugiert (6.000xg, 4°C, 20min). Die pelletierten Mitochondrien wurden bis zu weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

## 6.7 SDS-Page und Western Blot

### 6.7.1 Herstellung von Proteinlysaten

#### Vollzell-Lysate

Zur Herstellung von Vollzell-Lysaten wurden die Zellen in *radioimmunoprecipitation assay buffer* (RIPA) Puffer versetzt mit Phosphatase- und Proteaseinhibitoren (1:100) abgekratzt, für 1h bei 4°C auf dem Rotator lysiert und anschließend für 15min bei 14.000rpm (Hettich/Rotina 35R) zentrifugiert. Der Überstand, welcher die Proteine der Zellen enthält, wurde abgenommen und im Weiteren verwendet.

#### Mitochondrien-Lysate

Zur Isolation der Proteine aus den Mitochondrien wurden diese nach der Isolation in 100µl Mito-Lysepuffer (siehe Seite 15) mit Proteaseinhibitor 1:100 resuspendiert, 1h bei 4°C auf dem Rotator lysiert und 15min bei 14.000rpm (Hettich/Rotina 35R) abzentrifugiert. Der Überstand wurde mittels SDS-Page/Western Blot untersucht.

#### Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das DC™ Protein Assay Kit II (Bio-Rad/5000112) verwendet. Der Assay beruht auf der Methode nach Bradford. Hierbei wird ein Farbstoff eingesetzt, der in Folge einer Interkalation mit den Proteinen sein Absorptionsmaximum ändert. Die Erstellung einer Standardgeraden ermöglicht das Abschätzen der Proteinkonzentration der Proben. Die Standardgerade wurde wie folgt angesetzt (Tabelle 1):

**Tabelle 1 Zusammensetzung der Standardgeraden zur Abschätzung der Proteinkonzentration**

BSA = *bovine serum albumine*

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
BSA (2mg/ml)	0	10	20	40	50	60	70	75	100
H <sub>2</sub> O	100	90	80	60	50	40	30	25	0
BSA-Konzentration (mg/ml)	0	0,2	0,4	0,8	1,0	1,2	1,4	1,5	2,0

Es wurden jeweils 5µl der Proben und Standards in einem dreifachen Ansatz in eine 96-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurde zu jeder Probe je 25µl *Working Reagenz A*' (20µl Reagenz S in 1ml Reagenz A) und 200µl Reagenz B gegeben. Nach einer 15minütigen Inkubationszeit im Dunkeln wurde die Absorption der Proben und Standards bei 750nm gemessen und daraus die Proteinkonzentration berechnet.

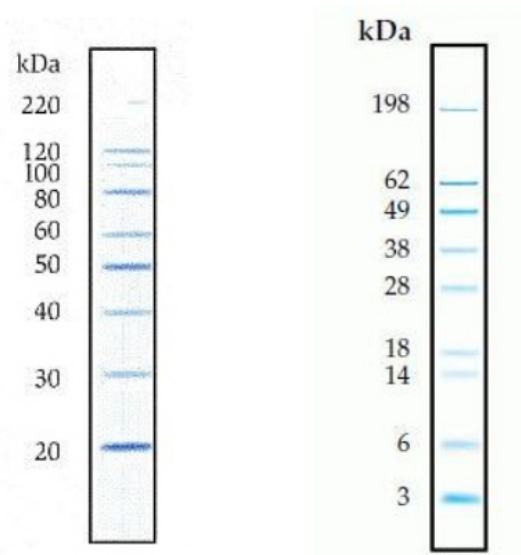
Zur Vorbereitung des Western Blots wurden die Proben auf eine Proteinkonzentration zwischen 8-20µg/20µl eingestellt und mit ¼ Volumen *Bolt® LDS Sample Buffer* (4x) (Life Technologies/B0007) und 1/10 Volumen *Bolt® Reducing Agent* (10x) (Life Technologies/B0004) versetzt. Der *Bolt® LDS Sample Buffer* überdeckt die Eigenladung der Proteine und das DTT-haltige *Bolt® Reducing Agent* reduziert die Disulfidbrückenbindungen der Proteine. Die Proben wurden für 10min bei 70°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt.

### **6.7.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)**

Bei der SDS-Page werden die Proteine nach ihrer Größe gelelektrophoretisch aufgetrennt, wobei die kleineren Proteine in Abhängigkeit von der angelegten Spannung schneller durch das Gel wandern.

Für diesen Schritt wurde das *Mini Gel Tank System* (Life Technologies/A25977) verwendet. Der Puffer setzte sich dabei aus 50ml *Bolt® MES-SDS-Running-Buffer* (20x) (Life Technologies/B0002) und 950ml H<sub>2</sub>O zusammen. Als Gel wurde das *Bolt™ 4-12% Bis-Tris Plus Gels* (Life Technologies/Katalognr.: NW04120BOX) verwendet. Das Gel lief für 30 Minuten bei einer angelegten Spannung von 200V.

Neben den Proben liefen ebenfalls zwei Marker mit: *SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard* (1x) (Invitrogen/LC5925) und *MagicMark™ XP Western Protein Standard* (Invitrogen/LC5602), welche das Abschätzen der Bandengrößen der Proben im Anschluss ermöglicht. Diese stellten sich wie folgt dar (Abb. 5):



**Marker in der sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-Page Gelelektrophorese), Abb. 5**

links: MagicMark™ XP Standard visualized with Coomassie stain on an SDS-PAGE gel (Invitrogen / LC5602), rechts: SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Protein Standard on a NuPAGE R 4 - 12% Bis-Tris Gel (Invitrogen / LC5625).

### 6.7.3 Western Blot

Zum immunologischen Nachweis der aufgetrennten Proteine wurden diese mit Hilfe des *iBlot® 2 Gel Transfer Device* (Life Technologies/IB21001) mittels Spannung auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Nach 5minütiger Inkubation des Gels in 20% Ethanol wurde dieses auf die Nitrozellulosemembran des *iBlot® Transfer Stacks* (Life Technologies/IB23001) gelegt. Die Laufzeit des Transfers betrug 7min bei einer angelegten Spannung von 20V für 1min, 23V für 4min und 25V für 2min.

Anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Membran über eine 30 – 60minütige Inkubation in *Blocking Solution* (5% Milchpulver in TBS mit 0,1% Tween/TBS-T) geblockt.

Die Membran wurde nun mit dem je nach Fragestellung entsprechenden Erstantikörper in 3% *bovine serum albumin* (BSA) in TBS-T über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert.

Der Antikörper bindet dabei an das darzustellende Protein. Auf die 4x10min Waschung mit TBS-T folgte am nächsten Tag die Inkubation mit dem Spezies-spezifischen Zweitantikörper (1h, RT), welcher an den Erstantikörper bindet. Nach der Inkubation mit dem Zweitantikörper wurde die Membran erneut 4x10min in TBS-T gewaschen und im



Anschluss belichtet. Dazu wurde die Membran mit der Belichtungslösung *SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (Thermo Scientific/34095) bzw. *SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Scientific/34080) inkubiert und im ImageQuant LAS 400 (GE Healthcare Life Sciences) ausgewertet. Alle Sekundärantikörper waren *horseradish peroxidase* (HRP) konjugiert. Diese Peroxidase katalysiert die Chemolumineszenzreaktion von Luminol. Die Belichtungslösung enthält das HRP-Substrat, wodurch es zur Entstehung von Chemolumineszenz an der Stelle auf der Membran kommt, an die der Sekundärantikörper gebunden hat. Bei einigen Versuchen wurde der Western Blot mit Hilfe des *iBind™ Western Device* (Life Technologies/SLF1000) durchgeführt.

### **6.8 Immunpräzipitation (IP)**

Zur Isolation des BNIP3-Proteins aus den Vollzell-Lysaten wurde eine Immunpräzipitation mit magnetischen *Dynabeads* (Life Technologies/10003D) durchgeführt. Dazu wurden je 100µl Proteinlysate mit 1µg/ml *Anti-BNIP3 antibody* (Abcam/ab38621) und 0,005% Brij35 (Thermo Scientific/85117) über Nacht bei 4°C auf dem Rotator inkubiert. Hierbei kommt es zu einer Bindung des Antikörpers an BNIP3. Anschließend erfolgte die Bindung der Antikörper-BNIP3-Konjugate an die magnetischen *Dynabeads* (Life Technologies/10003D). Dazu wurden 20µl *Beads* dazu gegeben und erneut auf dem Rotator für 1h bei 4°C inkubiert. Mit eiskalter PBS-Lösung versetzt mit 0,005% Brij35 wurden die *Beads* im Anschluss gewaschen. Dazu wurde ein Magnet verwendet, an den die *Beads* binden und so eine Entfernung der Lösung ohne die *Beads* ermöglicht. Zur Elution der Antikörper-BNIP3-Konjugate von den *Beads* wurden diese in ¼ Volumen *Bolt® LDS Sample Buffer* (4x) (Life Technologies/B0007) und 1/10 Volumen *Bolt® Reducing Agent* (10x) (Life Technologies/B0004) resuspendiert und für 10min auf 95°C erhitzt. Die abgelösten *Beads* wurden über den Magneten entfernt und verworfen. Die Proben wurden im Anschluss mittels SDS-Page/Western Blot untersucht.

### **6.9 JC-1- Assay**

Die Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials wurde mittels *MitoProbe™ JC-1 Assays Kit* (Life Technologies/M34152) durchgeführt. 5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarocyanin Iodid (JC-1) ist ein membranpermeabler, grün fluoreszierender Cyanin-Farbstoff, welcher in die Matrix von Mitochondrien mit einem

physiologischen Membranpotential aufgenommen wird und hier konzentrationsabhängig akkumuliert, was mit einem Farbumschwung in den roten Fluoreszenzbereich einher geht. Die Änderung des mitochondrialen Membranpotentials führt zu einem Ausschluss von JC-1 aus den Mitochondrien, was mit einer Auflösung der JC-1 Aggregate und einem Umschwung zurück in den grünen Fluoreszenzbereich einher geht.

Für diesen Assay wurden jeweils 500.000 Zellen auf einem Deckgläschen ausgesät, über Nacht anwachsen gelassen und dann wie folgt behandelt:

1. In supplementiertem Claycomb-Medium unter Normoxie:
  - 1.1. Kontrolle
  - 1.2. Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon (CCCP) Kontrolle
  - 1.3. TAT-BNIP3 0,5mM
2. In un-supplementiertem Claycomb-Medium unter Hypoxie:
  - 2.1. Kontrolle
  - 2.2. TAT-BNIP3 0,5mM

Das si/R-Schema entspricht dabei mit 24h Hypoxie und 1h Reoxygenierung dem oben Beschriebenen. Als Kontrolle wurden die Zellen 15min bei 37°C mit 50µM CCCP inkubiert, wobei CCCP durch Entkopplung der Atmungskette zum Zelltod führt. Danach wurden die Proben 30min bei 37°C mit 6µM JC-1 behandelt, mit 37°C warmer PBS-Lösung gewaschen und mit 4% Paraformaldehyd (PFA) Lösung für 15min bei RT fixiert. Die Deckgläschen wurden mit *ProLong® Gold Antifade Mountant with DAPI* (Life Technologies/P-36931) auf Objektträgern befestigt und über Nacht unter Lichtausschluss bei RT trocknen gelassen.

Die JC-1-negativen und somit depolarisierten Mitochondrien aufweisenden Zellen wurden an jeweils 5 Punkten immer nach demselben Schema unter einem Leica DFC 450 Mikroskop im *Fluorescein Isothiocyanate* (FITC) Kanal gezählt und die Anzahl an negativen Zellen in Vergleich zu der Gesamtzahl an Zellen, welche über 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ermittelt wurden, in Relation gesetzt.

### **6.10 Caspase-Assay**

Die Aktivität der Caspasen 3 und 7 als Indikatoren für Zelltod wurden mit Hilfe des *CellEvent™ Caspase -3/7 Green Detection Reagent Kits* (Life Technologies/C10423)

bestimmt. Das *Caspase-3/7 Green Detection Reagent* ist ein zellpermeabler DNS-interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, an den ein 4 Aminosäuren (DEVD) langes Peptid gekoppelt ist, welches die Bindung an die DNS verhindert. Aktivierte Caspasen 3 und 7 sind in der Lage das Peptid zu spalten, was die Bindung des Farbstoffs an die DNS ermöglicht und zu einem Fluoreszenzsignal mit einem Absorptions-/Emissionsmaximum von ~ 511/533nm führt.

Für diesen Assay wurden jeweils 500.000 Zellen auf Deckgläschen ausgesät, über Nacht anwachsen gelassen und dann wie folgt behandelt:

3. In supplementiertem Claycomb-Medium unter Normoxie:

3.1. Kontrolle

3.2. Kontrolle Staurosporin 1µM

3.3. TAT-BNIP3 0,5mM

4. In un-supplementiertem Claycomb-Medium unter Hypoxie:

4.1. Kontrolle

4.2. TAT-BNIP3 0,5mM

Das si/R-Schema entspricht dabei mit 24h Hypoxie und 1h Reoxygenierung dem oben Beschriebenen. Die Kontrolle wurde 4h bei 37°C mit 1µM Staurosporin, einem Proteinkinaseinhibitor, welcher über Blockierung der ATP-Bindungsstelle zum Zelltod führt, behandelt. Danach wurden die Zellen 30min bei 37°C mit 5µM *CellEvent<sup>TM</sup> Caspase-3/7 Green Detection Reagent* (Life Technologies/C10423) inkubiert, anschließend mit 37°C PBS-Lösung gewaschen und mit 4%iger PFA-Lösung für 15min bei RT fixiert. Die Deckgläschen wurden mit *ProLong<sup>®</sup> Gold Antifade Reagent with DAPI* (Life Technologies/P-36931) auf Objektträgern befestigt und über Nacht unter Lichtausschluss bei RT trocknen gelassen.

Die positiven Zellen wurden an jeweils 5 Punkten immer nach demselben Schema unter Verwendung des Mikroskops DFC 450 (Leica) im FITC-Kanal gezählt und die Anzahl an positiven Zellen in Vergleich zu der Gesamtzahl an Zellen, welche über DAPI ermittelt wurden, in Relation gesetzt.

## 7. Ergebnisse

Bei einem Myokardinfarkt kommt es im Rahmen der erfolgreichen und zeitnahen Wiedereröffnung der okkludierten Koronararterien zu einem Überschuss an Sauerstoff im nachfolgenden Gewebe. Dieses führt zu einem zusätzlichen Myokardschaden [97]. Die genauen biochemischen und metabolischen Vorgänge sind bis heute noch nicht hinlänglich geklärt, sodass noch keine adäquate pharmakologische Therapie des sogenannten Reperfusionsschadens entwickelt werden konnte.

### 7.1 Fragestellung der Arbeit

In dieser Arbeit wurde die Rolle von BNIP3 im Reperfusionsschaden anhand von HL-1-Zellen unter simulierter Ischämie/Reoxygenierung *in vitro* untersucht. Dabei wurden exemplarisch als Marker für den Zelluntergang die Translokation und Aktivierung von BAX, die Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials, die Freisetzung von Cytochrom c und die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 untersucht.

### 7.2 Endogene BNIP3-Konzentration

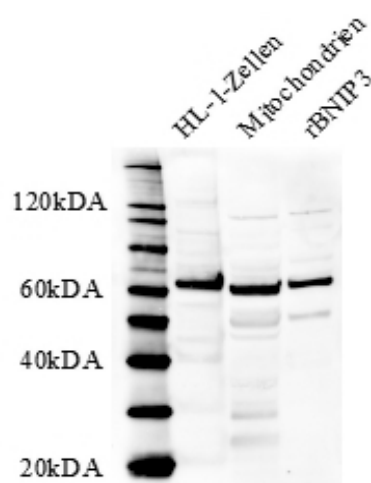
Um die biochemischen und metabolischen Vorgänge nach Wiedereröffnung eines okkludierten Herzkranzgefäßes *in-vitro* untersuchen zu können, wurden HL-1-Zellen auf Grund ihrer Ähnlichkeit zu humanen Kardiomyozyten als Modell ausgewählt [97]. In der Literatur finden sich Hinweise, dass BNIP3 endogen in HL-1-Zellen vorliegt [90].

Um diese Hinweise näher zu untersuchen, wurden zunächst das Vorliegen sowie die endogene Konzentration des Proteins in HL-1-Zellen analysiert. Hierzu wurden einmalig ein Vollzelllysat und ein Mitochondrienisolat mittels SDS-PAGE/Western Blot analysiert. Als Kontrolle diente rekombinantes BNIP3. Es konnte gezeigt werden, dass BNIP3 in HL-1-Zellen unter basalen Bedingungen (25h Normoxie) in einer Konzentration von 118,02µg/3Mio Zellen vorliegt. In den isolierten Mitochondrien konnte unter basalen Bedingungen eine Konzentration von 32,9µg/3Mio Zellen ermittelt werden (Tabelle 2). Es zeigte sich außerdem, dass BNIP3 unter nicht-reduzierenden Bedingungen in Form eines Dimers mit einer Größe von 60kDa vorliegt (Abb. 6). Dies untermauert die Hinweise aus der Literatur, dass BNIP3 endogen in HL-1-Zellen vorliegt.

**Tabelle 2 Endogene *BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3* (BNIP3) Konzentration**

Berechnung der endogenen BNIP3-Konzentration unter basalen Bedingungen (Normoxie) an Hand von *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE)/*Western Blot* (WB) Analysen in *heart-like-1-cells* (HL-1-Zellen) und Mitochondrienisolaten im Vergleich zu rekombinantem BNIP3 (rBNIP3).

Probe	Verdünnung	Protein-gehalt	Pixel-intensität Western Blot	%	µg / Tasche	µl eingesetzt	Verdünnungs-faktor	µg/6-Well (3Mio Zellen)
rBNIP3		3µg	25235635	100	3			
Vollzelllysate	in 200µl	30µg	75515401	299,24	8,97	15,2	13,16	118,02
Mitochondrien-isolat	in 500µl	30µg	14867167	58,91	1,77	26,9	18,59	32,9



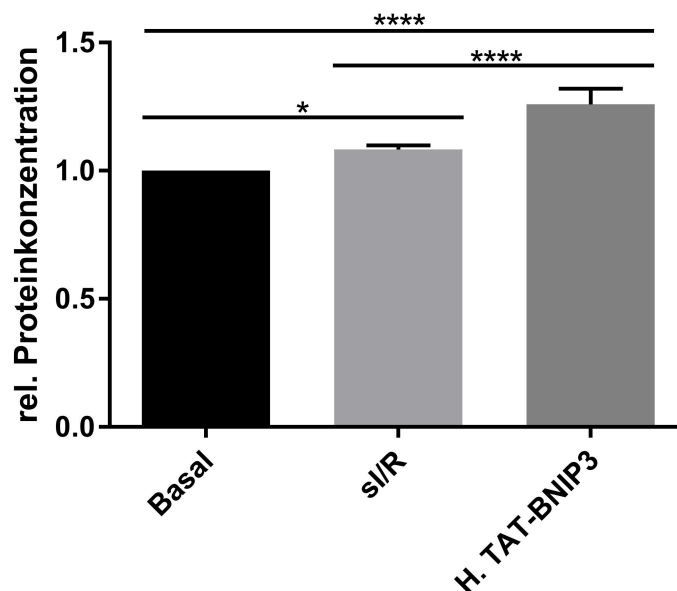
**Endogene *BCL2/adenovirusE1B 19 kDa protein-interacting protein 3* (BNIP3) Konzentration, Abb. 6**

*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) /*Western Blot* (WB) Analyse der BNIP3-Konzentration unter basalen Bedingungen (Normoxie) in *heart-like-1-cells* (HL-1-Zellen) und Mitochondrienisolaten im Vergleich zu rekombinantem BNIP3 (rBNIP3).

### 7.3 Veränderung der BNIP3-Konzentration unter si/R

In einem zweiten Schritt wurde der Einfluss von si/R auf die Konzentration von BNIP3 in HL-1-Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen in Zellkultur si/R (24h Ischämie/1h Reoxygenierung) ausgesetzt und die Zelllysate anschließend mittels SDS-PAGE/Western Blot analysiert (Abb. 7). Unter diesen Bedingungen zeigte sich ein signifikanter Anstieg der BNIP3-Konzentration in den HL-1-Zellen im Vergleich zu den unter basalen Bedingung (25h Normoxie) gehaltenen Zellen (Basal=1; si/R=1,083±0,016, p=0,012).

Um im weiteren Verlauf den Effekt von BNIP3 besser untersuchen zu können, wurde außerdem mit dem Fusionsprotein TAT-BNIP3 gearbeitet. Dabei handelt es sich um BNIP3, welches an die TAT-Sequenz des HI-Virus gekoppelt ist. Diese ermöglicht es dem Protein, über die Zellmembran in die Zelle zu gelangen [95, 96] und so intrazellulär ein Überangebot von BNIP3 zu erzeugen. Es zeigte sich, dass die exogene Zufuhr von TAT-BNIP3 unter sI/R zu einem signifikanten Anstieg von BNIP3 in den Zellen im Vergleich zu unter sI/R gehaltenen Zellen führt (H.TAT-BNIP3=1,259±0,062, p=<0,0001). Dass das Fusionsprotein von den HL-1-Zellen aufgenommen wird, zeigte sich über den Anstieg der Gesamt-BNIP3-Proteinkonzentration nach Zugabe (Basal/H.TAT-BNIP3 p=<0,0001). Es kommt also unter sI/R zu einem Anstieg der intrazellulären BNIP3-Konzentration.



**Veränderung der *BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3 (BNIP3)* Konzentration unter simulierter Ischämie/Reperfusion (sI/R, H), Abb. 7**

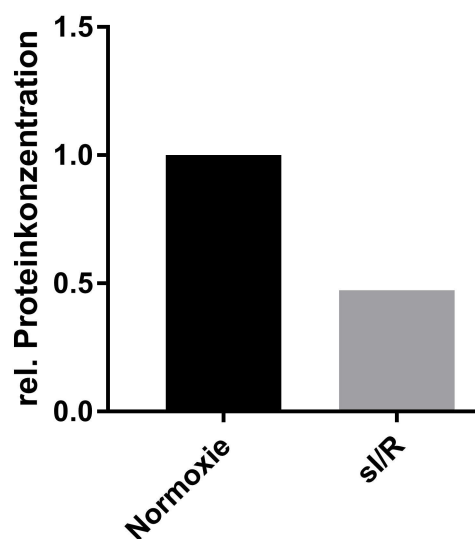
Analyse der BNIP3-Proteinkonzentration in Vollzelllysaten aus *heart-like-1-cells* (HL-1) Zellen unter Normoxie, sI/R (24h/1h) ± TAT-BNIP3 (Fusionsprotein aus BNIP3 und TAT, der Transmembrandomäne des human immunodeficiency virus) mittels *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE)/*Western Blot* (WB). Aufgetragen wurde die Ratio aus BNIP3/Tubulin. Die Signifikanz wurde mittels *2way analysis of variance* (ANOVA), *post hoc* Bonferroni berechnet, n=5. Dargestellt ist der *mean with standard deviation* (SD), \*\*\*\* p<0,0001, \* p<0,05.

**7.4 Translokation von BNIP3 zu den Mitochondrien**

BNIP3 wird in der Literatur als mitochondriales Protein beschrieben [81, 98], konnte in dieser Arbeit aber in Vollzelllysaten in deutlich höherer Konzentration als im Mitochondrienisolat nachgewiesen werden (Abb. 6). BNIP3 konnte auch im Zytoplasma

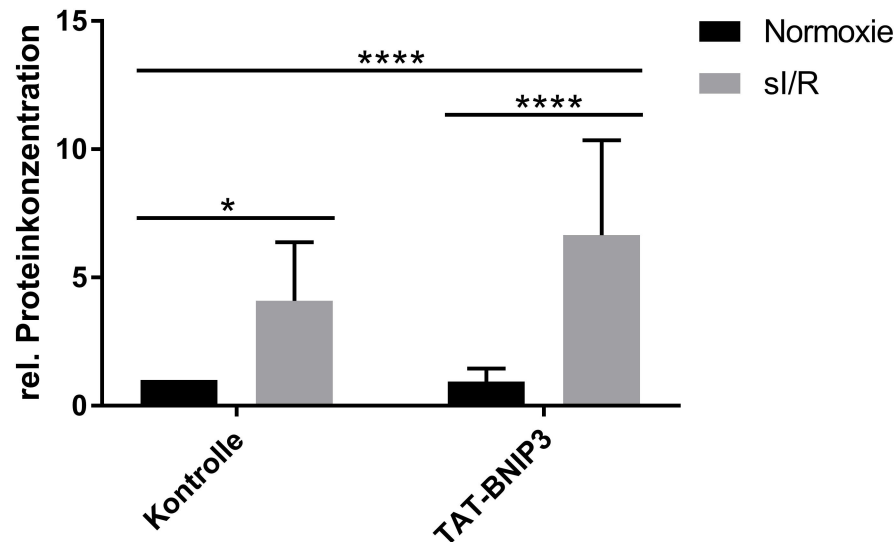
der Zellen nachgewiesen werden. Im Verlauf der sI/R konnte ein Anstieg von BNIP3 auf den Mitochondrien und parallel dazu ein Abstieg der Konzentration im Zytoplasma verzeichnet werden (Abb. 8: Normoxie=1, sI/R=0,473). Zur weiteren Abklärung wurde BNIP3 in Mitochondrienisolaten unter sI/R  $\pm$ TAT-BNIP3 mittels SDS-PAGE/Western Blot untersucht (Abb. 9). Hier zeigte sich, dass es unter sI/R zu einem signifikanten Konzentrationsanstieg von BNIP3 in den Mitochondrien kommt (Kontrolle Normoxie=1, Kontrolle sI/R=4,082 $\pm$ 2,435, p=0,0104). Wurde das Angebot von BNIP3 über die vorherige Inkubation mit TAT-BNIP3 gesteigert, konnte signifikant mehr BNIP3 in der Mitochondrienfraktion nachgewiesen werden (Kontrolle Normoxie/TAT-BNIP3 sI/R=6,665 $\pm$ 3,717, p=<0,0001. Dieser Effekt wurde unter Normoxie nicht beobachtet. Das zugegebene BNIP3 transloziert erst unter Hypoxie/Reoxygenierung zu den Mitochondrien und bleibt unter Normoxie inaktiv im Zytoplasma (TAT-BNIP3 sI/R/TAT-BNIP3 Normoxie=0,943 $\pm$ 0,507, p=<0,0001).

Insgesamt legen diese Ergebnisse die Vermutung nahe, dass es zu einer sI/R-abhängigen Translokation von BNIP3 zu den Mitochondrien kommt.



**BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3 (BNIP3) Konzentration im Zytoplasma, Abb. 8**

Analyse der BNIP3-Proteinkonzentration im Zytoplasma aus heart-link-1-cells (HL-1 Zellen) unter Normoxie, simulierter Ischämie/Reperfusion (sI/R) (24h/1h) mittels *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE)/*Western Blot* (WB). Aufgetragen wurde die Ratio aus BNIP3/Tubulin. n=1.



### Translokation von *BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein (BNIP3)* zu den Mitochondrien, Abb. 9

Analyse der BNIP3-Proteinkonzentration in Mitochondrien aus *heart-like-1-cells* (HL-1 Zellen) unter Normoxie, simulierter Ischämie/Reperfusion (sI/R) (24h/1h)  $\pm$ TAT-BNIP3 (Fusionsprotein auf BNIP und TAT, der Transmembrandomäne des human immunodeficiency virus) mittels *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE)/*Western Blot* (WB). Aufgetragen wurde die Ratio aus BNIP3/*Adenine Nucleotide Translocase 1* (ANT1). Die Signifikanz wurde mittels *2way analysis of variance* (ANOVA), *post hoc* Bonferroni berechnet, n=10. Dargestellt ist der *mean with standard deviation* (SD), \*\*\*\* p<0,0001, \* p<0,05.

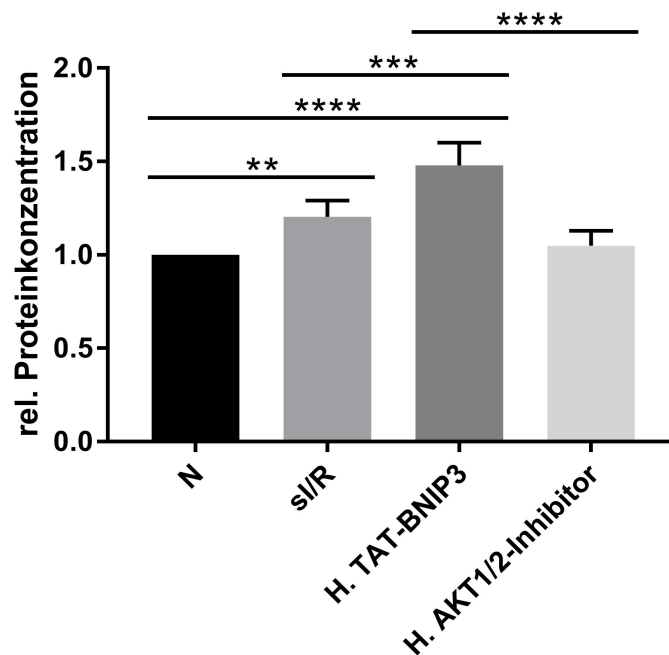
### 7.5 AKT-abhängige Phosphorylierung von BNIP3

Wie zuvor gezeigt, kommt es unter sI/R zu einem Anstieg der intrazellulären Gesamtkonzentration von BNIP3 sowie wahrscheinlich zu einer Translokation von BNIP3 zu den Mitochondrien (Abb. 7, Abb. 9). Neben der, über die Translokation vermittelten Aktivierung von BNIP3, konnte ein weiterer aktivierender Mechanismus identifiziert werden. Bei Proteinen im Allgemeinen kann es durch eine posttranslationale Modifikation, wie zum Beispiel Dephosphorylierung und Phosphorylierung, zu einer Steigerung der Aktivität kommen [99]. Für letzteres gibt es bereits Verweise aus der Literatur. So wurde gezeigt, dass BNIP3 einen Serinrest aufweist, welcher phosphoryliert werden kann [86]. Gleichzeitig ergaben sich erste Hinweise auf eine Beteiligung der ProteinkinaseB (AKT) an der Phosphorylierung von BNIP3 [86], welche hier weiter untersucht wurde.

Dazu wurden HL-1-Zellen unter sI/R $\pm$ TAT-BNIP3/AKT1/2-Inhibitor inkubiert und anschließend die BNIP3-Immunpräzipitate mittels SDS-PAGE/Western Blot analysiert (Abb. 10). Hier zeigte sich, dass es unter sI/R zu einer signifikant gesteigerten Phosphorylierung von BNIP3 kommt (N=1, sI/R=1,203 $\pm$ 0,088, p=0,0093). Auch exogen zugegebenes BNIP3 wurde unter sI/R phosphoryliert (H.TAT-BNIP3=1,479 $\pm$ 0,121 ,N:



$p < 0,0001$ ; sI/R:  $p = 0,0006$ ). Die Inhibition der Proteinkinase B führte zu einer dezenten Reduktion der Phosphorylierung von BNIP3 gegenüber sI/R (H.AKT1/2-Inhibitor =  $1,049 \pm 0,079$ ). Dies könnte einen Hinweis darauf geben, dass BNIP3 über AKT unter sI/R phosphoryliert wird. Es kommt also unter sI/R zu einer Proteinkinase B-vermittelten Phosphorylierung von BNIP3, welche über den AKT1/2-Inhibitor blockiert werden kann. Somit scheint BNIP3 sowohl über eine Steigerung der intrazellulären Konzentration des Proteins als auch über eine Translokation zu den Mitochondrien und eine posttranslationale Phosphorylierung im I/R-Schaden aktiviert zu werden.



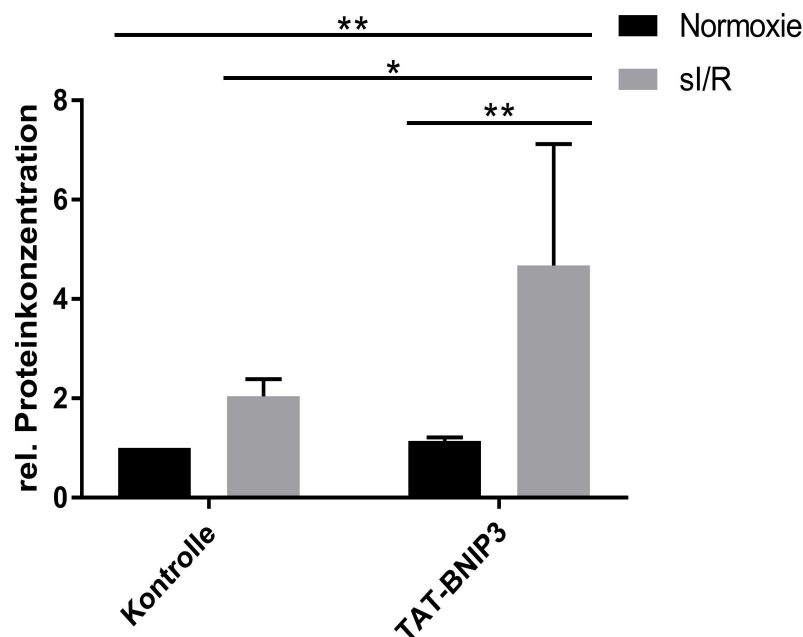
#### Proteinkinase B (AKT) abhängige Phosphorylierung von *BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein* (BNIP3), Abb. 10

Analyse der phospho-BNIP3-Proteinkonzentration aus *heart-like-1-cells* (HL-1 Zellen) Immunpräzipitat unter Normoxie (N), simulierter Ischämie/Reperfusion (sI/R, H) (24h/1h)  $\pm$  TAT-BNIP3 (Fusionsprotein aus BNIP3 und TAT, der Transduktionsdomäne des human immunodeficiency virus), Proteinkinase B (AKT1/2) Inhibitor mittels *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE)/*Western Blot* (WB). Aufgetragen wurde die Ratio aus phospho-Serin/BNIP3. Die Signifikanz wurde mittels ordinary one-way analysis of variance (ANOVA), *post hoc* Bonferroni berechnet,  $n = 5$ . Dargestellt *mean with standard deviation* (SD), \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ .

#### 7.6 BNIP3-abhängige Translokation von BAX zu den Mitochondrien

Im nächsten Schritt ging es nun darum, den Zusammenhang zwischen BNIP3 und mitochondrialen Schädigungen unter I/R zu klären. Aus der Literatur gibt es dazu Hinweise, dass BNIP3 unter I/R ein zweites Protein der Bcl-2-Genfamilie, das proapoptische Protein BAX, beeinflusst [93]. Dieser Zusammenhang sollte hier weiter

untersucht werden. Dazu wurden HL-1-Zellen unter sI/R±TAT-Bnip3 inkubiert, anschließend wurden die Mitochondrien isoliert und mittels SDS-PAGE/Western Blot die BAX-Proteinkonzentration analysiert (Abb. 11). In den Kontrollproben (ohne Inkubation mit Fusionsproteinen) konnte zunächst gezeigt werden, dass es unter sI/R zu einem Anstieg der BAX-Konzentration in den Mitochondrien kommt (Kontrolle Normoxie=1; Kontrolle sI/R=2,043±0,350). Durch Inkubation der Zellen mit TAT-BNIP3 konnte dieser Konzentrationsanstieg signifikant gesteigert werden (Kontrolle sI/R/TAT-BNIP3 sI/R=4,679±2,444, p=0,0231). Des Weiteren konnte erneut gezeigt werden, dass BNIP3 erst unter sI/R eine signifikante Wirkung entfaltet (TAT-BNIP3 sI/R/TAT-BNIP3 Normoxie=1,146±0,068, p=0,0021). Insgesamt kommt es also unter sI/R zu einer BNIP3-abhängigen Translokation von BAX zu den Mitochondrien.



***BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein (BNIP3) abhängige Translokation von B-cell lymphoma 2-associated X protein (BAX) zu den Mitochondrien, Abb. 11***

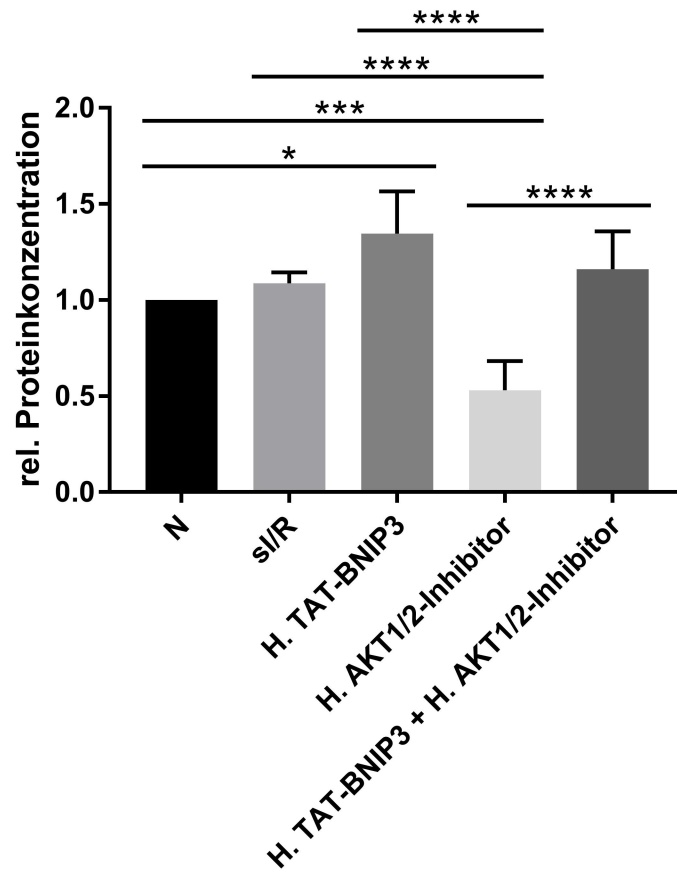
Analyse der BAX-Proteinkonzentration in Mitochondrien aus *heart-like-1-cells* (HL-1 Zellen) unter Normoxie, simulierter Ischämie/Reperfusion (sI/R) (24h/1h) ± TAT-BNIP3 (Fusionsprotein auf BNIP3 und TAT, der Transduktionsdomäne des *human immunodeficiency virus*) mittels *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE)/*Western Blot* (WB). Aufgetragen wurde die Ratio aus BAX/*Adenine Nucleotide Translocase 1* (ANT1). Die Signifikanz wurde mittels *2way analysis of variance* (ANOVA), *post hoc* Bonferroni berechnet, n=5. Dargestellt ist der *mean with standard deviation* (SD), \*\* p<0,01, \* p<0,05.

## 7.7 BNIP3-abhängige BAX-Aktivierung

Für andere BH3-only Proteine konnte bereits eine BAX-Aktivierung durch direkte Interaktion der Proteine gezeigt werden [100, 101]. Ob dieser Mechanismus auch für BNIP3 zutrifft, soll in diesem Experiment untersucht werden. Dazu wurden HL-1-Zellen  $\pm$ TAT-BNIP3/AKT1/2-Inhibitor inkubiert, sI/R ausgesetzt und anschließend mittels SDS-PAGE/Western Blot analysiert (Abb. 12). Als Marker für die aktivierte Form von BAX wurde BAX6A7 in Relation zur Gesamtkonzentration des Proteins analysiert. Nach Inkubation mit TAT-BNIP3 und sI/R zeigte sich eine signifikant erhöhte Konzentration von BAX6A7 in den HL-1-Zellen (N=1, H.TAT-BNIP3=1,347 $\pm$ 0,219 ,p=0,0157). Wurde die vorher bereits gezeigte Phosphorylierung von BNIP3 durch Zugabe von AKT1/2-Inhibitoren vermindert, zeigte sich auch ein deutlich signifikanter Konzentrationsabfall der aktivierten Form von BAX im Vergleich zu den anderen Gruppen (H.AKT1/2-Inhibitor=0,531 $\pm$ 0,151; N: p=0,0008; sI/R=1,088 $\pm$ 0,056, p=<0,0001; HTAT-BNIP3=1,347 $\pm$ 0,2191, p=<0,0001).

Insgesamt lag die Konzentration von BAX6A7 in diesen Proben sogar unterhalb des Niveaus der Kontrollproben bei Normoxie, was darauf hindeuten könnte, dass BNIP3 bereits unter physiologischen Bedingungen eine aktivierende Wirkung auf das Protein ausübt. Wurden die Zellen sowohl mit TAT-BNIP3 als auch mit AKT1/2-Inhibitor inkubiert und sI/R ausgesetzt, so ergaben sich BNIP3-Konzentrationen ähnlich denen der sI/R-Kontrollproben (H.TAT-BNIP3+H.AKT1/2-Inhibitor=1,161 $\pm$ 0,196). Zwar zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Proteinkonzentration im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit dem ProteinkinaseB-Inhibitor (H.TAT-BNIP3+H.AKT1/2-Inhibitor/H.AKT1/2-Inhibitor: p=<0,0001). Diese vermehrte Aktivierung von BAX könnte aber auf eine zu gering gewählte Konzentration des Inhibitors zurückzuführen sein.

Es lässt sich also sagen, dass es unter sI/R zu einer BNIP3-abhängigen Aktivierung von BAX kommt. BNIP3 muss hierzu wahrscheinlich in seiner posttranslational modifizierten (durch ProteinkinaseB phosphorylierten) Form vorliegen.



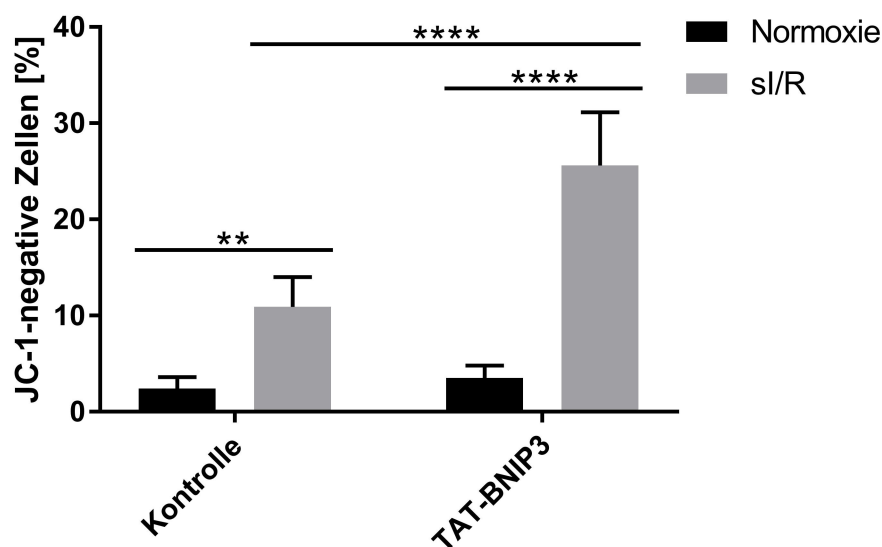
***BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein (BNIP3) abhängige B-cell lymphoma 2-associated X protein (BAX) Aktivierung, Abb. 12***

Analyse der BAX6A7-Proteinkonzentration (aktivierte Form von BAX) in *heart-like-1-cells* (HL-1 Zellen) unter Normoxie, simulierter Ischämie/Reperfusion (sI/R, H) (24h/1h) ± TAT-BNIP3 (Fusionsprotein aus BNIP3 und TAT, der Transmembrandomäne des *human immunodeficiency virus*), ± Proteinkinase B (AKT1/2) Inhibitor mittels *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE)/*Western Blot* (WB). Aufgetragen wurde die Ratio aus BAX6A7/BAX. Die Signifikanz wurde mittels *ordinary one-way analysis of variance* (ANOVA), *post hoc* Bonferroni berechnet, n=5. Dargestellt ist der *mean with standard deviation* (SD), \*\*\*\* p<0,0001, \*\*\*p<0,001, \* p<0,05.

**7.8 BNIP3-abhängiger Abfall des mitochondrialen Membranpotentials**

Eine ansteigende BNIP3-Konzentration wird von verschiedenen Forschungsgruppen mit zunehmenden Schäden der Mitochondrien in Kardiomyozyten in Verbindung gebracht [88, 89]. Dies sollte hier für HL-1-Zellen anhand des mitochondrialen Membranpotentials untersucht werden. Dazu wurden HL-1-Zellen nach der Inkubation ±TAT-BNIP3 unter sI/R mittels JC1-Assay behandelt und anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dabei hat der Fluoreszenzfarbstoff die Eigenschaft durch die intakte mitochondriale Membran diffundieren zu können und dort zu akkumulieren. Bei Abfall des Membranpotentials verlässt er diese wieder, sodass sich depolarisierte Mitochondrien JC1-negativ darstellen (Abb. 13).

Es konnte in beiden Gruppen gezeigt werden, dass es allein durch sI/R zu einem signifikanten Anstieg an depolarisierten Mitochondrien kommt (Kontrolle Normoxie=2,432±1,175, Kontrolle sI/R=10,916±3,087, p=0,0039; TAT-BNIP3 Normoxie=3,517±1,293, TAT-BNIP3 sI/R=24,999±6,127, p=<0,0001). Die Erhöhung der intrazellulären BNIP3-Konzentration verstärkte den Effekt signifikant im Vergleich zu den Kontrollproben (Kontrolle sI/R/TAT-BNIP3 sI/R: p=0,0001). Es kommt also unter sI/R zu einem BNIP3-abhängigen Abfall des mitochondrialen Membranpotential in HL-1-Zellen.



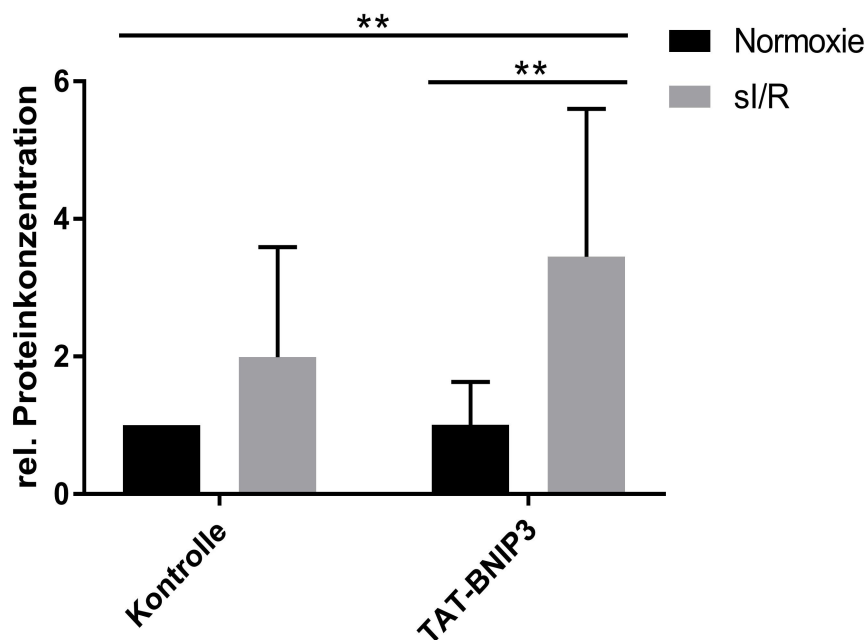
**BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein (BNIP3) abhängiger Abfall des mitochondrialen Membranpotentials, Abb. 13**

Analyse der 5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarocyanin Iodid (JC1) negativen *heart-like-1-cells* (HL-1 Zellen) [%] unter Normoxie, simulierter Ischämie/Reperfusion (sI/R) (24h/1h) ± TAT-BNIP3 (Fusionsprotein aus BNIP und TAT, der Transmembrandomäne des *human immunodeficiency virus*) mittels JC1-Assay/Fluoreszenzmikroskopie. Aufgetragen wurde die Ratio aus JC1-negativen Zellen/Gesamtzahl Zellen. Die Signifikanz wurde mittels *2way analysis of variance* (ANOVA), *post hoc* Bonferroni berechnet, n=5. Dargestellt ist der *mean with standard deviation* (SD), \*\*\*\* p<0,0001, \*\*p<0,01.

### 7.9 BNIP3-abhängige Cytochrom c Freisetzung aus den Mitochondrien

Cytochrom c ist ein mitochondriales Protein, welches im Rahmen des apoptotischen Zelluntergangs aus dem Intermembranraum der Mitochondrien in das Zytoplasma freigesetzt wird und hier den intrinsischen Apoptosesignalweg auslöst [47]. Ob dies auch bei dem zuvor gezeigten BNIP3-abhängigen Abfall des mitochondrialen Membranpotentials in HL-1-Zellen (Abb. 14) der Fall ist, wurde hier untersucht. Dazu wurden HL-1-Zellen ±TAT-BNIP3 sI/R ausgesetzt und anschließend das isolierte Zytoplasma mittels SDS-PAGE/Western Blot analysiert.

Es zeigte sich, dass es erst unter sI/R zu einem Anstieg der Cytochrom c Konzentration im Zytoplasma kommt (Kontrolle Normoxie=1, Kontrolle sI/R=1,995±1,597). Durch Erzeugung einer intrazellulären Überangebots von BNIP3 unter sI/R kam es zu einer signifikanten Steigerung der Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranraum der Mitochondrien (TAT-BNIP3 Normoxie=1,008±0,625, TAT-BNIP3 sI/R=3,451±2,15, p=0,00212, Kontrolle Normoxie: p=<0,0001). Es lässt sich also sagen, dass es durch BNIP3 zur Bildung und Öffnung der MOMP und damit Freisetzung von Cytochrom c ins Zytoplasma kommt.



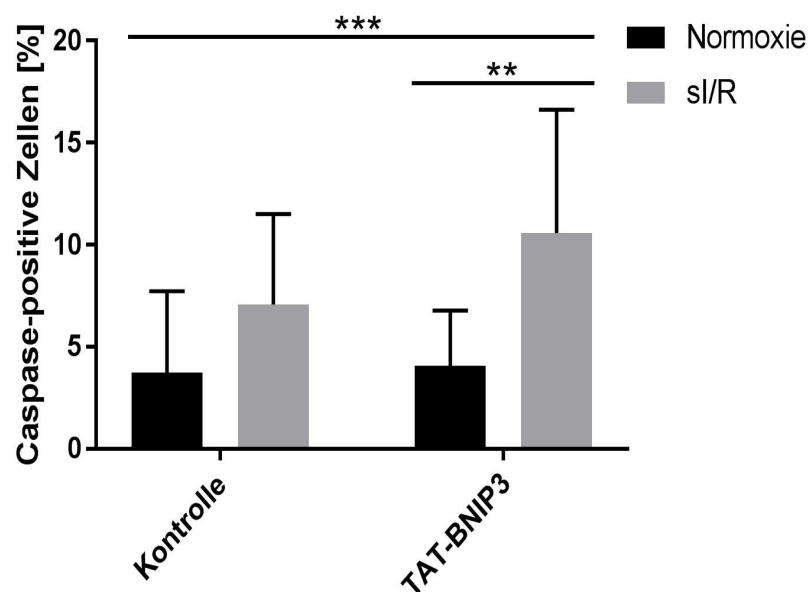
***BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein (BNIP3) abhängige Cytochrom c Freisetzung aus den Mitochondrien, Abb. 14***

Analyse der Cytochrom c Proteinkonzentration im Zytoplasma von *heart-like-1-cells* (HL-1 Zellen) unter Normoxie, simulierter Ischämie/Reperfusion (sI/R) (24h/1h) ± TAT-BNIP3 (Fusionsprotein aus BNIP3 und TAT, der Transmembrandomäne des *human immunodeficiency virus*) mittels *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE)/*Western Blot* (WB). Aufgetragen wurde die Ratio aus Cytochrom c/βAktin. Die Signifikanz wurde mittels *2way analysis of variance* (ANOVA), *post hoc* Bonferroni berechnet, n=8. Dargestellt ist der *mean with standard deviation* (SD), \*\* p<0,01.

### 7.10 BNIP3-abhängige Aktivierung der Caspasen 3 und 7

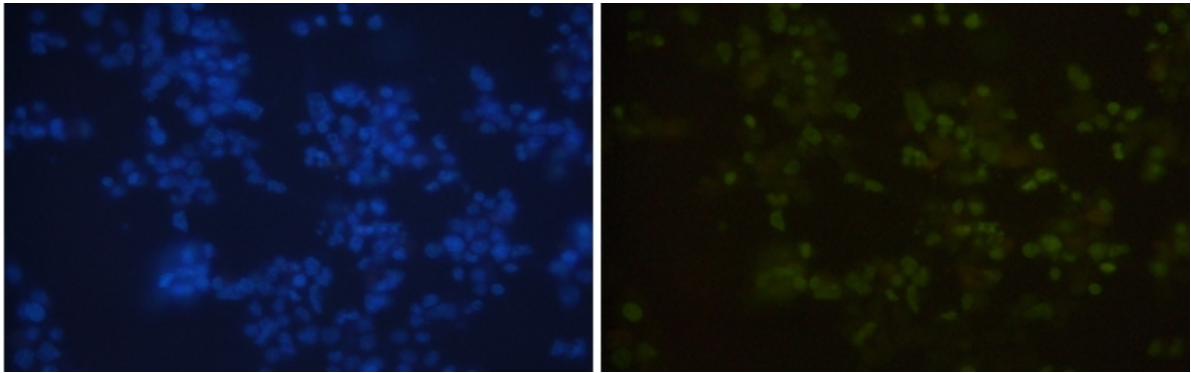
Der Zusammenhang zwischen BNIP3 und der Aktivierung von Caspasen im Sinne eines apoptotischen Zelluntergangs wird in der Literatur kontrovers diskutiert [88-90]. Ein möglicher Zusammenhang sollte hier für HL-1-Zellen untersucht werden. Dazu wurden HL-1-Zellen±TAT-BNIP3 inkubiert, sI/R ausgesetzt und mittels Caspase3/7-Assay

fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abb. 15, Abb. 16). Dabei wurden Caspase3/7-positive Zellen mit der Gesamtzahl der Zellen in Relation gesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass es unter sI/R und Anstieg der intrazellulären BNIP3-Konzentration sowohl zu einer signifikanten Zunahme Caspase3/7-positiver Zellen gegenüber HL-1-Zellen unter Normoxie und erhöhten intrazellulären BNIP3-Konzentrationen (TAT-BNIP3 Normoxie=4,063±2,704, TAT-BNIP3 sI/R=10,581±6,041, p=0,001), als auch gegenüber der Normoxie-Kontrolle kommt (TAT-BNIP3 sI/R/Kontrolle Normoxie=3,721±4,002, p=0,0004). In HL-1-Zellen kommt es also unter sI/R zu einer BNIP3-abhängigen Aktivierung der Caspasen 3 und 7 über Cytochrom c.



***BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein (BNIP3) abhängige Aktivierung der Caspasen 3 und 7, Abb. 15***

Analyse der Caspase-positiven *heart-like-1-cells* (HL-1 Zellen) [%] unter Normoxie, simulierter Ischämie/Reperfusion (sI/R) (24h/1h) ± TAT-BNIP3 (Fusionsprotein aus BNIP3 und TAT, der Transmembrandomäne des *human immunodeficiency virus*) mittels Caspase-3/7-Assay/Fluoreszenzmikroskopie. Aufgetragen wurde die Ratio aus Caspase-positiven Zellen/Gesamtzahl Zellen. Die Signifikanz wurde mittels *2way analysis of variance* (ANOVA), *post hoc* Bonferroni berechnet, n=15. Dargestellt ist der *mean with standard deviation* (SD), \*\*\* p<0,001, \*\* p<0,01.



**Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme Caspase-positiver *heart-like-1-cells* (HL-1-Zellen), Abb. 16**

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von HL-1-Zellen unter simulierter Ischämie/Reperfusion (sI/R) (24h/1h) mit TAT-BNIP3 (Fusionsprotein aus BNIP3 und TAT, der Transmembrandomäne des *human immunodeficiency virus*). Analyse mittels Caspase-3/7-Assay. Dargestellt sind links die Zellkerne in DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Blaufärbung) und rechts die Caspase-positiven Zellen in FITC (*Fluorescein Isothiocyanate*, Grünfärbung). Aufnahme mit 20facher Vergrößerung.



## 8. Diskussion

Der akute Myokardinfarkt, eine der häufigsten Todesursachen weltweit [1], ist definiert als eine plötzliche Ischämie von Herzmuskelzellen, welche deren Absterben zur Folge hat [2]. Meistens geschieht dies auf Grund einer vorbestehenden arteriosklerotischen Veränderung der Herzkranzgefäße, bei der die Ruptur einer der Plaques zur Verminderung des Blutflusses und damit zur Unterversorgung des Myokards mit Sauerstoff führt [8]. Es kommt zum Untergang von Kardiomyozyten, wobei der genaue Mechanismus aktuell noch Gegenstand der Forschung ist. Sowohl Nekrose [15], als auch Apoptose [41] und Autophagie [90] werden diskutiert, eine strikte Trennung der Signalwege ist so allerdings nicht mehr aufrechtzuerhalten [59-62]. Eine wichtige Rolle scheinen dabei die Proteine der BCL-2-Familie innezuhaben, welchen an der Regulation der Signalwege beteiligt sein sollen [54-56]. Besonders das pro-apoptotische Protein BNIP3 ist in den letzten Jahren in den Fokus der Herz-Kreislauf-Forschung gerückt. Seine Rolle im I/R-Schaden wurde hier *in vitro* in HL-1-Zellen auch unter dem Aspekt seiner Tauglichkeit als Zielprotein für die Entwicklung einer pharmakologischen Therapie des Reperfusionsschadens untersucht. Trotz der stetig verbesserten Versorgungssysteme zeigt die weiterhin hohe Zahl und Letalität des akuten Myokardinfarktes, dass es hier eines neuen Therapieansatzes bedarf. Dabei zeigen sich die bisher im I/R-Schaden getesteten Therapeutika als nicht ausreichend wirksam [37].

### 8.1 BNIP3 in HL-1-Zellen

In dieser Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass BNIP3 endogen in HL-1-Zellen vorliegt (Abb. 6) (Tabelle 2). Dies deckt sich mit Ergebnissen von Hamacher-Brady *et al.*, die BNIP3 endogen in adulten Rattenherzen nachweisen konnten. Im Gegensatz dazu konnte das Protein in neonatalen Kardiomyozyten, HeLa-Zellen (menschlichen Epithelzellen eines Zervixkarzinoms) und *mouse embryonic fibroblast* (MEF)-Zellen erst nach Hypoxie/Reoxygenierung nachgewiesen werden [88, 90, 93, 102]. Hier scheint es also zelltypische Unterschiede zu geben. Durch erfolgreiches Auftrennen der Zelle in eine Mitochondrien- und eine Zytoplasmafraktion konnte außerdem erstmals nachgewiesen werden, dass BNIP3 sowohl in den Mitochondrien, als auch im Zytoplasma von HL-1-Zellen vorliegt (Abb. 8, Ab. 9). Dabei wurde das Protein unter nicht-reduzierenden Bedingungen in einer dimeren Form bei 60kDa detektiert (Abb. 6). Anderer Gruppen konnten in *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen sowohl die dimere als auch die monomere

Form des Proteins nachweisen [80, 86]. Die Lokalisation von BNIP3 wird in der Literatur allerdings als mitochondrial beschrieben [81, 98]. Hamacher-Brady *et al.* konnten in *ex vivo* perfundierten Rattenherzen sogar zeigen, dass das Protein fest in der mitochondrialen Membran verankert ist [90]. Möglicherweise sind die Lokalisation an den Mitochondrien und dimere Form Voraussetzungen für die Wirkung des Proteins [84].

Der Nachweis von endogenem BNIP3 legt auch die Vermutung nahe, dass es unter basalen Bedingungen in einer inaktiven Form vorliegt und es zur Aktivierung eines bestimmten Signals bedarf. Im Rahmen des akuten Myokardinfarktes kommen dafür besonders Ischämie und Reperfusion als Auslöser infrage. Auch wäre hier die Überschreitung einer bestimmten Schwellenkonzentration zur Aktivierung eines Signalwegs denkbar. In dieser Arbeit führte sI/R mit 24h Hypoxie und 1h Reoxygenierung zu einer signifikant gesteigerten Konzentration des BH3-only Protein in den Zellen (Ab. 7). Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Regula *et al.*, die in isolierten, ventrikulären Ratten-Kardiomyozyten nach 24h Hypoxie *in vitro* ebenfalls einen Anstieg der BNIP3-Proteinkonzentration nachweisen konnten [88]. In neonatalen Kardiomyozyten aus Ratten konnte nach 72h Hypoxie ein signifikanter Anstieg der BNIP3-Konzentration beobachtet werden, ohne das gleichzeitige Vorliegen von Azidose konnte jedoch keine daraus resultierende zelltodaktivierende Wirkung nachgewiesen werden [89]. Auch in MEF-Zellen konnte ein substantielle Zunahme der BNIP3-Proteinkonzentration nach 72h Hypoxie beobachtet werden. Zuvor war das Protein endogen nicht nachweisbar [93]. Guo *et al.* konnten nach 8h bzw. 24h Hypoxie einen deutlichen Anstieg von BNIP3 sowohl in HeLa-Zellen, als auch in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten und *mouse hepatoma* 1-6 (HePa1-6) Zellen aufzeigen [102]. Im Gegensatz dazu war dies in *ex vivo* Ratten-Kardiomyozyten nach 30min Ischämie und 120min Reperfusion nicht zu beobachten [90]. In Anbetracht der deutlich längeren Hypoxiezeiten der anderen Gruppen könnte man hier vermuten, dass die BNIP3-Proteinkonzentration eher zu einem späteren Zeitpunkt signifikant ansteigt. Längerfristige Hypoxie scheint also in unterschiedlichen Zelltypen zu einem Anstieg der intrazellulären BNIP3-Proteinkonzentration zu führen. Da dieser Anstieg in der Literatur mit einem vermehrten Untergang von Zellen in Verbindung gebracht wird [88-90], unterstreicht dies die Wichtigkeit der schnellen Wiedereröffnung okkludierter Herzkranzgefäße und damit Beseitigung der Hypoxie im nachfolgenden Gewebe im Rahmen des Myokardinfarkt.

Neben einem Anstieg der intrazellulären Gesamtkonzentration konnte vielmehr auch ein

sI/R-abhängiger Konzentrationsanstieg von BNIP3 in den Mitochondrien nachgewiesen werden (Abb. 9). Gleichzeitig ergab die Analyse eines Zytoplasmaisolats mittels SDS-Page/Western Blot einen Abfall der Konzentration von BNIP3 im Zytoplasma (Abb. 8). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass es unter sI/R zu einer Translokation von BNIP3 zu den Mitochondrien kommt.

Regula *et al.* konnten in ventrikulären Kardiomyozyten aus Ratten außerdem zeigen, dass BNIP3 unter Hypoxie vermehrt in die Mitochondrienmembran integriert wird [88]. Hamacher-Brady *et al.* konnten statt einer Translokation von BNIP3 die feste Verankerung des Proteins in der mitochondrialen Membran nachweisen [90]. Ob BNIP3 unter sI/R in die Membran integriert wird oder nur lose mit den Mitochondrien assoziiert ist, lässt sich hier nicht sagen.

Da BNIP3 endogen sowohl im Zytoplasma als auch in den Mitochondrien von HL-1-Zellen vorhanden ist, stellen eine alleinige Konzentrationssteigerung und mögliche Translokation keine ausreichende Erklärung für die Wirkung des pro-apoptischen Proteins dar. Es legt vielmehr die Vermutung nahe, dass es noch ein zweites, aktivierendes Signal wie zum Beispiel eine posttranslationale Modifikation geben muss. Proteine allgemein sowie speziell andere Proteine der BCL-2-Familie werden durch Phosphorylierung aktiviert bzw. inhibiert [99, 103], weshalb der Einfluss dieses Mechanismus auf BNIP3 hier untersucht wurde. Mittels Immunpräzipitation konnte gezeigt werden, dass BNIP3 unter sI/R vermehrt phosphoryliert wird (Abb. 10). Erstmals konnte hier auch gezeigt werden, dass dabei die Inkubation mit AKT1/2-Inhibitoren zu einer Reduzierung dieser posttranslationalen Modifikation führt. Daraus lässt sich also auf eine sI/R-abhängige Phosphorylierung durch die Proteinkinase B schließen. Auch Graham *et al.* konnten phosphoryliertes BNIP3 nachweisen, wobei auf den genauen Mechanismus und mögliche Auswirkungen nicht eingegangen wurde [86]. Eine Möglichkeit konnten Reinartz *et al.* aufzeigen, die einen Serinrest an Position 88 identifizieren konnten, welcher phosphoryliert werden kann. Weiterhin konnten sie BNIP3 als eines von diversen Substraten der AKT identifizieren [104].

Somit führt sI/R in HL-1-Zellen sowohl zu einer Steigerung der intrazellulären Gesamtkonzentration von BNIP3, als auch zu einer posttranslationalen Phosphorylierung durch die Proteinkinase B. Außerdem liegt die Vermutung einer sI/R-abhängigen Translokation von BNIP3 zu den Mitochondrien nahe.

## 8.2 Einfluss von BNIP3 auf BAX

Im nächsten Schritt ging es nun darum, den Signalweg, über welchen BNIP3 unter sI/R zu einer Schädigung der Zelle führt, weiter aufzuklären. Aus der Literatur gibt es dazu Hinweise, dass BNIP3 unter I/R ein zweites Protein der Bcl-2-Genfamilie, das proapoptische Protein BAX, beeinflusst [93]. Im Bezug darauf konnte hier zunächst gezeigt werden, dass es unter sI/R zu einem Anstieg der BAX-Konzentration in den Mitochondrien kommt (Abb. 11). Dabei führte die Erzeugung eines intrazellulären Überangebots von BNIP3 durch Inkubation mit TAT-BNIP3, einem Fusionsprotein der TAT-Sequenz des *human immunodeficiency* (HI) Virus und BNIP3, zu einer signifikanten Steigerung der mitochondrialen BAX-Konzentration. Diese BNIP3-abhängige Steigerung der BAX-Konzentration lässt sich durch eine vermehrte Translokation von BAX zu den Mitochondrien erklären. Diese wurde von verschiedenen Gruppen nachgewiesen [105-107]. Kubli *et al.* kamen ebenfalls in HL-1-Zellen zu einem ähnlichen Ergebnis. Sie konnten zeigen, dass die Inhibition von BNIP3 zu einer verminderten Translokation von BAX zu den Mitochondrien führt [93]. Andere Gruppen beschreiben die Translokation von BAX als abhängig von der Depolarisation der Mitochondrien [105, 106, 108], wobei sich diese in dieser Arbeit ebenfalls BNIP3-abhängig zeigte (siehe unten). Unstrittig ist jedoch, dass BAX am Zelluntergang beteiligt ist [52, 53, 109].

Neben dem Einfluss von BNIP3 auf die Translokation konnte auch eine aktivierende Wirkung auf BAX nachgewiesen werden (Abb. 12). Dabei scheint eine vorherige posttranslationale Modifikation von BNIP3 durch Phosphorylierung entscheidend zu sein. Durch Zugabe von AKT1/2-Inhibitoren konnte die Proteinkonzentration der aktivierten Form von BAX (BAX6A7) verringert werden. Für andere BH3-only Proteine wie zum Beispiel BID konnte bereits eine BAX-Aktivierung durch Interaktion der Proteine gezeigt werden [53, 100, 101, 107]. Dies legt die Vermutung nahe, dass BNIP3 über die Aktivierung von BAX zum Zelluntergang führt. Ray *et al.* konnten jedoch auch nachweisen, dass BNIP3 eine inhibitorische Wirkung auf anti-apoptische Proteine wie BCL-xL und BCL-2 ausübt [103]. Ein BNIP3-abhängiger Zelluntergang auf diesem Weg kann nicht ausgeschlossen werden. Es wäre aber auch denkbar, dass BNIP3 über beide Wege unabhängig voneinander zum Zelluntergang beiträgt.

### 8.3 Auswirkungen von BNIP3 auf die Mitochondrien

Eine ansteigende BNIP3-Konzentration wird von verschiedenen Forschungsgruppen mit zunehmenden Schäden der Mitochondrien in Kardiomyozyten in Verbindung gebracht [88, 89]. Hier konnte gezeigt werden, dass es allein durch sI/R zu einem signifikanten Anstieg an depolarisierten Mitochondrien kommt (Abb. 13). Durch Überexpression des Proteins durch Inkubation mit TAT-BNIP3 kam es zu einem signifikanten Anstieg an depolarisierten Mitochondrien, was auf einen BNIP3-abhängigen Mechanismus schließen lässt. Zusammen mit der vorher nachgewiesenen vermehrten Aktivierung von BAX durch BNIP3 könnte man hier von der Bildung einer Pore in der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP) durch aktiviertes BAX ausgehen. Dies würde ebenfalls die nachfolgend beschriebene Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranraum erklären. Andere Gruppen bringen BNIP3 allerdings mit einem Abfall des mitochondrialen Membranpotentials durch Öffnung der mPTP in Verbindung [88, 89, 92]. Auch dies kann an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden. Die Öffnung der mPTP mit nachfolgendem Einströmen von Wasser, Riss der äußeren Mitochondrienmembran und Freisetzung proapoptotischer Faktoren wäre vorstellbar. Neben dem Signalweg wird auch die genaue Zusammensetzung der mPTP kontrovers diskutiert [36-38]. Kubli *et al.* konnten in HL-1-Zellen eine BNIP3-abhängige Depolarisation der Mitochondrien durch Zugabe von Cyclosporin A inhibieren. Diese Substanz gilt als Inhibitor der mPTP [93]. Eine direkte Beteiligung von BNIP3 am Aufbau der Pore kann also nicht ausgeschlossen werden. Des Weiteren konnten Borachov *et al.* zeigen, dass BNIP3-Dimere in Membranen hydrophile Poren bilden können, durch welche es zum Einströmen von Wasser kommen kann [85]. Als dritte Möglichkeit wäre also auch eine direkte Porenbildung durch BNIP3 denkbar, welche zum Abfall des mitochondrialen Membranpotentials führt. BNIP3 könnte also durch voneinander unabhängige Signalwege zur Aktivierung von BAX und Depolarisation von Mitochondrien führen. Andere Gruppen konnten außerdem die BAX-abhängige Bildung einer Lipidpore in der äußeren Mitochondrienmembran nachweisen, was eine weitere plausible Möglichkeit darstellt [56, 110].

Hamacher-Brady *et al.* beschreiben eine BNIP3-abhängige Öffnung der mPTP als Auslöser für zellprotektive Autophagie [90]. Dieser Aspekt wurde hier nicht näher untersucht.

Neben einer Depolarisation der Mitochondrien zeigte sich außerdem eine BNIP3-abhängige Cytochrom c Freisetzung ins Zytoplasma unter sI/R (Abb. 14). Dies könnte sowohl durch eine Öffnung der MOMP, als auch durch eine Öffnung der mPTP und Riss

der äußeren Mitochondrienmembran erklärt werden. Die Ergebnisse decken sich mit denen von Hamacher-Brady *et al.*, die in adulten Ratten-Kardiomyozyten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen BNIP3-Überexpression und der Freisetzung von Cytochrom c ins Zytoplasma herstellen konnten. Dies wird auf eine Öffnung der mPTP zurückgeführt, was wie hier auch zu einem Abfall des mitochondrialen Membranpotentials führte [90]. Andere Gruppen konnten keinen Zusammenhang zwischen BNIP3-vermitteltem Zelluntergang und Cytochrom c Freisetzung in HeLa-Zellen und Kardiomyozyten aus Ratten unter I/R nachweisen [102, 111]. Allerdings untersuchten Graham *et al.* Zellen unter Hypoxie und Azidose ohne Reperfusion, während Guo *et al.* die Zellen lediglich hypoxischen Bedingungen aussetzten. Allgemein könnten die unterschiedlichen experimentellen Ansätze zur Erzeugung von Hypoxie mit und ohne Reperfusion oder Azidose für die Auslösung der unterschiedlichen Signalwege eine Erklärung sein. Es wäre anzunehmen, dass BNIP3 nicht nur zellspezifisch sondern auch in Abhängigkeit vom jeweiligen auslösenden Signal auf unterschiedliche Arten am Zelltod beteiligt ist.

In einem weiteren Schritt konnte gezeigt werden, dass es unter sI/R und Anstieg der intrazellulären BNIP3-Konzentration zu einer BNIP3-abhängigen Aktivierung der Caspasen 3 und 7 kommt (Abb. 15). Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Hamacher-Brady *et al.*, welche ebenfalls einen BNIP3-abhängigen Zelluntergang in HL-1-Zellen durch Aktivierung von Caspasen nachweisen konnten [90]. Auch Regula *et al.* konnten einen Caspase-abhängigen Zelltod durch BNIP3 in ventrikulären Kardiomyozyten aus Ratten nachweisen [88]. In anderen Zellen war dies nicht der Fall [89, 92]. Insgesamt wird der Zusammenhang zwischen BNIP3 und der Aktivierung von Caspasen im Sinne eines apoptotischen Zelluntergangs in der Literatur kontrovers diskutiert und scheint abhängig vom Zelltyp zu sein [88-90].

Ob die hier gezeigte Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren zu einem apoptotischen Zelluntergang im klassischen Sinn führt, lässt sich nicht sagen. Auch kann nicht sicher nachgewiesen werden, dass die BNIP3-abhängige Depolarisation der Mitochondrien einen klassischen nekrotischen Zelltod nach sich zieht. Sowohl Nekrose, als auch Apoptose konnten im Rahmen des I/R-Schadens nachgewiesen werden [41, 42], wobei diese klassischen Modelle heute so nicht mehr aufrecht zu erhalten sind [59-62].

## 8.4 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass BNIP3 endogen in den Mitochondrien sowie im Zytoplasma von HL-1-Zellen vorhanden ist. Unter sI/R kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären Konzentration des Proteins sowie vermutlich zu einer Translokation zu den Mitochondrien. Gleichzeitig konnte unter sI/R eine ProteinkinaseB-abhängige Phosphorylierung von BNIP3 nachgewiesen werden. Diese scheint einen aktivierenden Einfluss zu haben. BNIP3 beeinflusst die Translokation von BAX zu den Mitochondrien sowie die Transformation des pro-apoptischen Proteins in seine aktive Form. Für letzteres muss BNIP3 in seiner modifizierten, phosphorylierten Form vorliegen. In einem weiteren Schritt kommt es durch BNIP3 zur Depolarisierung der Mitochondrien. Im Verlauf konnte die Freisetzung von Cytochrom c sowie eine Aktivierung der Caspasen 3 und 7 nachgewiesen werden, welche sich BNIP3-abhängig darstellte. BNIP3 ist also entscheidend am Untergang von HL-1-Zellen im I/R-Schaden beteiligt und stellt somit ein pharmakologisches Zielprotein für die Therapie im Rahmen des akuten Myokardinfarktes dar.

Dabei kommen zwei mögliche Ansätze infrage: zum einen wäre es denkbar, BNIP3 direkt zu inhibieren. Verschiedene Gruppen konnten zeigen, dass dies mit Hilfe von BNIP3 $\Delta$ TM, einer Transmembrandeletionsmutante möglich ist [89, 93]. Die fehlende Transmembrandomäne verhindert eine Integration von BNIP3 in die Mitochondrienmembran, welche sich als entscheidend für seine Zelltod-aktivierende Wirkung herausgestellt hat [90]. Allerdings wurde im Rahmen der Tumorforschung eine Dysfunktion von BNIP3 mit vermehrtem tumorösem Wachstum in Verbindung gebracht [69-75, 77, 78]. Da sich BNIP3 $\Delta$ TM als sehr beständig erweist, können hier bei seiner Verwendung als Therapeutikum des I/R-Schadens krebserregende Nebenwirkungen nicht ausgeschlossen werden.

Einen zweiten Ansatzpunkt stellt die aktivierende Phosphorylierung von BNIP3 mittels ProteinkinaseB dar. In dieser Arbeit führte die Inkubation mit einem Inhibitor der Kinase zur verminderten Phosphorylierung des Proteins. Dies wiederum führte zu einer reduzierten Translokation und Aktivierung von BAX. Ob dies auch zu einem verbesserten Überleben der Zelle führt, bedarf an dieser Stelle noch weiterer Forschung. Nach den bisherigen Erkenntnissen stellt AKT einen interessanten Ansatz zur Entwicklung einer pharmakologischen Therapie des I/R-Schadens dar.

Auch bedarf es weiterer Grundlagenforschung hinsichtlich des Signalweges, über welchen

BNIP3 die Depolarisation der Mitochondrien auslöst. Es ist zu klären, ob dies über die Translokation und Aktivierung von BAX oder über einen zweiten Weg unabhängig davon abläuft. Dabei kommen nach den bisherigen Kenntnissen eine BAX-abhängige Öffnung der MOMP [52], die Öffnung der mPTP in der inneren Mitochondrienmembran [88, 89, 92] mit osmotischem Wassereinstrom und Riss der äußeren Membran, die Bildung einer BAX-abhängigen Lipidpore [56, 110] sowie eine hydrophile Pore geformt durch ein BNIP3-Oligomer in Frage [85]. Zieht man eine Öffnung der mPTP in Betracht, ist hier auch der genaue Aufbau der Pore zu klären. Dabei stellt die direkte Beteiligung von BNIP3 eine Hypothese dar. Des Weiteren bedarf es zusätzlicher Forschung bezüglich der Form des Zelluntergangs. Dabei kommen grundsätzlich sowohl Nekrose [92], als auch Apoptose [47] und Autophagie [90] sowie eine Mischform von diesen in Betracht.

Zu bedenken ist auch, dass hier mit HL-1-Zellen *in vitro* gearbeitet wurde. Zwar wurden HL-1-Zellen bewusst wegen ihrer Ähnlichkeit zur Kardiomyozyten ausgewählt, die Übertragbarkeit der *in vitro* gewonnenen Ergebnisse auf das Herz *in vivo* gilt es dennoch zu überprüfen. Insbesondere im Bezug auf die gezeigte Zell-abhängige Wirkungsweise von BNIP3.

Insgesamt kann diese Arbeit nur einen Schritt in der Erforschung eines Therapeutikums für die Behandlung des I/R-Schadens darstellen. Es konnte gezeigt werden, dass BNIP3 eine wichtige Rolle im Rahmen des I/R-Schadens spielt. Einen interessanten Ansatzpunkt für eine Therapie stellt dabei AKT dar. Für die weitere Entwicklung bedarf es weiterer Forschung unter anderem hinsichtlich des Einflusses der Proteinkinase B auf den Zelluntergang sowie der Übertragbarkeit der hier gezeigten biochemischen Vorgänge auf humane Kardiomyozyten.



## 9. Literaturverzeichnis

1. Organization, W.H., *WHO methods and data sources for country-level causes of death 2000 - 2015*. 2016.
2. Thygesen, K., et al., *Third universal definition of myocardial infarction*. *Glob Heart*, 2012. **7**(4): p. 275-95.
3. Bundesamt, S., *Gesundheit Todesursachen in Deutschland*. 2015. **Fachserie 12 Reihe 4**.
4. Alberti, K.G., P. Zimmet, and J. Shaw, *Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation*. *Diabet Med*, 2006. **23**(5): p. 469-80.
5. Tune, J.D., et al., *Cardiovascular consequences of metabolic syndrome*. *Transl Res*, 2017.
6. Hbejan, K., *Smoking effect on ischemic heart disease in young patients*. *Heart Views*, 2011. **12**(1): p. 1-6.
7. Johansson, S., et al., *Mortality and morbidity trends after the first year in survivors of acute myocardial infarction: a systematic review*. *BMC Cardiovasc Disord*, 2017. **17**(1): p. 53.
8. Davies, M.J., *The pathophysiology of acute coronary syndromes*. *Heart*, 2000. **83**(3): p. 361-6.
9. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target*. *J Clin Invest*, 2013. **123**(1): p. 92-100.
10. Neely, J.R., J.T. Whitmer, and M.J. Rovetto, *Effect of coronary blood flow on glycolytic flux and intracellular pH in isolated rat hearts*. *Circ Res*, 1975. **37**(6): p. 733-41.
11. Rovetto, M.J., W.F. Lamberton, and J.R. Neely, *Mechanisms of glycolytic inhibition in ischemic rat hearts*. *Circ Res*, 1975. **37**(6): p. 742-51.
12. Trandum-Jensen, J., et al., *Tissue osmolality, cell swelling, and reperfusion in acute regional myocardial ischemia in the isolated porcine heart*. *Circ Res*, 1981. **49**(2): p. 364-81.
13. Avkiran, M. and M.S. Marber, *Na(+)/H(+) exchange inhibitors for cardioprotective therapy: progress, problems and prospects*. *J Am Coll Cardiol*, 2002. **39**(5): p. 747-53.
14. Reimer, K.A., et al., *The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs*. *Circulation*, 1977. **56**(5): p. 786-94.

15. Reimer, K.A. and R.B. Jennings, *The "wavefront phenomenon" of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow*. Lab Invest, 1979. **40**(6): p. 633-44.
16. Kloner, R.A. and E. Braunwald, *Observations on experimental myocardial ischaemia*. Cardiovasc Res, 1980. **14**(7): p. 371-95.
17. Piper, H.M., D. Garcia-Dorado, and M. Ovize, *A fresh look at reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 1998. **38**(2): p. 291-300.
18. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial reperfusion injury*. N Engl J Med, 2007. **357**(11): p. 1121-35.
19. Braunwald, E. and R.A. Kloner, *Myocardial reperfusion: a double-edged sword?* J Clin Invest, 1985. **76**(5): p. 1713-9.
20. Hearse, D.J. and A. Tosaki, *Free radicals and reperfusion-induced arrhythmias: protection by spin trap agent PBN in the rat heart*. Circ Res, 1987. **60**(3): p. 375-83.
21. Kloner, R.A., et al., *Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop*. Circulation, 1998. **97**(18): p. 1848-67.
22. Krug, A., R. Du Mesnil de, and G. Korb, *Blood supply of the myocardium after temporary coronary occlusion*. Circ Res, 1966. **19**(1): p. 57-62.
23. Kao, K.J., D.B. Hackel, and Y. Kong, *Hemorrhagic myocardial infarction after streptokinase treatment for acute coronary thrombosis*. Arch Pathol Lab Med, 1984. **108**(2): p. 121-4.
24. Ganame, J., et al., *Impact of myocardial haemorrhage on left ventricular function and remodelling in patients with reperfused acute myocardial infarction*. Eur Heart J, 2009. **30**(12): p. 1440-9.
25. McCord, J.M., R.S. Roy, and S.W. Schaffer, *Free radicals and myocardial ischemia. The role of xanthine oxidase*. Adv Myocardiol, 1985. **5**: p. 183-9.
26. Griffiths, E.J. and A.P. Halestrap, *Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion*. Biochem J, 1995. **307** ( Pt 1): p. 93-8.
27. Chambers, D.E., et al., *Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia*. J Mol Cell Cardiol, 1985. **17**(2): p. 145-52.
28. Lemasters, J.J., et al., *The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes*. EXS, 1996. **76**: p. 99-114.
29. Hearse, D.J., S.M. Humphrey, and E.B. Chain, *Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release*. J Mol

- Cell Cardiol, 1973. **5**(4): p. 395-407.
30. Oerlemans, M.I., et al., *Targeting cell death in the reperfused heart: pharmacological approaches for cardioprotection*. Int J Cardiol, 2013. **165**(3): p. 410-22.
  31. Tsujimoto, Y., *Apoptosis and necrosis: intracellular ATP level as a determinant for cell death modes*. Cell Death Differ, 1997. **4**(6): p. 429-34.
  32. Gustafsson, A.B. and R.A. Gottlieb, *Heart mitochondria: gates of life and death*. Cardiovasc Res, 2008. **77**(2): p. 334-43.
  33. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion*. J Mol Cell Cardiol, 2003. **35**(4): p. 339-41.
  34. Heusch, G., K. Boengler, and R. Schulz, *Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: the Holy Grail of cardioprotection*. Basic Res Cardiol, 2010. **105**(2): p. 151-4.
  35. Chen-Scarabelli, C., et al., *The role and modulation of autophagy in experimental models of myocardial ischemia-reperfusion injury*. J Geriatr Cardiol, 2014. **11**(4): p. 338-48.
  36. Crompton, M., *Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death*. J Physiol, 2000. **529 Pt 1**: p. 11-21.
  37. Crompton, M., H. Ellinger, and A. Costi, *Inhibition by cyclosporin A of a Ca<sup>2+</sup>-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress*. Biochem J, 1988. **255**(1): p. 357-60.
  38. Griffiths, E.J. and A.P. Halestrap, *Further evidence that cyclosporin A protects mitochondria from calcium overload by inhibiting a matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. Implications for the immunosuppressive and toxic effects of cyclosporin*. Biochem J, 1991. **274 ( Pt 2)**: p. 611-4.
  39. Bernardi, P., et al., *Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues*. Eur J Biochem, 1999. **264**(3): p. 687-701.
  40. Hausenloy, D.J., et al., *Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning?* Cardiovasc Res, 2002. **55**(3): p. 534-43.
  41. Borutaite, V. and G.C. Brown, *Mitochondria in apoptosis of ischemic heart*. FEBS Lett, 2003. **541**(1-3): p. 1-5.
  42. Olivetti, G., et al., *Apoptosis in the failing human heart*. N Engl J Med, 1997. **336**(16): p. 1131-41.
  43. Saraste, A., et al., *Apoptosis in the heart*. N Engl J Med, 1997. **336**(14): p. 1025-6; author reply 1026.

44. Hamacher-Brady, A., et al., *Autophagy as a protective response to Bnip3-mediated apoptotic signaling in the heart*. *Autophagy*, 2006. **2**(4): p. 307-9.
45. Kroemer, G., et al., *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009*. *Cell Death Differ*, 2009. **16**(1): p. 3-11.
46. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. *Br J Cancer*, 1972. **26**(4): p. 239-57.
47. Gustafsson, A.B. and R.A. Gottlieb, *Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007. **292**(1): p. C45-51.
48. Li, S., et al., *Relief of extrinsic pathway inhibition by the Bid-dependent mitochondrial release of Smac in Fas-mediated hepatocyte apoptosis*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(30): p. 26912-20.
49. Bouillet, P. and A. Strasser, *BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death*. *J Cell Sci*, 2002. **115**(Pt 8): p. 1567-74.
50. Nicholson, D.W. and N.A. Thornberry, *Caspases: killer proteases*. *Trends Biochem Sci*, 1997. **22**(8): p. 299-306.
51. Crow, M.T., et al., *The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis*. *Circ Res*, 2004. **95**(10): p. 957-70.
52. Wei, M.C., et al., *Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death*. *Science*, 2001. **292**(5517): p. 727-30.
53. Kuwana, T., et al., *Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane*. *Cell*, 2002. **111**(3): p. 331-42.
54. Cory, S. and J.M. Adams, *The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(9): p. 647-56.
55. Youle, R.J. and A. Strasser, *The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. **9**(1): p. 47-59.
56. Schafer, B., et al., *Mitochondrial outer membrane proteins assist Bid in Bax-mediated lipidic pore formation*. *Mol Biol Cell*, 2009. **20**(8): p. 2276-85.
57. Lomonosova, E. and G. Chinnadurai, *BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview*. *Oncogene*, 2008. **27** **Suppl 1**: p. S2-19.
58. Wang, K., et al., *BID: a novel BH3 domain-only death agonist*. *Genes Dev*, 1996. **10**(22): p. 2859-69.

59. Lartigue, L., et al., *Caspase-independent mitochondrial cell death results from loss of respiration, not cytotoxic protein release*. *Mol Biol Cell*, 2009. **20**(23): p. 4871-84.
60. Kroemer, G., L. Galluzzi, and C. Brenner, *Mitochondrial membrane permeabilization in cell death*. *Physiol Rev*, 2007. **87**(1): p. 99-163.
61. Bernardi, P., *Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition*. *Physiol Rev*, 1999. **79**(4): p. 1127-55.
62. Halestrap, A., *Biochemistry: a pore way to die*. *Nature*, 2005. **434**(7033): p. 578-9.
63. Festjens, N., T. Vanden Berghe, and P. Vandenabeele, *Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1757**(9-10): p. 1371-87.
64. Holler, N., et al., *Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule*. *Nat Immunol*, 2000. **1**(6): p. 489-95.
65. Degterev, A., et al., *Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury*. *Nat Chem Biol*, 2005. **1**(2): p. 112-9.
66. Sperandio, S., I. de Belle, and D.E. Bredesen, *An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(26): p. 14376-81.
67. Boya, P., et al., *Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(3): p. 1025-40.
68. Ravikumar, B., et al., *Rapamycin pre-treatment protects against apoptosis*. *Hum Mol Genet*, 2006. **15**(7): p. 1209-16.
69. Jin, T., et al., *Expression TGM2 and BNIP3 have prognostic significance in laryngeal cancer patients receiving surgery and postoperative radiotherapy: a retrospective study*. *J Transl Med*, 2012. **10**: p. 64.
70. Azad, M.B., et al., *Hypoxia induces autophagic cell death in apoptosis-competent cells through a mechanism involving BNIP3*. *Autophagy*, 2008. **4**(2): p. 195-204.
71. Yan, J., et al., *Upregulation of BNIP3 promotes apoptosis of lung cancer cells that were induced by p53*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **346**(2): p. 501-7.
72. Sugita, H., et al., *Methylation of BNIP3 and DAPK indicates lower response to chemotherapy and poor prognosis in gastric cancer*. *Oncol Rep*, 2011. **25**(2): p. 513-8.
73. Okami, J., D.M. Simeone, and C.D. Logsdon, *Silencing of the hypoxia-inducible cell death protein BNIP3 in pancreatic cancer*. *Cancer Res*, 2004. **64**(15): p. 5338-46.

74. Liu, F., et al., *Verticillin A overcomes apoptosis resistance in human colon carcinoma through DNA methylation-dependent upregulation of BNIP3*. *Cancer Res*, 2011. **71**(21): p. 6807-16.
75. Shimizu, S., et al., *Methylated BNIP3 gene in colorectal cancer prognosis*. *Oncol Lett*, 2010. **1**(5): p. 865-872.
76. Chen, X., et al., *MicroRNA145 targets BNIP3 and suppresses prostate cancer progression*. *Cancer Res*, 2010. **70**(7): p. 2728-38.
77. Leo, C., L.C. Horn, and M. Hockel, *Hypoxia and expression of the proapoptotic regulator BNIP3 in cervical cancer*. *Int J Gynecol Cancer*, 2006. **16**(3): p. 1314-20.
78. Daido, S., et al., *Pivotal role of the cell death factor BNIP3 in ceramide-induced autophagic cell death in malignant glioma cells*. *Cancer Res*, 2004. **64**(12): p. 4286-93.
79. Kammouni, W., et al., *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*, 2007. **56**(9): p. 2854-63.
80. Chen, G., et al., *The E1B 19K/Bcl-2-binding protein Nip3 is a dimeric mitochondrial protein that activates apoptosis*. *J Exp Med*, 1997. **186**(12): p. 1975-83.
81. Yasuda, M., et al., *Adenovirus E1B-19K/BCL-2 interacting protein BNIP3 contains a BH3 domain and a mitochondrial targeting sequence*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(20): p. 12415-21.
82. Sulistijo, E.S. and K.R. MacKenzie, *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*, 2006. **364**(5): p. 974-90.
83. Bristow, N., et al., *Truncated forms of BNIP3 act as dominant negatives inhibiting hypoxia-induced cell death*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1812**(3): p. 302-11.
84. Kubli, D.A., et al., *Bnip3 functions as a mitochondrial sensor of oxidative stress during myocardial ischemia and reperfusion*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008. **295**(5): p. H2025-31.
85. Bocharov, E.V., et al., *Unique dimeric structure of BNip3 transmembrane domain suggests membrane permeabilization as a cell death trigger*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(22): p. 16256-66.
86. Graham, R.M., et al., *Regulation of Bnip3 death pathways by calcium, phosphorylation, and hypoxia-reoxygenation*. *Antioxid Redox Signal*, 2007. **9**(9): p. 1309-15.

87. Zhu, Y., et al., *Modulation of serines 17 and 24 in the LC3-interacting region of Bnip3 determines pro-survival mitophagy versus apoptosis*. J Biol Chem, 2013. **288**(2): p. 1099-113.
88. Regula, K.M., K. Ens, and L.A. Kirshenbaum, *Inducible expression of BNIP3 provokes mitochondrial defects and hypoxia-mediated cell death of ventricular myocytes*. Circ Res, 2002. **91**(3): p. 226-31.
89. Kubasiak, L.A., et al., *Hypoxia and acidosis activate cardiac myocyte death through the Bcl-2 family protein BNIP3*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(20): p. 12825-30.
90. Hamacher-Brady, A., et al., *Response to myocardial ischemia/reperfusion injury involves Bnip3 and autophagy*. Cell Death Differ, 2007. **14**(1): p. 146-57.
91. Bruick, R.K., *Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(16): p. 9082-7.
92. Vande Velde, C., et al., *BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(15): p. 5454-68.
93. Kubli, D.A., J.E. Ycaza, and A.B. Gustafsson, *Bnip3 mediates mitochondrial dysfunction and cell death through Bax and Bak*. Biochem J, 2007. **405**(3): p. 407-15.
94. 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 U S A, 1998. **95**(6): p. 2979-84.
95. Debaisieux, S., et al., *The ins and outs of HIV-1 Tat*. Traffic, 2012. **13**(3): p. 355-63.
96. Ambrose, L.J., et al., *Investigating mitochondrial metabolism in contracting HL-1 cardiomyocytes following hypoxia and pharmacological HIF activation identifies HIF-dependent and independent mechanisms of regulation*. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2014. **19**(6): p. 574-85.
97. Galvez, A.S., et al., *Distinct pathways regulate proapoptotic Nix and BNip3 in cardiac stress*. J Biol Chem, 2006. **281**(3): p. 1442-8.
98. Chen, G., et al., *Nix and Nip3 form a subfamily of pro-apoptotic mitochondrial proteins*. J Biol Chem, 1999. **274**(1): p. 7-10.
99. Johnson, L.N. and M. O'Reilly, *Control by phosphorylation*. Curr Opin Struct Biol, 1996. **6**(6): p. 762-9.
100. Huang, D.C. and A. Strasser, *BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death*. Cell, 2000. **103**(6): p. 839-42.

101. Cheng, E.H., et al., *BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis*. Mol Cell, 2001. **8**(3): p. 705-11.
102. Guo, K., et al., *Hypoxia induces the expression of the pro-apoptotic gene BNIP3*. Cell Death Differ, 2001. **8**(4): p. 367-76.
103. Ray, R., et al., *BNIP3 heterodimerizes with Bcl-2/Bcl-X(L) and induces cell death independent of a Bcl-2 homology 3 (BH3) domain at both mitochondrial and nonmitochondrial sites*. J Biol Chem, 2000. **275**(2): p. 1439-48.
104. Reinartz, M., et al., *AKT1 and AKT2 induce distinct phosphorylation patterns in HL-1 cardiac myocytes*. J Proteome Res, 2014. **13**(10): p. 4232-45.
105. De Giorgi, F., et al., *The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization*. FASEB J, 2002. **16**(6): p. 607-9.
106. Precht, T.A., et al., *The permeability transition pore triggers Bax translocation to mitochondria during neuronal apoptosis*. Cell Death Differ, 2005. **12**(3): p. 255-65.
107. Yethon, J.A., et al., *Interaction with a membrane surface triggers a reversible conformational change in Bax normally associated with induction of apoptosis*. J Biol Chem, 2003. **278**(49): p. 48935-41.
108. Rostovtseva, T.K., et al., *Bid, but not Bax, regulates VDAC channels*. J Biol Chem, 2004. **279**(14): p. 13575-83.
109. Gustafsson, A.B., et al., *Apoptosis repressor with caspase recruitment domain protects against cell death by interfering with Bax activation*. J Biol Chem, 2004. **279**(20): p. 21233-8.
110. Terrones, O., et al., *Lipidic pore formation by the concerted action of proapoptotic BAX and tBID*. J Biol Chem, 2004. **279**(29): p. 30081-91.
111. Graham, R.M., et al., *A unique pathway of cardiac myocyte death caused by hypoxia-acidosis*. J Exp Biol, 2004. **207**(Pt 18): p. 3189-200.



## **10. Danksagung**

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. med. Tienush Rassaf für die freundliche Überlassung des Themas und die Möglichkeit dieses unter seiner Betreuung in der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und in der Klinik für Kardiologie am Westdeutschen Herz- und Gefäßzentrum der Universität Duisburg-Essen bearbeiten zu können.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Sonja Esfeld bedanken, die meine Arbeit betreut und mich dabei sehr unterstützt hat. Vielen Dank für die zahlreichen Erklärungen, Tipps und Tricks. Ich weiß deine Geduld sehr zu schätzen.

Mein Dank gilt Dr. Ulrike Hendgen-Cotta, die meine Arbeit als Laborleitung betreut und immer ein wachsames Auge auf meine Ergebnisse hatte. Danke für die konstruktiven Gespräche.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des kardiologischen Labors der Universität Düsseldorf sowie des CardioScienceLabs der Universität Duisburg-Essen, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Mutter, die mich während der Zeit moralisch, ideell und finanziell unterstützt und an den richtigen Stellen für Ablenkung gesorgt hat. Ich danke außerdem meinem Vater, der mir geistig immer eine große Stütze war.

Außerdem möchte ich meinem Mann Robert Schrimpf und allen anderen Menschen danken, die mich auf diesem Weg begleitet, unterstützt und angespornt haben. Ihr wart mir eine große Hilfe.