

Adenin - Nukleotid - Translokator - 1 und Ischämie / Reperfusion

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus - Liebig - Universität Gießen

vorgelegt von Lynetskiy, Oleg
aus Kyjiw / Kiew, Ukraine

Gießen 2025

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Physiologisches Institut

Gutachterin: PD Dr. Jacqueline Heger

Gutachter: Prof. Dr. Johannes Kalder

Tag der Disputation: 09.02.2026

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung.....	1
1.1	Epidemiologie.....	1
1.2	Interventionelle Therapie des Myokardinfarktes.....	1
1.3	Physiologie des Mitochondriums.....	2
1.3.1	Oxidative Phosphorylierung.....	4
1.3.2	Calcium - Homöostase.....	6
1.3.3	Membranpotential.....	8
1.3.4	Reaktive Sauerstoffspezies.....	9
1.3.5	Mitochondriale Subpopulationen.....	11
1.4	Adenin - Nukleotid - Translokator.....	12
1.4.1	Physiologie.....	12
1.4.2	Pathologische Zustände.....	13
1.4.3	Untersuchungen mit transgener Überexpression.....	15
1.5	Mitochondriale Permeability Transition Pore.....	17
1.6	Pathophysiologie der Ischämie und Reperfusion.....	21
1.7	Fragestellung.....	25
2	Methoden.....	26
2.1	Rattensektion.....	26
2.2	Langendorff - Messung.....	27
2.3	Mitochondrienisolation.....	30
2.4	Proteinbestimmung nach Lowry.....	31
2.5	Mitochondrienfunktionsmessungen.....	32
2.5.1	Respirationsmessung.....	32
2.5.2	Calcium - Retention - Capacity.....	35
2.5.3	Messung der Autofluoreszenz und des Membranpotentials.....	36
2.5.4	Amplex Ultra Red Hydrogen Peroxide Peroxidase Assay/ ROS - Messung.....	37
2.6	Molekularbiologische Analysen.....	38
2.6.1	DNS - Isolation.....	38
2.6.2	DNS - PCR.....	39
2.6.3	Gelelektrophorese.....	40

2.6.4	RNS - Isolation.....	41
2.6.5	Bestimmung RNS - Konzentration	42
2.6.6	Herstellung cDNS	42
2.6.7	Real - Time - PCR.....	44
3	Auswertung	46
3.1	Mitochondrienfunktionsmessungen.....	46
3.1.1	Respirationsmessung.....	46
3.1.2	Calcium - Retention - Capacity	47
3.1.3	Messung der Autofluoreszenz.....	50
3.1.4	Messung des Membranpotentials.....	51
3.1.5	Amplex Ultra Red Hydrogen Peroxide Peroxidase Assay / ROS - Messung	52
3.2	ANT - 1 - Expressionsanalyse	53
3.3	Statistik	53
4	Ergebnisse	55
4.1	ANT - 1 - Expressionsanalyse	55
4.2	Biometrie.....	56
4.3	Respirationsmessungen.....	58
4.4	Calcium - Retention - Capacity.....	61
4.5	Autofluoreszenz	62
4.6	Membranpotential.....	64
4.7	Amplex Ultra Red Hydrogen Peroxide Peroxidase Assay / ROS - Messung	66
5	Diskussion	69
5.1	Interpretation der Ergebnisse	69
5.2	Beurteilung des Ischämie - Reperfusion - Modells.....	73
5.3	Mögliche Benefits für den Menschen.....	75
5.4	Klinischer Ausblick	77
6	Zusammenfassung.....	79
6.1	Deutsch	79
6.2	Englisch.....	80
	Abbildungsverzeichnis	i

Tabellenverzeichnis.....	ii
Abkürzungsverzeichnis	iii
Tierverzeichnis	viii
Stoffverzeichnis.....	ix
Geräte- / Werkzeug- / Softwareverzeichnis	xxviii
Literaturverzeichnis.....	1
Nutzungsgenehmigungen	lxvii
Erklärung zur Dissertation	lxviii
Danksagungen	lxix

1 Einführung

1.1 Epidemiologie

Im Jahr 2022 waren Herzerkrankungen für 9,2% aller vollstationärer Fälle in Deutschland verantwortlich (Bestehorn, et al., 2024). Von diesen waren ca. 46,3% auf die Diagnosen ischämische Herzkrankheiten und akuter Myokardinfarkt zurückzuführen (Bestehorn, et al., 2024). Beide Diagnosen zusammen sind für 11,7% aller Todesfälle in Deutschland im selben Jahr verantwortlich (Bestehorn, et al., 2024). Ischämische Herzkrankheit und koronare Herzerkrankung (KHK¹) werden synonym verwendet und diese bilden das Grundleiden zum Myokardinfarkt (Herold, 2015).

Die mangelnde Sauerstoffversorgung der Myokardzellen aufgrund von Koronarstenosen ist die zugrundeliegende Pathophysiologie (Herold, 2015). Unter anderem sind arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Dyslipidämie und Nikotinabusus als Risikofaktoren der KHK identifiziert worden (Herold, 2015).

Große Forschungsverbände sind aufgebaut worden, um die Diagnostik und Therapie der KHK zu verbessern sowie die Sterblichkeit dieser zu reduzieren. Durch Prävention konnte die Sterblichkeit bereits gesenkt werden (Herz-Kreislauf-Forschung, 2022).

1.2 Interventionelle Therapie des Myokardinfarktes

Bereits vor über 40 Jahren ist mit Hilfe von Koronarangiographien festgestellt worden, dass innerhalb der ersten 24 Stunden nach dem Einsetzen von typischen Myokardinfarktsymptomen in 65 bis 87% der Fälle ein Thrombus vorlag, der zu einer Reduktion des Blutflusses führte (DeWood, et al., 1980).

Gemäß aktuellen Leitlinien soll bei entsprechender Indikation unter Berücksichtigung weiterer Kriterien mit Hilfe der perkutanen Koronarintervention der Blutfluss wiederhergestellt werden (Byrne, et al., 2023).

Paradoxerweise wird die Infarktgröße nicht nur durch die Dauer bestimmt, in welcher ein reduzierter Blutfluss herrscht, sondern auch durch die nach der Rekanalisierung bedingte Reperfusion (Sluijter, et al., 2014).

¹ Im Fließtext werden alle Akronyme bei Erstnennung zunächst ausgeschrieben, um im weiteren Verlauf auf die Ausschreibung zu verzichten. Zusätzlich finden sich alle Abkürzungen im Abkürzungsverzeichnis.

Dieser Zustand wird als Ischämie-Reperfusionsschaden (I/R-Schaden) bezeichnet, dessen Ursache unter anderem in den Mitochondrien zu suchen ist. Während der Reperfusion kommt es zu einer Öffnung der mitochondrialen Permeability Transition Pore (mPTP), welche im besagten Organell lokalisiert ist. Eine Folge von vielen hieraus ist die Induktion von Apoptose und Nekrose in den Kardiomyozyten (Sluijter, et al., 2014). Im Zuge dessen liegt ein großes wissenschaftliches Augenmerk darauf, Möglichkeiten zu erforschen, die Infarktgröße im Zusammenhang mit dem I/R-Schaden zu reduzieren. So haben kurze Ischämieepisodes während unterschiedlicher Phasen der I/R einen protektiven Benefit demonstriert (Zhao, et al., 2003; Sluijter, et al., 2014). Die darin eingebundenen Signalwege beziehen die Mitochondrien häufig mit ein (Sluijter, et al., 2014).

So konnte in mehreren Studien zusätzlich gezeigt werden, dass der ADP/ATP-Translokator (ANT) einen großen Einfluss auf die Modulation des I/R-Schadens sowie die Kardioprotektion hat (Feng, et al., 2008; Miura, et al., 2009; Chen, et al., 2015).

1.3 Physiologie des Mitochondriums

Das Mitochondrium ist das zentrale Organell einer Zelle – insbesondere bei Kardiomyozyten –, um diese mit Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) zu versorgen, welches aus Adenosindiphosphat (ADP) während der oxidativen Phosphorylierung synthetisiert wird (Schartl, et al., 2009; Nolfi-Donagan, et al., 2020). Durch diesen Mechanismus werden in Kardiomyozyten unter physiologischen Bedingungen 90% der gesamten ATP-Menge bereitgestellt (Yang, et al., 2015). Aus diesem Grund und zusätzlich, um eine ausreichende Versorgung sicherzustellen, kann die Gesamtheit aller Mitochondrien bis zu 36% des Volumens einer Myokardzelle beanspruchen (Pape, et al., 2019).

Auch ist das Mitochondrium mit dem Citratzyklus der zentrale Punkt des Metabolismus von Kohlenhydraten, Fettsäuren und Aminosäuren. Wie schon im Namen inbegriffen, handelt es sich hierbei um einen Kreislauf, in dem an verschiedenen Punkten die Stoffwechselprodukte ein- und abfließen, wodurch die zuvor genannten Stoffklassen zu einem bestimmten Anteil ineinander transformiert werden können (Schartl, et al., 2009). Das Mitochondrium besitzt eine innere und eine äußere Membran. Im Gegensatz zur äußeren ist die innere Membran stark aufgefaltet. Diese Auffaltungen werden Cristae genannt. Durch diese wird die Oberfläche stark vergrößert und damit ebenso die Anzahl

an zeitgleich ablaufenden chemischen Reaktionen, die unter anderem die benötigte Energie synthetisieren (Nielsen, et al., 2016), (Abbildung 1).

Abbildung 1: Aufbau Mitochondrium

Aus urheberrechtlichen Gründen darf diese Abbildung nicht genutzt werden.

Quelle: Endspurt Vorklinik, Biochemie 3, 3. Auflage 2015, Thieme

So besteht die innere Membran bis zu 75 % aus Proteinen (Schartl, et al., 2009). Zusätzlich sind bis zu 20 % aller mitochondrialer Proteine in diesem Kompartiment gebunden (Alberts, et al., 2002). In der Matrix besitzt dieses Organell ein eigenes Genom. Allerdings ist ein Teil der mitochondrialen Genomprodukte vom Kerngenom der Zelle kodiert (Schartl, et al., 2009), (Abbildung 1).

Das Genom ist in der Nähe der inneren Membran lokalisiert, in welcher die Proteinkomplexe der oxidativen Phosphorylierung verankert sind (Schartl, et al., 2009). Dadurch hat das Genom eine exponierte Lage gegenüber erhöhten Konzentrationen von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), (Schartl, et al., 2009; Costa, et al., 2011).

Das im Mitochondrium gebildete ATP wird unter anderem dafür benötigt, um die Permeabilitätsbarriere der inneren Mitochondrienmembran als auch um die Homöostase diverser Ionen – Natrium oder Calcium als Beispiel – aufrechtzuerhalten (Yang, et al., 2015).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass das Mitochondrium mit der mPTP ein Bindeglied von Signalkaskaden ist, welche während der Prä- und Postkonditionierung der I/R beeinflusst werden, wodurch Kardioprotektion einerseits ermöglicht und der Zelltod von Kardiomyozyten andererseits verhindert wird (Argaud, et al., 2005; Tsang, et al., 2005; Halestrap, et al., 2015). Unter Präkonditionierung werden Mechanismen zusammengefasst, welche auf die mPTP vor der I/R einwirken, wodurch die Öffnung der Pore während der Reperfusion gehemmt wird (Khaliulin, et al., 2007; Clarke, et al., 2008;

Halestrap, et al., 2015). Die Postkonditionierung umfasst Mechanismen, die einen ähnlichen Effekt aufweisen, aber erst während der Reperfusion die mPTP beeinflussen (Cohen, et al., 2007; Fujita, et al., 2007).

1.3.1 Oxidative Phosphorylierung

Der zentrale Prozess für die Energiegewinnung in Form von ATP bildet die oxidative Phosphorylierung (Nolfi-Donagan, et al., 2020). Hierunter wird die Erzeugung eines elektrochemischen Gradienten durch die Atmungskette, welcher daraufhin durch die ATP-Synthase genutzt wird, ATP zu synthetisieren, verstanden (Nolfi-Donagan, et al., 2020).

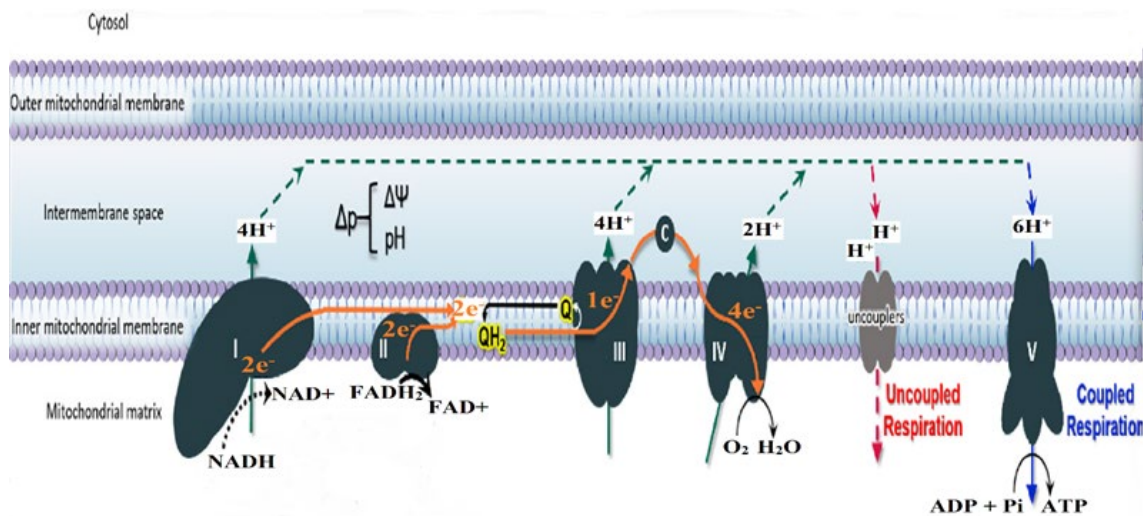
Die Atmungskette besteht aus vier Enzymkomplexen. Komplex II – Succinat-Dehydrogenase/Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase – ist zusätzlich ein Bestandteil des Citratzyklus (Schartl, et al., 2009). Diese Komplexe inklusive der ATP-Synthase sind komplett in die innere Membran des Mitochondriums eingebettet (Schartl, et al., 2009), (Abbildung 2).

Nach der Metabolisierung der verschiedenen Substrate im Citratzyklus entsteht Nicotinamidadenindinukleotid ($\text{NADH} + \text{H}^+$) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FADH_2), welche ihre Elektronen an verschiedenen Stellen in der Atmungskette einspeisen – $\text{NADH} + \text{H}^+$ im Komplex I, FADH_2 im Komplex II (Schartl, et al., 2009). Durch den Elektronentransport entlang dieser Kette zum Komplex IV werden Protonen in den Intermembranraum gepumpt – am Komplex II findet kein Protonentransport statt. Der so entstehende in Richtung Mitochondrienmatrix gerichtete Gradient wird durch die ATP-Synthase – auch Komplex V genannt – genutzt, um ATP aus ADP und Phosphat zu synthetisieren (Schartl, et al., 2009), (Abbildung 2).

Die transportierten Elektronen werden im Komplex IV an Sauerstoff gebunden und dieser reagiert daraufhin mit Protonen zu Wasser (Schartl, et al., 2009).

Unter ischämischen Bedingungen kommt es zu Einschränkungen der Atmungskette. Einerseits wird die oxidative Phosphorylierung inhibiert, was durch die Anhäufung von langkettigen Fettsäuren erklärt wird (Liepinsh, et al., 2016; Dambrova, et al., 2021). Zusätzlich kumuliert Succinat, das Substrat für den Komplex II (Chouchani, et al., 2014; Dambrova, et al., 2021). Auch ist die Aktivität von den Komplexen I, III und IV nach I/R eingeschränkt (Paradies, et al., 1999; Lesnefsky, et al., 2001; Dambrova, et al., 2021). Ebenfalls können beschädigte Mitochondrien ATP weniger effizient synthetisieren (Andres, et al., 2015).

Abbildung 2: Strukturen der oxidativen Phosphorylierung²



Quelle: Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement; Nolfi-Donagan, et al.; 2020; Redox Biology

Wurden bei Mäusen die Sentrin-spezifische Protease 5 (SEN5) künstlich hochreguliert, ein Gen, welches ebenfalls bei Herzinsuffizienz verstärkt exprimiert wird, so wurde eine verringerte Aktivität der Komplexe II und IV festgestellt (Kim, et al., 2015).

In anderen Untersuchungen wurde hingegen unter Hypoxie ein Hochregulieren von 151 Genen festgestellt, die Proteine für den Citratzyklus und die oxidative Phosphorylierung kodieren – beispielweise Pyruvatdehydrogenase alpha 1 (PDHA1) oder Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheit 5a (COX5A), (Schreiber, et al., 2004; Andres, et al., 2015). Hinter dieser Erscheinung wird eine Aktivierung des Hypoxie-induzierten Faktors 1 (HIF-1) als zugrundeliegender Mechanismus beschrieben. HIF-1 wiederum führt zu einer verstärkten Expression von Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma Coactivator-1 alpha (PGC-1α), welcher die zuvor beschriebenen Gene für die Energiebereitstellung aktiviert (Andres, et al., 2015).

Hat eine Präkonditionierung durch eine 10-minütige Ischämie stattgefunden, so konnte

² **Erläuterung zu den Abkürzungen:** ADP: Adenosindiphosphat; ATP: Adenosintriphosphat; C: Cytochrom c; e⁻: Elektron; FAD⁺/FADH₂: Flavin-Adenin-Dinukleotid; H₂O: Wasser; H⁺: Proton; NAD⁺/NADH+H⁺: Nicotinamidadenindinukleotid; O₂: Sauerstoff; Q/QH₂: Ubichinon/Ubichinol; Pi: anorganisches Phosphat I: Komplex I (NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase); II: Komplex II (Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase); III: Komplex III (Ubichinol-Cytochrom-c-Oxidoreduktase); IV: Komplex IV (Cytochrom-Oxidase); Komplex V (ATP-Synthase); Δp: elektrochemischer Protonengradient; ΔpH: pH-Gradient; ΔΨ: elektrisches Membranpotential

ein verringerter Abfall von ATP in den darauffolgenden 40 min einer Ischämie beobachtet werden (Murry, et al., 1986; Williams, et al., 2015). Der hierbei involvierte Mechanismus wurde nicht beschrieben. Bei anderen Untersuchungen konnte eine erhaltene Energieproduktion nach I/R beobachtet werden, wenn vor dieser die Mitochondrien einer ischämischen Vorbehandlung unterzogen wurden (Laclau, et al., 2001; Ong, et al., 2015).

Mäuse, bei denen Übergewicht und ein metabolisches Syndrom durch eine spezielle Diät induziert wurden, zeigten eine verringerte ATP-Synthese als auch eine verringerte Aktivität von Komplex II (Sverdlov, et al., 2015). Der Zustand einer Herzinsuffizienz führt zu einem Herunterregulieren von Genen, die für die oxidative Phosphorylierung zuständig sind (Calmettes, et al., 2015). Sowohl Langzeit-Diabetes, ein Zustand der beim metabolischen Syndrom auftritt, als auch Herzinsuffizienz mindern die protektiven Effekte einer ischämischen Präkonditionierung (Abd-Efattah, et al., 2011; Calmettes, et al., 2015). Bei beiden Pathologien wird vermutet, dass der verminderte Schutz aus einer veränderten Kinetik von Hexokinasen resultiert (Calmettes, et al., 2015). Auch scheint Diabetes HIF-1 – modifiziert den oxidativen Stoffwechsel – und die RISK-Kaskade (Reperfusion Injury Salvage Kinase) – modifiziert die oxidative Phosphorylierung – negativ zu beeinflussen. Beide Faktoren sind bei der ischämischen Präkonditionierung involviert (Iliodromitis, et al., 2007; Knutson, et al., 2021; Yellon, et al., 2023). Selbst in alternden Organismen sind die Effekte der Präkonditionierung – Bereitstellung von ATP – eingeschränkt (Abete, et al., 2010).

1.3.2 Calcium-Homöostase

Das zweifach positiv geladene Calcium ist ein wichtiges intrazelluläres Ion, welches vielfältige Aufgaben erfüllt. Unter anderem fungiert es als Second Messenger und Botenstoff innerhalb der intrazellulären Kommunikation, andererseits ist es für die Initiierung von Kontraktionen unabhängig vom Muskeltyp unumgänglich (Williams, et al., 2015; Pape, et al., 2019).

Calcium wird unter anderem im glatten endoplasmatischen Retikulum und auch in den Mitochondrien gespeichert (Nicholls, et al., 2004; Pape, et al., 2019). Zusätzlich existieren zwischen Bindestellen, welche Mitochondrien mit dem glatten endoplasmatischen Retikulum verbinden, Calcium-Mikrodomänen mit hohen Konzentrationen dieses Ions (Foskett, et al., 2015; Harrington, et al., 2015).

Die Calcium-Homöostase beeinflusst die metabolische Homöostase einer Zelle (Dorn II, et al., 2015). Aktuell ist nicht vollends geklärt, ob Mitochondrien eine Pufferfunktion für die Calcium-Homöostase erfüllen (Williams, et al., 2015). Störungen dieser Homöostase können zum Sterben von Kardiomyozyten oder zu Kontraktionsstörungen unter den Bedingungen einer Herzinsuffizienz führen bzw. einen Teilaspekt zu diesen beiden Entitäten beitragen (Dorn II, et al., 2015).

Im endoplasmatischen Retikulum unterliegt die Calciumkonzentration einer strengen Regulation. Jedwede Abweichung wird korrigiert (Pape, et al., 2019). Die Regulation der Calciumkonzentration im Zytoplasma von Skelett- und Herzmuskelzellen wird unter anderem durch die Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (SERCA) und durch die Calcium-ATPase der Zellmembran gewährleistet (Pape, et al., 2019). Erstgenannte Pumpe befördert Calcium unter ATP-Verbrauch in das endoplasmatische Retikulum, zweitgenannte Pumpe schleust Calcium unter ATP-Verbrauch aus der Zelle raus (Pape, et al., 2019). Das Ausschleusen des Calciums nach extrazellulär wird in Kardiomyozyten aber überwiegend durch den Natrium-Calcium-Exchanger (NCX) erfüllt (Roe, et al., 2015; Pape, et al., 2019).

Damit Calcium die Mitochondrienmatrix erreichen kann, muss es die äußere Membran über den Voltage-Dependent-Anion-Channel (VDAC) und die innere Membran über den mitochondrialen Calcium-Uniporter (MCU) passieren (Williams, et al., 2015). Über den VDAC ist ein bidirektionaler Transport möglich (Shoshan-Barmatz, et al., 2010). Das Ausschleusen des Calciums aus der Matrix findet ebenfalls über den NCX statt (Williams, et al., 2015). Durch das negative Potential an der inneren Mitochondrienmembran entsteht für das positiv geladene Calcium ein gerichteter Fluss in die Mitochondrienmatrix (Williams, et al., 2015).

Unter Ruhebedingungen innerhalb eines Kardiomyozyten ist die Calciumkonzentration innerhalb eines Mitochondriums identisch mit der im Zytoplasma. Die Konzentration beträgt etwa 100 nmol/l (Boyman, et al., 2014; Williams, et al., 2015; Pape, et al., 2019). Es resultiert aber ein Anstieg der betrachteten Konzentration innerhalb des Mitochondriums, sobald vermehrte kardiale Leistung auftritt (Williams, et al., 2015). Dieser Anstieg kann bei Dauerbelastung bis zum 30-fachen der Ruhekonzentration entsprechen (Boyman, et al., 2013; Williams, et al., 2015). Bei akut erhöhtem Energiebedarf im Herzen kumuliert Calcium in den Mitochondrien, was wiederum zu einer erhöhten Aktivität diverser Enzyme, welche bei der ATP-Produktion beteiligt sind, führt (Dorn II, et al., 2015). Calcium steigert die Aktivität verschiedener Enzyme des Citratzyklus, indirekt

wird die Aktivität der Komplexe I, III und IV erhöht, direkt wird die ATP-Synthase-Aktivität gesteigert und außerdem wird die NADH-Produktion erhöht (Glancy, et al., 2013; Williams, et al., 2015). Zusätzlich sind Interaktionen des Calciums mit dem ANT gezeigt worden (Halestrap, et al., 1990; Kokoszka, et al., 2004; Halestrap, et al., 2015).

Eine Überladung des Mitochondriums mit Calcium während I/R führt zu einer Öffnung der mPTP während der Reperfusion (Morciano, et al., 2015). Darauf folgend wird Calcium freigesetzt (Bernardi, et al., 2015). In Untersuchungen ist festgestellt worden, dass das Ausmaß des I/R-Schadens mit der akkumulierten Calciummenge am Ende der Ischämie korreliert (Halestrap, et al., 2015). Nichtsdestotrotz war der I/R-Schaden induzierbar, auch wenn gentechnisch die Calciumakkumulation vorher unterbunden wurde (Pan, et al., 2013). Auch sind kurzfristige Öffnungen der mPTP unabhängig von I/R beobachtet worden. Es wird vermutet, dass es sich bei diesem Phänomen um eine Regulation der Calcium-Homöostase handeln könnte (Hüser, et al., 1998; Bernardi, et al., 2015).

Nach einer ischämischen Präkonditionierung konnte die calciumbedingte Öffnungswahrscheinlichkeit der mPTP reduziert werden (Clarke, et al., 2008). Als zugrundeliegender Mechanismus wird ein erhöhter Bestand an Cytochrom c vermutet, wodurch eine verstärkte Phosphorylierung der mPTP durch oxidativen Stress verhindert werden kann (Pasdois, et al., 2012; Halestrap, et al., 2015).

Wurde bei Mäusen SENP5 künstlich hochreguliert, sodass sie eine Herzinsuffizienz entwickelten, konnte eine erhöhte Menge an Calcium in den Kardiomyozyten, geschwollene Mitochondrien und geschädigten Cristae festgestellt werden (Kim, et al., 2015).

1.3.3 Membranpotential

Die Erzeugung von ATP durch die ATP-Synthase erfordert Energie. Diese Energie wird durch einen elektrochemischen Protonengradienten an der inneren Mitochondrienmembran erzeugt (Schartl, et al., 2009). Komplex I, III und IV pumpen dazu Protonen in den Intermembranraum. Die hierfür benötigten Elektronen werden durch $\text{NADH} + \text{H}^+$ und FADH_2 bereitgestellt (Schartl, et al., 2009).

Der elektrochemische Protonengradient (Δp) setzt sich aus dem pH-Gradienten (ΔpH) und dem elektrischen Membranpotential ($\Delta \Psi$) zusammen (Brown, 1992). Letzteres hat einen Wert zwischen -140 mV und -180 mV. Das negative Potential der inneren Mitochondrienmembran sowie das leicht alkalische Milieu der Mitochondrienmatrix bewir-

ken, dass Protonen bevorzugt in Richtung der Matrix fließen (Schartl, et al., 2009; Foskett, et al., 2015; Williams, et al., 2015).

Das Verhältnis von $\text{NADH} + \text{H}^+ / \text{NAD}^+$ und von ATP / ADP dienen der Kontrolle der Geschwindigkeit der ATP-Synthese (Brown, 1992).

Hohe Calciumspiegel führen zu einer Öffnung der mPTP, infolgedessen es zu einem Abfall des Membranpotentials kommt. Dies wird bei I/R beobachtet (Ruiz-Meana, et al., 2006; Ong, et al., 2015).

Untersuchungen an isolierten Kardiomyozyten zeigten unterschiedliches Verhalten des Membranpotentials nach der Reperfusion. Dauerte die vorausgegangene Ischämie weniger als 30 min, so wurde eine Repolarisation des Membranpotentials beobachtet, wohingegen bei Ischämien, welche länger als eine Stunde anhielten, es sowohl zu Depolarisation als auch Repolarisation kam (Solhjoo, et al., 2015). Die letztgenannte Beobachtung begünstigt die Entstehung von Arrhythmien (Solhjoo, et al., 2015).

Verschiedene Auswirkungen der ischämischen Präkonditionierung führten zu einer Inhibition der mPTP, sodass diese während der Reperfusion verschlossen blieb (Ong, et al., 2015).

1.3.4 Reaktive Sauerstoffspezies

Die Gesamtheit aller reaktiver Sauerstoffspezies, Superoxidradikale mitinbegriffen, wird als ROS^3 bezeichnet. Die überwiegenden Quellen von intrazellulärem ROS sind die Mitochondrien mit der Atmungskette (Ikeda, et al., 2015). Prinzipiell entstehen ROS in den Komplexen I bis III, dennoch scheinen die Komplexe I und III die meisten ROS zu produzieren und in Komplex IV werden keine gebildet (Chen, et al., 2003; Kudin, et al., 2004; Schartl, et al., 2009; Brand, 2010; Fuhrmann, et al., 2017; Kadenbach, 2020). Reaktive Sauerstoffspezies fungieren zusätzlich als Second Messenger, um adaptive Prozesse zu initiieren (Song, et al., 2014; Ikeda, et al., 2015).

Innerhalb der Atmungskette bildet Sauerstoff den Hauptakzeptor für die transferierten Elektronen. Sobald die Sauerstoffkonzentration einen bestimmten Wert unterschreitet – $10 \mu\text{mol/l}$ wird als Wert aufgeführt – sinkt die ROS-Produktion (Hoffman, et al., 2009; Dambrova, et al., 2021).

Alternde und beschädigte Mitochondrien produzieren vermehrt ROS. Die erhöhte Men-

³ Oxidativer Stress und vermehrte Bildung von ROS werden synonym verwendet.

ge an reaktiven Sauerstoffspezies schädigt vermehrt die Mitochondrien, was wiederum zu einer ROS-induzierten-ROS-Produktion führt (Ikeda, et al., 2015; Nishida, et al., 2015).

Auch während Ischämien entsteht erhöhter oxidativer Stress (Sciarretta, et al., 2013; Ikeda, et al., 2015). Während der anschließenden Reperfusion kommt es zu einer massiven Bildung von ROS, da Sauerstoff wieder für die Atmungskette verfügbar ist (Morciano, et al., 2015). Wie bereits im Kapitel über die oxidative Phosphorylierung beschrieben, kommt es während einer Ischämie zu einer Kumulation von Succinat, welches dann während der Reperfusion verstärkt verstoffwechselt wird und die gebildeten Elektronen aber durch den reversen Elektronentransport (RET) an Komplex I weitergeleitet werden, wodurch es ebenso zu einem starken Anstieg an ROS kommt (Chouchani, et al., 2014; Dambrova, et al., 2021). Der physiologische Weitertransport an Komplex III ist verhindert, weil die gleichzeitig angefallenen Fettsäuren einerseits die Enzyme der Atmungskette inhibieren, andererseits vermutlich als Ionophor fungieren und dadurch das Membranpotential abnimmt (Schönfeld, et al., 2007; Dambrova, et al., 2021). Ein Ionophor ist eine Substanz, welche Ionen durch eine Membran schleusen kann. Das Succinat ist aber nur für einen Teil der vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies verantwortlich, da das Succinat nur in den ersten Minuten der Reperfusion zur ROS-Produktion beiträgt. Es wird aber für mindestens 30 min ab Beginn der Reperfusion eine erhöhte Produktion beobachtet (Zhang, et al., 2018; Dambrova, et al., 2021). Die Permeability Transition Pore kann sich bei oxidativem Stress öffnen (Halestrap, et al., 1997). Es wird vermutet, dass kurzfristige Öffnungen der mPTP unabhängig von I/R als Regulator der ROS-Konzentration fungieren könnte (Hüser, et al., 1998; Bernardi, et al., 2015).

Mäuse, bei denen Übergewicht und ein metabolisches Syndrom durch eine spezielle Diät induziert wurden, wiesen eine erhöhte Produktion von Wasserstoffperoxid – eine Variante von ROS – auf (Sverdlov, et al., 2015). Bei diabetischen Stoffwechsellagen führt die Hyperglykämie einerseits zu einer Steigerung des Membranpotentials in den Mitochondrien und andererseits zu einer Störung der ATP-Synthase, wodurch als Konsequenz vermehrt ROS gebildet wird (Ni, et al., 2016; Dambrova, et al., 2021). Eine ähnliche Situation wird bei I/R beobachtet (Dambrova, et al., 2021). Zusätzlich aufgrund der Hyperglykämie kommt es im Zytosol der Kardiomyozyten zu einer Aktivierung der Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase 2 (NADPH-Oxidase 2). Auch dies hat zu Folge, dass vermehrt ROS gebildet wird (Dambrova, et al., 2021).

Durch erhöhten oxidativen Stress werden Lipide peroxidiert und die daraus entstehenden Produkte führen zu einer Inhibition der Transportaktivität vom ANT (Chen, et al., 1995; Clarke, et al., 2008; Halestrap, et al., 2015; Morciano, et al., 2015).

Verschiedene Formen der ischämischen Konditionierung können die Ausprägung von oxidativem Stress während der Reperfusion abmildern (Sun, et al., 2005; Clarke, et al., 2008; Ong, et al., 2015). Weiterhin ist in anderen Untersuchungen festgestellt worden, dass es bestimmte Bedingungen zu geben scheint, bei welchen ROS - Fänger kardioprotektiv gegen I/R - Schaden wirken (Halestrap, et al., 2015). ROS - Fänger sind Antioxidantien, wodurch oxidativer Schaden reduziert werden kann (Adlam, et al., 2005). Ebenso scheint ein intakter Glucosestoffwechsel für die Kardioprotektion wichtig zu sein. Eine Überladung der Mitochondrien mit Fettsäuren während der Ischämie führt zu einer Hemmung von diesem Stoffwechsel, was eine Steigerung der ROS - Produktion bewirkt (Dambrova, et al., 2021).

1.3.5 Mitochondriale Subpopulationen

Im Herzen lassen sich verschiedene Subpopulationen von Mitochondrien unterscheiden. Es existieren subsarkolemmale und interfibrilläre Mitochondrien.

Subsarkolemmale Mitochondrien (SSM) sind direkt an der Plasmamembran der Kardiomyozyten lokalisiert, wohingegen die interfibrillären Mitochondrien (IFM) zwischen den Myofibrillen eingebettet sind (Hoppel, et al., 2009).

Bildmorphologisch existieren Unterschiede zwischen den beiden Populationen. Die SSM haben eine rundliche Struktur und besitzen eine weniger dichte Matrix auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen im Vergleich zu IFM. Die IFM sind stäbchenförmig konfiguriert (Holmuamedov, et al., 2012). Bezüglich der funktionellen Unterschiede wird vermutet, dass die subsarkolemmale Mitochondrien Energie vor allem für den Ionen- und Metabolitentransport bereitstellen und die interfibrillären Mitochondrien vor allem Energie für die Kontraktionen generieren (Müller, 1976; Hollander, et al., 2014). 20 min Ischämie gefolgt von 30 min Reperfusion reduzierten die Aktivität des ANT in beiden Fraktionen der Mitochondrien (Duan, et al., 1989; Hollander, et al., 2014).

In beiden Subpopulationen können Signal Transducer and Activator of Transcription Proteine (STAT) vom Typ 1 und 3 nachgewiesen werden, die eine wichtige Rolle bei der ischämischen Prä- und Postkonditionierung vom Myokard spielen, wodurch die Infarktgröße beeinflusst werden kann (Boengler, et al., 2010).

1.4 Adenin - Nukleotid - Translokator

Eines der Schlüsselproteine, worauf besonderes wissenschaftliches Augenmerk gelegt wird, ist der ADP/ATP-Translokator. Dieser Transporter nimmt eine zentrale Rolle bei der Energieversorgung einer Zelle ein (Dörner, et al., 2007).

1.4.1 Physiologie

Der ANT ist ein wichtiges Protein, welches in der inneren Mitochondrienmembran verankert ist (Dörner, et al., 2007). Die Funktion dieses Translokators ist es, ADP und ATP entlang der inneren Mitochondrienmembran zu transportieren. Dabei wird unter normoxischen Bedingungen ADP³⁻ in die Mitochondrienmatrix ein- und ATP⁴⁻ aus der Matrix ausgeschleust (Liu, et al., 2013). Der Austausch findet im Verhältnis 1:1 statt und ist abhängig vom Membranpotential (Klingenberg, et al., 1966; Klingenberg, 1980; Dörner, et al., 2007). Nichtsdestotrotz ist ein umgekehrter Fluss ebenso möglich (Klingenberg, 1980). Selbst bei nicht vorhandenem Membranpotential findet ein Austausch statt (Klingenberg, 1980). Nach aktuellem Stand wird der Transport der genannten Nukleotide an der besagten Membran hauptsächlich nur durch den ANT ermöglicht (Chen, et al., 2023). Ebenso ermöglicht der ANT einen Protonenfluss, dessen zugrundeliegender Mechanismus unklar ist, wodurch aber das Membranpotential leicht vermindert wird und dadurch die ATP-Synthase weniger effektiv arbeiten kann (Brand, et al., 2005; Liu, et al., 2013).

Der Translokator hat eine sehr hohe Spezifität gegenüber ADP und ATP. Selbst Adenosinmonophosphat (AMP) wird nicht gebunden (Pfaff, et al., 1968). Die Austauschrate ist proportional zur ATP-Produktionsrate der oxidativen Phosphorylierung (Klingenberg, 1980). Dennoch ist die Austauschrate gering, und um das vermehrt anfallende ATP aus der Atmungskette suffizient abtransportieren zu können, werden zusätzliche ANT-Moleküle in die Membran eingebaut (Klingenberg, 1980).

10% aller Proteine der inneren Mitochondrienmembran ist dieser Translokator. Dies verdeutlicht seine wichtige Funktion bei der Sicherstellung der Energieversorgung einer Zelle (Clemençon, et al., 2013).

Die genetische Information über diesen Transporter ist im Kerngenom codiert und es ist nicht abschließend geklärt, ob dieser seine Funktion als Monomer bzw. als Dimer erfüllt (Liu, et al., 2013). Ein Monomer hat ein Gewicht von 32 kDa (Klingenberg, 1980). Beim Menschen existieren vier Isoformen – eins bis vier –, wohingegen bei Nagern ANT-3 nicht exprimiert wird (Ellison, et al., 1996; Liu, et al., 2013). Die Aminosäuresequenz

aller Isoformen hat eine Übereinstimmung von 70 bis 90% (Liu, et al., 2013). Alle Isoformen werden zusammen in einem gewebespezifischen Verhältnis koexprimiert (Dörner, et al., 1997; Dolce, et al., 2005; Dörner, et al., 2007; Liu, et al., 2013). Im Herzen wird vor allem ANT - 1 exprimiert und sein Anteil von allen Isoformen in diesem Organ beträgt 70% (Dörner, et al., 1997; Dörner, et al., 2007). Hinsichtlich der Konformation existiert ein offener und ein geschlossener Zustand (Calmettes, et al., 2015).

Der ANT ist zudem ein wichtiges Bindeglied zwischen der Energiebereitstellung und dem Energieverbrauch innerhalb einer Zelle. Darauf soll auch der regulatorische Einfluss auf die oxidative Phosphorylierung hinweisen (Dörner, et al., 2007; Walther, et al., 2007). Weiterhin sind Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren und Proteinen, welche für Zellkommunikation zuständig sind, sowie mit pro- und anti-apoptischen Signalen beschrieben (Dörner, et al., 2007). Ebenso wird eine direkte Beteiligung am Prozess des Zelltodes angenommen (Liu, et al., 2013).

Calcium scheint regulatorischen Einfluss auf den ANT zu nehmen (Williams, et al., 2015). Aber es kann zu einer Störung der Translokatorfunktion kommen, wenn in den Mitochondrien im Zuge einer Calciumüberladung das Membranpotential abgesenkt wird (Baba, et al., 2002; Dörner, et al., 2007). Auch sind Wechselwirkungen von oxidativem Stress und dem Membranpotential mit dem ANT beschrieben (Halestrap, et al., 1997). ROS zeigen eine hemmende Wirkung auf den Translokator (Dörner, et al., 2007). Das Cyclophilin D (CyP-D) kann ebenfalls mit diesem Translokator interagieren, was die Aufgabe des ANT in der zellulären Kommunikation verdeutlicht (Halestrap, et al., 1990). Die Aufgaben von CyP-D beinhalten die Regulation der mitochondrialen Permeability Transition Pore und der oxidativen Phosphorylierung sowie Unterstützung bei der Proteinfaltung (Porter, et al., 2018). Humanes CyP-D hat eine 85-prozentige Übereinstimmung mit dem CyP-D, welches Nager exprimieren (Alam, et al., 2015).

Es wird angenommen, dass verschiedene Modulatoren mittels des ADP/ATP-Translokators die Calciumempfindlichkeit der mPTP verändern, wodurch die Öffnung dieser reguliert wird (Halestrap, et al., 2003; Dörner, et al., 2007).

1.4.2 Pathologische Zustände

Nun wird auf die Situationen des ANT eingegangen, welche unter pathologischen Bedingungen herrschen.

Mäuseherzen, die einen ANT - 1 - Defizit aufweisen, zeigen ein reduziertes Ansprechen der Atmungskette auf ADP, weil letzteres nicht in die Mitochondrienmatrix geschleust

werden kann, wodurch die Stimulation von Komplex V ausbleibt (Graham, et al., 1997). Beim Menschen führt ein Defizit der entsprechenden Isoform zur Entwicklung einer hypertrophen Kardiomyopathie (Jordens, et al., 2002; Liu, et al., 2013). Es wird vermutet, dass dieses Defizit weiterhin zu einer reduzierten Funktion von Komplex V beiträgt (Liu, et al., 2013).

ANT-1-Null-Mutanten von Mäusen hatten Einschränkungen in der oxidativen Phosphorylierung (Esposito, et al., 1999; Dörner, et al., 2007). Knock-out-Mäuse ohne die herzspezifische Isoform des Translokators wiesen genauso eine kardiale Hypertrophie auf, hatten Funktionsdefizite in der Atmungskette sowie eine erhöhte Produktion an Wasserstoffperoxid, im mitochondrialen Erbgut war eine erhöhte Anzahl an Mutationen feststellbar und die Muskulatur war im Sinne einer mitochondrialen Myopathie verändert – definiert als erhöhte Anzahl an Mitochondrien (Graham, et al., 1997; Esposito, et al., 1999; Dörner, et al., 2007; Liu, et al., 2013).

Werden beim Patienten Antikörper gegen ANT-1 gebildet, kann dies im weiteren Verlauf zu einer Myokarditis oder dilatativer Kardiomyopathie beitragen (Schultheiss, 1989; Dörner, et al., 2007). Hierdurch wird die aerobe Energiegewinnung eingeschränkt. Und die zeitgleich steigende Laktatbildung deutet auf eine Kompensation über den anaeroben Stoffwechsel hin (Schultheiss, et al., 1995).

Bei Dyslipidämien herrschen erhöhte Konzentrationen von langkettigen Fettsäuren, die die Aktivität des ADP/ATP-Translokators stören können (Woldegiorgis, et al., 1981; Dörner, et al., 2007). Für Palmitinsäure konnte gezeigt werden, dass dieses Molekül den ANT hemmt (Ciapaite, et al., 2006). Wurde der Transport von Fettsäuren durch die innere Mitochondrienmembran verbessert, so wurden Störungen des Translokators bei Herzinsuffizienzpatienten abgeschwächt, wodurch die Leistungsfähigkeit gesteigert und der Schweregrad der Insuffizienz reduziert wurden (Kobayashi, et al., 1992; Dörner, et al., 2007).

Erhöhte Konzentrationen von Fettsäuren gehören auch zu den Ursachen vom Typ II Diabetes (Krebs, et al., 2005). Kardiale Mitochondrien von Mäusen, bei denen genetisch ein Typ I Diabetes induziert wurde, wiesen strukturelle Schäden in Form von aufgebrochenen Membranen und funktionelle Schäden in Form von Einschränkungen der Atmungskette auf (Shen, et al., 2004). Bei chronischen Prozessen wie einer Herzinsuffizienz oder dilatativer Kardiomyopathie zeigten Arbeiten, dass es zu einem veränderten Expressionsmuster der einzelnen Isoformen des Translokators kommt (Dörner, et al., 1997; Dörner, et al., 2000; Dörner, et al., 2007). Und auch unter den Bedingungen einer

ischämischen Kardiomyopathie ist die ANT-Aktivität gestört (Dörner, et al., 1997; Dörner, et al., 2007).

Während einer Ischämie kommt es zu einer Inhibition des ANT, weil langkettige Fettsäuren kumulieren (Shug, et al., 1975). Die Inhibition kann schon nach einer 5-minütigen Ischämiephase stattfinden. Und die Aktivität des Translokators bleibt auch nach einer anschließenden 30-minütigen Reperfusion reduziert (Duan, et al., 1989). Ergänzend wurde in anderen Untersuchungen an Herzmitochondrien festgestellt, dass es zu einer Verringerung der ANT-1-Moleküle nach einer Ischämiephase von zwei Stunden gekommen ist (Ning, et al., 1998).

Auch unter I/R wird die Hemmung des Translokators beobachtet, weil eine Peroxidierung des Phospholipides Cardiolipin stattfindet, wodurch die korrekte Ausrichtung des ANT-Proteins innerhalb der Membran nicht mehr gewährleistet ist (Nakagawa, 2004; Nury, et al., 2005; Dörner, et al., 2007).

1.4.3 Untersuchungen mit transgener Überexpression

Mittlerweile existieren viele Arbeiten, welche den Einfluss einer künstlichen Überexpression vom ANT bei transgenen Nagern (TG-ANT) unter ischämischen Zuständen untersucht haben.

Nichtsdestotrotz muss hiervon der Zustand nach einer Ischämie mit anschließender Reperfusion klar abgegrenzt werden. Der hiermit verbundene Schaden, welcher zum Beispiel beim Wiedereröffnen einer verschlossenen Koronararterie im Rahmen eines akuten Myokardinfarkts auftritt, muss als eigenständige Entität angesehen werden (Ong, et al., 2015).

Die Überexpression der herzspezifischen Isoform des ANT ging mit einer erhöhten Aktivität der Komplexe II bis IV einher (Walther, et al., 2007). Wurde die Aktivität des Translokators konstant gehalten oder sogar gesteigert, so wurde hierdurch der Energiemetabolismus der Zelle stabilisiert und eine Induktion der Apoptose verhindert (Walther, et al., 2007; Heger, et al., 2012).

Bei Mäusen, bei denen die Insulin-produzierenden-Zellen zerstört wurden, um einen Typ I Diabetes zu erzeugen, war die künstliche Überexpression des Translokators mit besseren Leistungsparametern des linken Ventrikels im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (WT) assoziiert (Wang, et al., 2009). Bei anderen Untersuchungen, bei denen bei Ratten ein arterieller Hypertonus durch eine künstliche Überexpression von Renin induziert wurde, konnten die nachteiligen Effekte durch eine zeitgleiche ANT-1-Überexpression

abgemildert werden. Kardiale Dysfunktion und Fibrose waren in Renin- und ANT-überexprimierten Ratten im Vergleich zu Renin-überexprimierten Ratten geringer, wohingegen die Aktivität der Atmungskette in der erstgenannten Gruppe höher war (Walther, et al., 2007). Andere Forschungsgruppen behandelten Kardiomyozyten aus Rattenherzen mit Transforming-growth-factor- β 1 (TGF- β 1), ein wichtiger Mediator, der bei arterieller Hypertonie zu Fibrose an Herz und Gefäßen führt, woraus sich eine Herzinsuffizienz entwickeln kann (Williams, 2001). Mitochondrien, isoliert aus Rattenherzen, die eine Überexpression von ANT-1 aufwiesen, hatten, obwohl sie mit TGF- β 1 stimuliert wurden, ein stabileres Membranpotential und es wurde mehr Calcium benötigt im Vergleich zur WT-Gruppe, bis es zu einer mPTP-Öffnung kam (Heger, et al., 2012).

Eine Möglichkeit, eine Ischämie im Herzen zu erzeugen, besteht darin, operativ die linke Koronararterie für 24 Stunden zu verschließen. So konnte in Versuchen gezeigt werden, dass unter diesen Bedingungen ANT-Ratten im Vergleich zu WT-Tieren ein höheres Überleben und sowohl eine niedrigere Rate an oxidativen Stress als auch weniger oxidativen Schaden an Proteinen hatten. Obwohl die Transportaktivität des ANT-1 im ischämischen Herzen in beiden Vergleichsgruppen reduziert war, konnte diese Reduktion durch die ANT-1-Überexpression kompensiert werden. Dadurch war die Aktivität des Translokators in infarzierten Herzen transgener Tiere höher im Vergleich zu WT-Tieren (Klumpe, et al., 2016).

Zwei Tage anhaltende Hypoxie bewirkt bei zwei bis drei Tagen alten Kardiomyozyten eine gesteigerte Expression des ANT-1. Diese Expression verhält sich additiv zu einer transgenen erhöhten Expression dieses Translokators (Winter, et al., 2016). Weiterhin war der Membranpotentialverlust in Mitochondrien und das Kardiomyozytensterben – gemessen anhand der Laktatdehydrogenasefreisetzung (LDH) – transgener Tiere geringer im Vergleich zu WT-Tieren (Winter, et al., 2016).

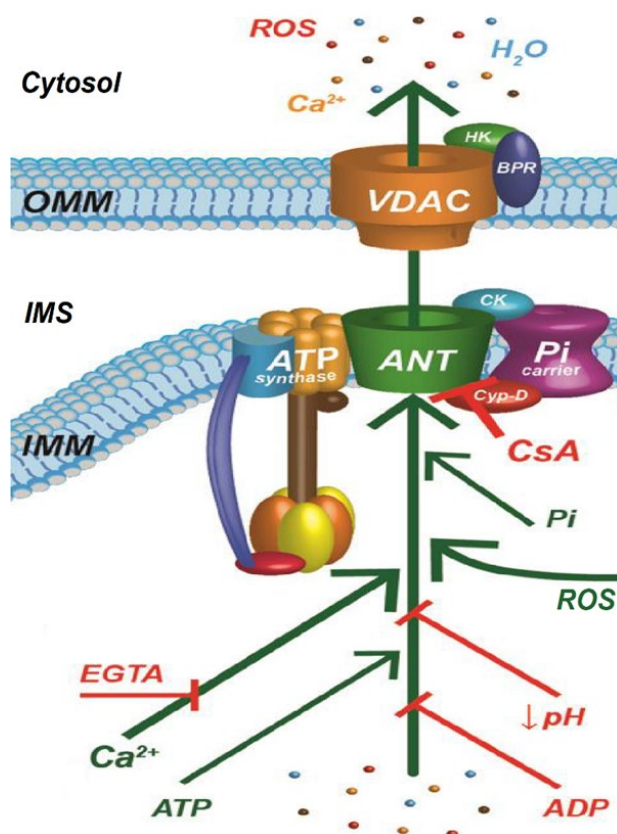
Nach einer ischämischen Präkonditionierung ist einerseits das Herunterregulieren des ANT während einer Ischämie abgeschwächt. Andererseits wird B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), ein anti-apoptotisches Signal, hochreguliert, welches am ANT bindet und dadurch das Öffnen der mPTP hemmt (Maulik, et al., 1999; Belzacq, et al., 2003).

1.5 Mitochondriale Permeability Transition Pore

Die mitochondriale Permeability Transition Pore stellt ein komplexes Gebilde der inneren Mitochondrienmembran dar. Bis heute ist nicht eindeutig geklärt, welche Proteine die Kernbausteine dieser Pore bilden und welche lediglich modulierende Funktionen erfüllen (Morciano, et al., 2021; Bernardi, et al., 2023).

Der Aufbau ist in Abbildung 3 illustriert.

Abbildung 3: Aufbau mitochondriale Permeability Transitions Pore⁴⁵



Quelle: The Mitochondrial Permeability Transition Pore-Current Knowledge of Its Structure, Function, and Regulation, and Optimized Methods for Evaluating Its Functional State; Endlicher, et al.; 2023; Cells

Zunächst wird vermutet, dass dieses Konstrukt sowohl in der äußeren als auch in der inneren Mitochondrienmembran eingebettet ist (Williams, et al., 2015). In der Über-

⁴ Die Abbildung stellt den nach aktuellem Wissenstand vermuteten Aufbau der Pore dar mit allen daran womöglich beteiligten Proteinen. Es sei darauf hingewiesen, dass hierbei mehrere Proteine aufgeführt sind, die nicht Teil dieser Arbeit sind, da diese entweder nicht untersucht wurden oder bei der Diskussion nicht berücksichtigt werden.

⁵ **Erläuterung zu den Abkürzungen:** ADP: Adenosindiphosphat; ATP: Adenosintriphosphat; ANT: ADP/ATP-Translokator; BPR: Benzodiazepin-Rezeptor; Ca²⁺: Calcium; CK: Kreatinkinase; Cyp-D: Cyclophilin D; EGTA: Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure; HK: Hexokinase II; H₂O: Wasser; IMM: innere Mitochondrienmembran; IMS: Intermembranraum; MPTP: mitochondriale Permeability Transition Pore; OMM: äußere Mitochondrienmembran; Pi: anorganisches Phosphat; ROS: Reaktive O₂-Spezies; VDAC: Voltage-Depend-Anion-Channel

sichtsarbeit von Bernardi et al. sind teils widersprüchliche Ergebnisse zusammengefasst. Einerseits konnten Untersuchungen die Bildung der mPTP in Mitoplasten – Mitochondrien, bei denen die äußere Membran entfernt wurde – zeigen, wodurch der äußeren Membran nur eine modulierende Eigenschaft zugeschrieben wird, unter anderem durch eingeschleuste Metabolite. Andererseits wird beschrieben, dass die äußere Membran zwingend für die Aktivierung der Pore ist. So existieren Untersuchungen, wonach in intakten Mitochondrien der VDAC in der äußeren Membran für die Bildung der mPTP notwendig ist. Demgegenüber stehen Ergebnisse, wonach der größte Anteil der Poren in den Cristae lokalisiert ist, wo kein direkter Kontakt zu der äußeren Membran bestehen kann (Sileikyte J, et al., 2011; Bernardi, et al., 2015; Bernardi, et al., 2023).

Andere Forschungsgruppen schreiben dem VDAC nur modulatorische Eigenschaften zu. Diese Beobachtungen stützen die vorher beschriebene modifizierende Fähigkeit der äußeren Membran, zumal diese Pore auch ohne diesen Kanal funktionsfähig ist (Baines, et al., 2007; Halestrap, et al., 2015; Morciano, et al., 2015).

Das gleiche gilt vermutlich für den Phosphat-Carrier (PiC) (Halestrap, et al., 2015; Morciano, et al., 2015; Robichaux, et al., 2022).

Das CyP-D scheint ebenfalls nicht notwendig zu sein für den Aufbau der mPTP. In Übersichtsarbeiten wird lediglich von modulierenden Interaktionen gesprochen bzw. es wird darauf hingewiesen, dass die Porenöffnung „positiv“ beeinflusst wird (Basso, et al., 2005; Halestrap, et al., 2015; Williams, et al., 2015). Cyclosporin A (CsA) gilt als potenter Inhibitor von CyP-D (Connern, et al., 1992).

Auch der aktuelle Wissensstand über den ANT umfasst nur eine Modulation der Pore (Chen, et al., 2023). Untersuchungen mit Knock-out-Mäusen konnten zeigen, dass es trotzdem zu einer Bildung der Pore kommt (Kokoszka, et al., 2004; Halestrap, et al., 2015; Morciano, et al., 2015; Williams, et al., 2015).

Neuere Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass ANT und CyP-D die zwei wichtigsten Regulatoren der mPTP sind. Bei genetisch modifizierten Mäusen, die eine Muskeldystrophie entwickelten, konnte durch Deletion der Gene für ANT-1 und CyP-D die Ausbildung von Nekrosen in der Muskulatur fast vollständig verhindert werden. Zusätzlich konnten die Mitochondrien dieser Tiere mehr Calcium aufnehmen bzw. war die Mitochondrienschwellung geringer ausgeprägt, wenn beide Gene fehlten im Vergleich zu Gruppen, in denen nur eins der beiden Gene fehlte (Broun, et al., 2023). Dieser synergistische Effekt in Bezug auf Calciumaufnahme und Mitochondrienschwellung wurde ebenfalls beobachtet, wenn in Mäuseherzen neben dem Gen für CyP-D ebenfalls

die Gene für ANT-1, ANT-2 und ANT-4 durch genetische Modifikation fehlten (Patel, et al., 2024). Bei beiden zuletzt genannten Studien gab es eine niedrige basale Expression von ANT-2. Das komplette Fehlen der Expression von jedweder Isoform von ANT wäre letal (Bround, et al., 2023; Patel, et al., 2024). Und Karch et al. hatte Mitochondrien aus diversen Organen – unter anderem aus dem Herzen – isoliert. Dazu verwendete er Tiere, denen ebenfalls ANT-1, ANT-2 und ANT-4 durch genetische Modifikation fehlten. Zusätzlich wurde CsA verwendet. Unter diesen Bedingungen konnte er keine Mitochondrienschwellung beobachten, nachdem die Calciumkonzentration auf 4,8 mmol/l – entspricht dem 48000-fachen der Ruhebedingung – gesteigert wurde (Karch, et al., 2019).

Bis jetzt liegen eindeutige Daten nur für die ATP-Synthase vor, wonach Bestandteile davon an der Porenbildung beteiligt sind (Bernardi, et al., 2015; Halestrap, et al., 2015; Morciano, et al., 2015).

Weiterhin wird auf die Eigenschaften der Permeability Transition Pore eingegangen.

Dieses Konstrukt ist für Moleküle bis zu einer Größe von 1,5 kDa durchlässig (Morciano, et al., 2015; Ong, et al., 2015). Zusätzlich ist dieses an der Calcium- und Energiehomöostase der Zelle beteiligt (Ong, et al., 2015). Auch wurde eine Beteiligung bei der Apoptose- und Nekrose-Induktion beschrieben; welcher der beiden Mechanismen eingeleitet wird, scheint vom Energiestatus der Zelle abhängig zu sein (Leist, et al., 1997; Alam, et al., 2015).

Für die Initiierung der Apoptose sind mehrere Prozesse beschrieben.

Einerseits scheint ein erniedrigtes Membranpotential nach Porenöffnung verantwortlich zu sein, andererseits beschreiben Untersuchungen, dass durch die Öffnung Apoptose-signale – zum Beispiel Caspase 3 bzw. 7 und Bcl-2-like Protein 4 (Bax) – freigesetzt werden (Kinnally, et al., 2011; Heger, et al., 2012). Letztere Beobachtung wird durch Arbeiten gestützt, nach welchen es zu einer Schwellung der äußeren Membran nach Porenöffnung kommt und Cytochrom c freigesetzt wird (Halestrap, et al., 2015; Ong, et al., 2015). Ebenfalls beteiligt ist das p53-Protein, ein Transkriptionsfaktor mit vielfältigen Einflüssen unter anderem auf die DNS-Reparatur, Zellzykluskontrolle und Apoptose. Letzteres ist bedingt durch Interferenzen mit der mPTP (Schartl, et al., 2009; Vaseva, et al., 2012). Zudem existieren Arbeiten, in denen hohe Calciumkonzentrationen zur Apoptose geführt haben (Harrington, et al., 2015).

Verschiedene Substanzen sind identifiziert worden, welche unterschiedlichen Einfluss auf die mPTP-Öffnung nehmen.

Hierunter fallen Calcium, anorganisches Phosphat, ROS und ADP (Al-Nasser, et al., 1986; Crompton, et al., 1987; Crompton, et al., 1988).

Hohe Calciumkonzentrationen sowie hohe Konzentrationen von anorganischem Phosphat führen zu einer entsprechenden Öffnung (Halestrap, et al., 2015; Morciano, et al., 2015). Calcium wird hierbei als stärkster Aktivator betrachtet (Morciano, et al., 2025). Diese Wirkung wird über die Bindung an die ATP-Synthase vermittelt (Morciano, et al., 2025). Magnesium fungiert als Antagonist des Calciums (Morciano, et al., 2025). Es wird diskutiert, ob bereits eine Calciumkonzentration von 200 bis 300 nmol/l ausreichend ist, damit es zu einer Öffnung der Pore kommt (Murphy, et al., 2025). Dabei scheint die Öffnung mehr vom Gesamtcalcium anstatt vom freien Calcium abhängig zu sein. Hierbei fungieren eventuell die mPTP selbst oder das ATP als Sensor für das Calcium (Murphy, et al., 2025). Reaktive Sauerstoffprodukte gelten auch als starke Aktivatoren (Morciano, et al., 2025). Zwei Mechanismen sind beschrieben, wie diese mit der Pore interagieren. Zum einen werden Thiolgruppen von den Porenproteinen direkt oxidiert, wodurch die Aktivität dieser erhöht wird, zum anderen nehmen die Moleküle über das CyP-D indirekt Einfluss auf die Pore (McStay, et al., 2002; Nguyen, et al., 2011; Alam, et al., 2015; Morciano, et al., 2015). In diesem Kontext wird CyP-D als Sensor für Calcium und ROS beschrieben (Alam, et al., 2015). Schließlich wurde auch bei niedrigen Konzentrationen von Adenin-Nukleotiden die Öffnung der mPTP beschrieben, wohingegen eine hohe ATP-Konzentrationen scheinbar nur indirekt dieses Ereignis hemmt (Halestrap, et al., 1997; Harrington, et al., 2015). Laut Morciano et al. können ADP und ATP eine starke Desensibilisierung der mPTP bewirken (Morciano, et al., 2025).

Zum Schluss sollen Ergebnisse zusammengefasst werden, die das komplexe Wirken der Permeability Transition Pore während ischämischer Zustände beschreiben.

Da während einer Ischämie Myokardzellen nicht ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden, wird die Energiegewinnung durch anaerobe Glykolyse sichergestellt. Das gebildete Lactat und die damit verbundene pH-Erniedrigung führen zu einem Verschluss der mPTP. Sobald die Homöostase aber wieder hergestellt wird, kommt es zu einer Öffnung (Bernardi, et al., 1992; Ong, et al., 2015). Dieses Öffnen wird auch durch eine Reperfusion des ischämischen Myokards verursacht (Ong, et al., 2015). So wird in der Übersichtsarbeit von Ong et al. beschrieben, dass die Reperfusion selbst zu einer Schädigung des Myokards über das Öffnen der Pore führt und dass dieser Prozess bis zu 50% zum finalen Myokardschaden beiträgt (Ong, et al., 2015). Zusätzlich gibt es Hinweise,

dass die Ischämie das CyP-D dahingehend verändert, dass dieses die Öffnung der mPTP „positiv“ beeinflusst (Ong, et al., 2015). So haben andere Studien schützende Effekte gezeigt, wenn das Myokard mit CsA behandelt wurde (Bernardi, et al., 2015). CsA hemmt CyP-D, was im Folgenden zu einer Verhinderung der Porenöffnung führt. Dies könnte die protektiven Merkmale von CsA erklären (Broekemeier, et al., 1989; Kinnally, et al., 2011). Duan et al. hat in seiner Studie festgestellt, dass nach Hypoxie das Dynamin-related Protein 1 (Drp-1) über eine Interaktion mit Bax in der äußeren Mitochondrienmembran und über eine Interaktion mit PiC in der inneren Mitochondrienmembran zu einer Öffnung der mPTP führte mit konsekutiver Apoptose. Drp-1 ist ein Protein, welches bei der Fragmentierung von Mitochondrien beteiligt ist (Duan, et al., 2021).

1.6 Pathophysiologie der Ischämie und Reperfusion

Sobald das Herz einer Ischämie und anschließender Reperfusion ausgesetzt wird, wird ein komplexer Prozess in Gang gesetzt, der unter anderem auf makroskopischer, mikroskopischer als auch molekularer Ebene abläuft.

Nach dem Einsetzen der Ischämie wird das intrazellulär vorhandene ATP verbraucht (Williams, et al., 2015). Dadurch entsteht verstärkt Phosphat (Morciano, et al., 2015). Um neues ATP während der Ischämie zu generieren, wird als Hauptquelle Glucose genutzt, welche auf der einen Seite verstärkt aus der extrazellulären Umgebung aufgenommen, auf der anderen Seite durch die Glykogenolyse freigesetzt wird (Morgan, et al., 1961; Calmettes, et al., 2015).

Aufgrund des Sauerstoffmangels wird ATP aus Glucose durch die anaerobe Glykolyse gebildet, dies wiederum führt zu einer erhöhten Bildung von Laktat und Protonen, dies wiederum erniedrigt den pH (Morciano, et al., 2015). Diese Art der Glykolyse kann nur für 20 bis 30 min ATP generieren (Rovetto, et al., 1975; Calmettes, et al., 2015).

Im Zuge der Ischämie bricht parallel das Membranpotential über der inneren Mitochondrienmembran zusammen. Die ATP-Synthase versucht den Zusammenbruch zu kompensieren, indem es unter ATP-Hydrolyse Protonen in den Intermembranraum pumpt (Calmettes, et al., 2015; Halestrap, et al., 2015; Williams, et al., 2015). Dadurch werden 50 bis 70% des ATP-Bestandes verbraucht (Rouslin, et al., 1990; Calmettes, et al., 2015). Der Mangel an ATP schränkt im weiteren Verlauf die Funktion vieler Ionenpumpen ein. Zuerst kommt es zu Einschränkungen bei der Natrium-Kalium-ATPase und der SERCA, die ebenfalls ATP verbrauchen, um ihre Aufgaben zu erfüllen. Hieraus resultieren hohe Natrium- und Calcium-Spiegel in der Zelle (Yu, et al., 1993; Morciano,

et al., 2015; Aguayo-Ortiz, et al., 2020). Unter physiologischen Bedingungen schleust die erstgenannte ATPase Natrium aus und Kalium in die Zelle ein; die zweitgenannte ATPase befördert Calcium aus dem Zytoplasma in das endoplasmatische Retikulum (Pape, et al., 2019). Weil es zu erhöhten Konzentrationen von Natrium und Calcium kommt, können der Natrium-Protonen-Antiporter und der NCX ihre Aufgaben nicht erfüllen: Erster Transporter kann Protonen nicht aus der Zelle rausschleusen, weil der Natriumgradient zusammenbricht, der zweite Transporter kann aus dem gleichen Grund Calcium nicht aus der Zelle rausschleusen. Der NCX beginnt sogar Calcium verstärkt in die Zelle zu transportieren (Morciano, et al., 2015). Und weil ATP für die SERCA fehlt, wird Calcium nicht aus dem Zytosol ins endoplasmatische Retikulum zurückgepumpt (Aguayo-Ortiz, et al., 2020).

Parallel werden während einer Ischämie Superoxid-Moleküle aus den Komplexen I und III freigesetzt. Weil Cytochrom c im Komplex III gebildete Superoxide neutralisiert und somit verbraucht wird, werden letztere verstärkt in den Intermembranraum freigesetzt. Und weil durch das fehlende Cytochrom c der Elektronentransport gestört ist, stauen sich die Elektronen im Komplex I an, was wiederum auch zu einer erhöhten Bildung von ROS beiträgt (Pasdois, et al., 2012; Halestrap, et al., 2015).

Im Endeffekt aller zuvor beschriebener und weiterer Mechanismen kommt es zu einer Calciumüberladung, Akkumulation von Laktat, Protonen, Kalium und ROS, einer Erniedrigung vom pH und einen Anstieg von Fettsäuren (Halestrap, et al., 2015; Morciano, et al., 2015; Ong, et al., 2015). Die Konzentration der Fettsäuren steigt an, weil unter normoxischen Bedingungen Fettsäuren die Hauptquelle der Energiegewinnung darstellen und während der Ischämie nicht mehr verstoffwechselt werden können (Liepinsh, et al., 2016; Dambrova, et al., 2021).

Weiterführend führt die Calciumüberladung in den Myokardzellen zu einer Relaxationsverzögerung und einer damit verbundenen erhöhten Wandspannung innerhalb des Herzens, was die Zirkulationsstörungen zusätzlich verschärft (Jacobshagen, 2013).

Geschädigte Mitochondrien produzieren ROS und ROS selbst kann eine ROS-Freisetzung induzieren (Ikeda, et al., 2015; Nishida, et al., 2015). Der entstandene oxidative Stress und die gebildeten ROS schädigen Lipide – Peroxidation –, Proteine – Carbonylierung – und die DNS (Clarke, et al., 2008; Halestrap, et al., 2015; Morciano, et al., 2015). Hieraus wird die Atmungskette in doppelter Hinsicht eingeschränkt: Einerseits werden die Proteinkomplexe der Atmungskette eingeschränkt, andererseits ist die Neusynthese dieser eingeschränkt, da die DNS fehlerhaft abgelesen wird (Ballinger, et al.,

2000). Da an der inneren Mitochondrienmembran die DNS lokalisiert ist, ist diese hier zusätzlich besonders hohen ROS -Konzentrationen ausgesetzt (Costa, et al., 2011).

Die abnehmende ATP -Produktion, bedingt durch die Beeinträchtigung der Atmungskette, wird dadurch verstärkt, dass durch die Ischämie auch der ANT gestört wird, einen suffizienten Transport von ATP zu gewährleisten, wodurch dieses den ATPasen nicht zur Verfügung stehen kann (Duan, et al., 1989; Dörner, et al., 2007).

Das ischämische Milieu der Kardiomyozyten bleibt nicht lokal begrenzt. Die vorhandenen Metabolite diffundieren durch die Gap Junctions in die unbeeinflussten Nachbarzellen, destabilisieren diese und leiten somit den Schaden weiter (García-Dorado, et al., 2004).

Sobald die Koronarien wieder reperfundiert werden, setzt ein weiterer eigenständiger schädigender Prozess ein (Ong, et al., 2015). Eine der Kernstrukturen hierzu ist die mPTP (Ong, et al., 2015). Der Reperfusionsschaden gliedert sich in vier Aspekte: Arrhythmien, Stunning, mikrovaskuläre Obstruktion und Kardiomyozytensterben (Ong, et al., 2015). Unter Stunning wird eine vorübergehende Dysfunktion vom Ventrikelmyokard verstanden, welche nach einer gewissen Zeit voll reversibel ist (Mochizuki, et al., 1998).

Das während der Ischämie gebildete Phosphat fördert die Öffnung der mPTP (Morciano, et al., 2015). Ebenso wird die Öffnung durch die hohen Calcium-, ROS-, Fettsäuren- und niedrigen ATP -Konzentrationen gefördert (Halestrap, et al., 2015; Morciano, et al., 2015). Nichtsdestotrotz bleibt die mPTP während der Ischämie geschlossen, da eine hohe Protonenkonzentration vorherrscht. Erst während der Reperfusion kommt es zu einer Öffnung (Griffiths, et al., 1995; Halestrap, et al., 2015; Morciano, et al., 2015; Ong, et al., 2015).

Nachdem im unterversorgten Gebiet die Durchblutung und die damit verbundene Sauerstoffversorgung wieder stattfindet, kann die oxidative Phosphorylierung suffizient arbeiten, was zu einem massiven Anstieg von ROS führt (Ong, et al., 2015). Im Zuge des wieder verfügbaren ATP können die hiervon abhängigen Ionenpumpen ebenso ihre physiologische Funktion aufnehmen, was zu massiven Calciumverschiebungen und zu einer Normalisierung des pH führt (Ong, et al., 2015). Da nun der einzige Inhibitor – Protonen – der mPTP fehlt und die Faktoren – Calcium, Phosphat, ROS, niedriges ATP –, welche das Öffnen fördern, überwiegen, kommt es zur Öffnung von der mPTP, was nur in den ersten zwei bis drei Minuten nach der Reperfusion beobachtet wird (Halestrap, et al., 2015; Morciano, et al., 2015).

Sobald die Pore offen ist, kommt es einerseits zu einem Efflux von Protonen aus dem Mitochondrium, wodurch das Membranpotential der inneren Membran wieder zusammenbricht und Komplex V ATP hydrolysiert, um dem Zusammenbruch entgegenzuwirken. Und andererseits kommt es zu einem Influx von Wasser in das Mitochondrium aufgrund der hohen Calciumkonzentration, wodurch das Mitochondrium anschwillt, die äußere Membran aufbricht und Cytochrom c – ein Apoptosesignal – freigesetzt wird (Alam, et al., 2015; Halestrap, et al., 2015; Morciano, et al., 2015; Ong, et al., 2015).

Im weiteren Verlauf werden Phospholipasen, Nukleasen und Proteasen aktiviert, die einen zusätzlichen Schaden verursachen (Morciano, et al., 2015).

Der exzessiv angestiegene oxidative Stress reduziert die Verfügbarkeit von NO, ein Vasodilatator, wodurch die Versorgung des ischämischen Areals zusätzlich eingeschränkt wird (Morciano, et al., 2015).

Das zu Beginn der Reperfusion gebildete ATP und die hohe Calciumkonzentration führen zu Hyperkontraktionen innerhalb der Kardiomyozyten. Dies wiederum führt zum Rigor, zum Zerreißen der durch die Ischämie vorgeschädigten Zellmembran und außerdem kommt es zum Verlust der Kontaktstellen zwischen den Zellen (Ruiz-Meana, et al., 2009; Morciano, et al., 2015).

So besteht das finale Infarktareal aus nekrotischen und apoptotischen Arealen, wobei die Apoptose 86% und die Nekrose 14% zum Infarkt beitragen (Gottlieb, et al., 1994; Morciano, et al., 2015).

Viele Versuche und Untersuchungen werden unternommen, um den I/R-Schaden zu minimieren. Viele Forschungsgruppen beschäftigen sich damit. Beispielhaft sind die MITOCARE-Studie, die EMBRACE-Studie und die CYCLE-Studie zu nennen, viele weitere sind im Review von Morciano et al. aufgeführt (MITOCARE, 2012; Chakrabarti, et al., 2013; Ottani, et al., 2016), (Morciano, et al., 2015). Aktuell existiert keine etablierte Therapie um den Reperfusionsschaden zu begrenzen (Morciano, et al., 2021).

1.7 Fragestellung

Diese Arbeit befasst sich mit dem Einfluss des Adenin Nukleotid Translokators (ANT-1) auf den Schaden, welcher nach Ischämie und Reperfusion beim Herzen entstehen kann. ANT-1 wird während der Ischämie/Reperfusion (I/R) herunterreguliert. Dieses Herunterregulieren könnte zum I/R-Schaden beitragen. Bereits existierende Arbeiten konnten zeigen, dass eine Überexpression beim Herzen schützende Effekte aufweist. ANT-1 ist einer der wichtigsten Regulatoren der mitochondrialen Permeability Transition Pore (mPTP) und deren Öffnung, welche das zentrale Ereignis ist, welches zum zellulären Schaden bei Reperfusion führt.

Daher wird die Hypothese gestellt, ob eine kardiale Überexpression von ANT-1 das Herz vor Reperfusionsschäden schützen kann, indem es die Funktionen des Mitochondriums aufrechterhält.

Hierzu sollen experimentell Rattenherzen mit einer herzspezifischen Überexpression des ANT-1 (TG-ANT) einer standardisierten I/R im Langendorff-Modell unterzogen werden. Im Anschluss sollen die aus den Herzen isolierten Mitochondrien mit Hilfe von funktionellen und biochemischen Methoden (Respirationsmessung, Calcium-Retention-Capacity, Messung des Membranpotentials, Messung der NAD(P)H-Menge, Messung der ROS-Produktion) analysiert werden.

Damit soll evaluiert werden, ob ANT-1 dazu genutzt werden kann, kardioprotektive Strategien nach I/R zu etablieren. Außerdem soll auf diese Weise ein besseres Verständnis über die zugrundeliegenden Mechanismen entwickelt werden.

2 Methoden

In diesem Abschnitt werden sämtliche Methoden und Arbeitstechniken aufgeführt, die zur Datengewinnung genutzt werden⁶.

2.1 Rattensektion

Die Ratte⁷ wird in den Glasbehälter überführt, welcher sich unter Abzug 1⁸ befindet. Der Behälter, ausgefüllt mit Papierhandtüchern – keine besonderen Anforderungen –, wird mit dem Deckel mit Röhrenöffnung geschlossen. Mit einer 2 ml - Spritze wird durch die Öffnung Isofluran (Zielkonzentration im Behälter: 5%)⁹ injiziert.

Es wird abgewartet, bis die Ratte regungslos ist. Durch das Rütteln des Behälters, die Tiere bleiben regungslos, sowie durch die fehlende Lidreaktion auf Licht wird die sichere Bewusstlosigkeit festgestellt. Nach weiterem Überprüfen der Bewusstlosigkeit mit Hilfe des Zwischenzehenreflexes erfolgt durch eine technische Mitarbeiterin die Tötung der Ratte nach tierethischen und humanen Standpunkten durch einen Genickbruch.

Daraufhin wird ihr Gewicht mit der Waage 1 bestimmt.

Die Bauch- und die Thoraxhöhle werden separat mit der Schere 3 und der Pinzette 1 eröffnet. Das Herz wird samt Aortenbogen entnommen und für die verschiedenen Methoden weiterverwendet. Für die Langendorff-Messung wird das Herz zunächst in 4 °C kaltes NaCl(0,9%) überführt. Für die Bestimmung des Gewichtes des Herzens sowie der einzelnen Ventrikel wird auf das Kapitel „Mitochondrienisolation“ verwiesen.

Beide Lungenflügel, Leber und beide Nieren werden mit der Schere 1 und Pinzette 2 entnommen, mit der Waage 2 gewogen, jeweils in das Gefrier Röhrchen (im Folgenden als Gefriergefäß bezeichnet) überführt und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nekrotische Organanteile werden vor dem Einfrieren entfernt. Beide Nieren werden halbiert und jeweils auf zwei Gefriergefäße verteilt, sodass in beiden Gefäßen jeweils eine Hälfte beider Nieren ist. Auf die gleiche Art werden die Lungen aufgeteilt.

⁶ Im Fließtext wird auf die Detailangabe zu den verwendeten Versuchstieren, Stoffen und Geräten verzichtet. Stattdessen wird auf das jeweilige Verzeichnis verwiesen, wo das jeweilige Material genau beschrieben wird.

⁷ Bezüglich der ausführlichen Details über die verwendeten Versuchstiere wird auf das Tierverzeichnis im Anhang verwiesen.

⁸ Bezüglich der ausführlichen Details über die verwendeten Geräte, Werkzeuge und Software wird auf das gleichnamige Verzeichnis im Anhang verwiesen.

⁹ Bezüglich der ausführlichen Details über die verwendeten Stoffe und Chemikalien wird auf das Stoffverzeichnis im Anhang verwiesen.

Die Schwanz- bzw. Ohrspitze werden abgeschnitten und ebenfalls im besagten Gefäß schockgefroren. Alle gefrorenen Proben werden bei -80°C gelagert.

Die Tibia wird mit den zuletzt genannten Präparierwerkzeugen von Haut und Muskeln befreit und die Sprunggelenks- und Kniegelenksverbindungen werden mit der Schere 1 durchtrennt. Mit dem Messschieber wird die Länge der Tibia zwischen Tibiaplateau und Sprunggelenksfläche der Tibia gemessen.

2.2 Langendorff-Messung

Mit Hilfe der Langendorff-Messung wird eine Ischämie und anschließende Reperfusion am Herzen simuliert.

Abbildung 4: Langendorff-Apparatur (Übersicht)

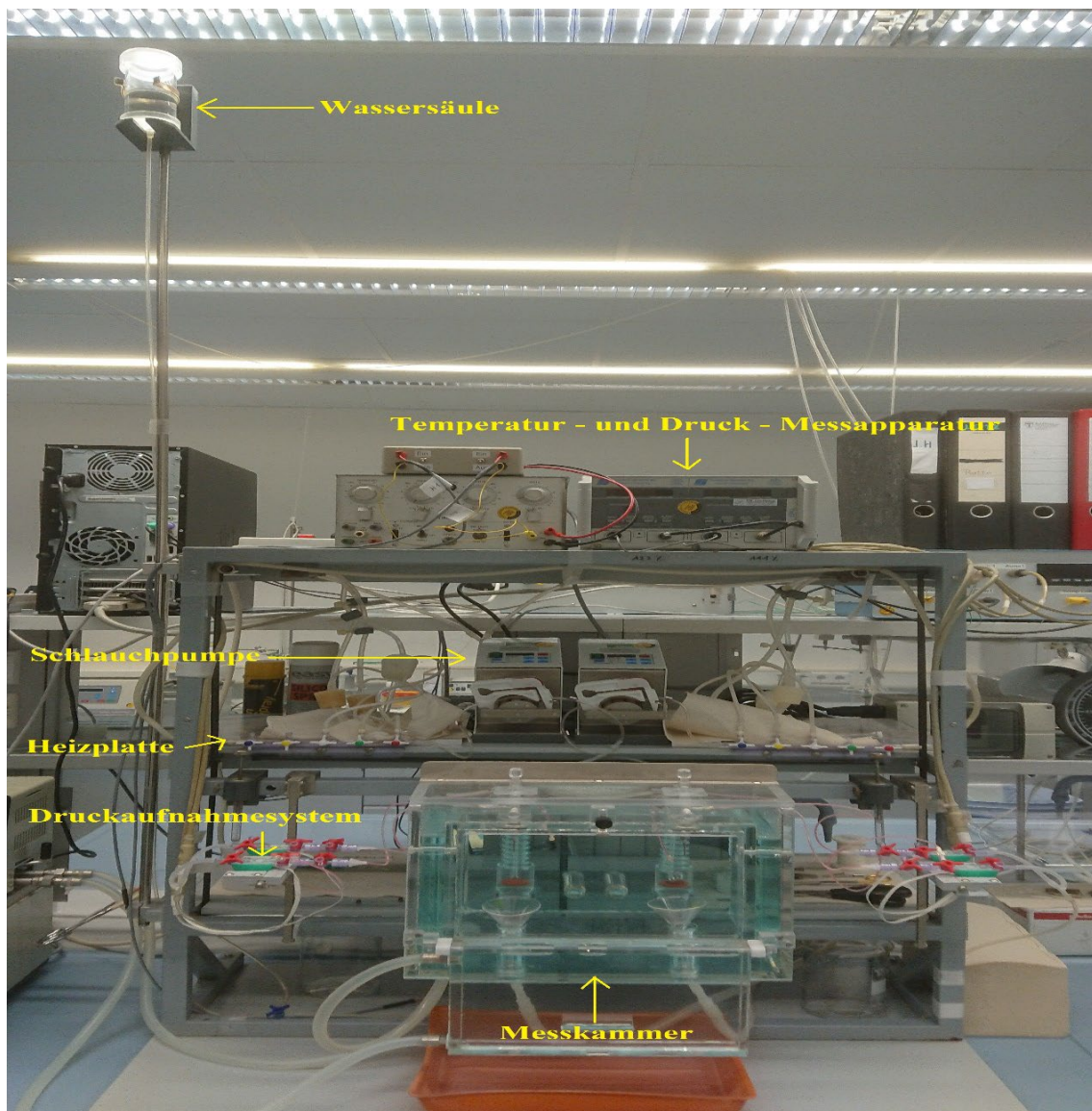
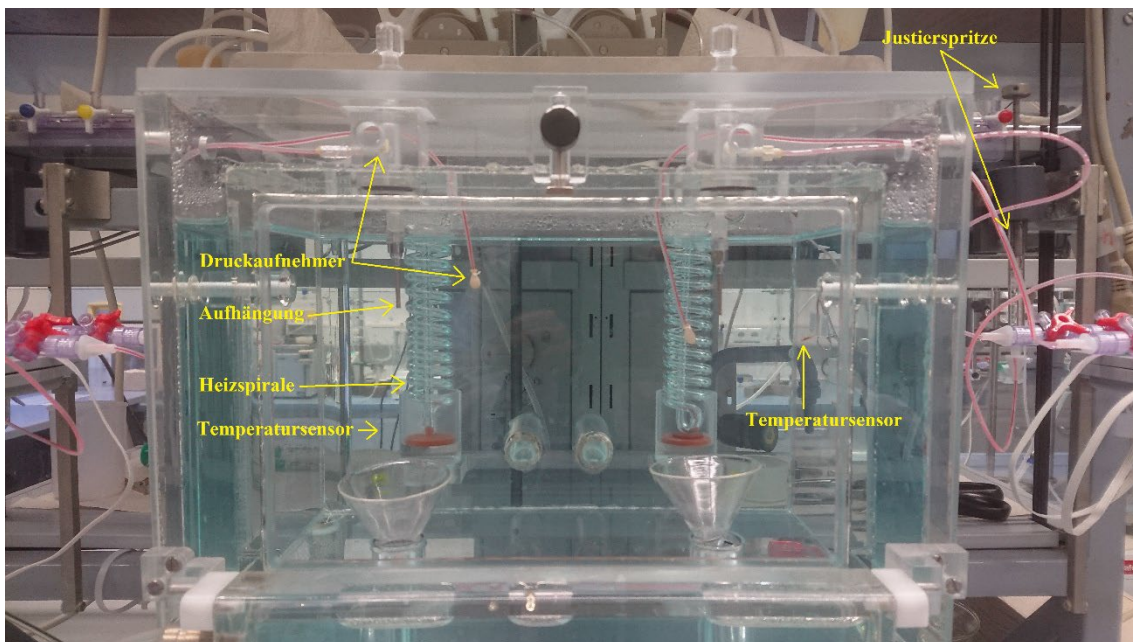


Abbildung 5: Langendorff-Apparatur (Detailansicht)



Für die Messung wird die Langendorff-Messkammer, Wärmepumpe A, Schlauchpumpe und die Temperatur- und Druck-Messapparatur verwendet. Zusätzlich wird der Computer H und das Programm Langherz benötigt.

In Abbildung 4 und Abbildung 5 sind die Einzelheiten der Langendorff-Apparatur dargestellt.

Die Wärmepumpe A erhitzt durch die geförderte Flüssigkeit einerseits die Wandungen der Messkammer. Weiterhin wird durch die gleiche Pumpe eine Spirale innerhalb der Messkammer erhitzt, durch welche das Perfusat fließt. Durch eine elektrische Platte – keine besonderen Anforderungen – wird der Erlenmeyerkolben mit dem Perfusat erwärmt. So wird gewährleistet, dass um und im Herzen 37°C herrschen. Je ein Messfühler in der Messkammer – Lufttemperatur – und in der Flüssigkeit geben eine Rückmeldung über die herrschenden Temperaturen.

Der Erlenmeyerkolben wird mit einem Liter Perfusat gefüllt und mit dem Schlauchsystem verbunden. Mit der Schlauchpumpe wird das Perfusat durch das Schlauchsystem gepumpt. Zunächst wird dieses System komplett von Luftblasen freigespült. Anschließend wird in das Perfusat im Kolben mit 0,6 bar das Perfusat-Gas eingeleitet.

Das Begasen soll 30 min dauern, bevor die Versuche gestartet werden. Auch während dieser Zeit wird das Perfusat begast. Dadurch wird ein physiologischer pH erzeugt.

Das gesamte Druckaufnahmesystem muss ebenfalls vor den Versuchen entlüftet werden. Ein Druckaufnehmer ist der Ballon – ebenfalls luftblasenfrei –, welcher während des Versuches im Herzen platziert wird – Messung des linksventrikulären Druckes –, der zweite Druckaufnehmer befindet sich in der Aufhängung für das Herz – Messung des Aortendruckes. Luftblasen in den verschiedenen Systemen würden die Druckmessungen verfälschen. Vor den Versuchen wird das Drucksystem mit dem spannungsfrei gefüllten Ballon kalibriert: die Wassersäule entspricht dabei 100 mmHg und der Umgebungsdruck 0 mmHg. Daraufhin wird mit dem Programm Langherz das System kalibriert. Nach der Kalibrierung soll für 100 mmHg das Programm den Wert 28 bis 31 anzeigen, für 0 mmHg den Wert 12 bis 15.

Bevor das Herz in der Messkammer aufgehängt wird, wird es mit Schere 2 und Pinzette 1 präpariert: Herzbeutel wird entfernt, die Aorta wird vom Bindegewebe befreit.

Auch wird vor dem Aufhängen bei der Schlauchpumpe die Geschwindigkeit auf 20% (4ml/min) eingestellt. Dies soll die Überlastung des Herzens verhindern. Die Spitze der Aufhängung wird so tief in die Aorta eingeführt, dass die Spitze an der Aortenwurzel zum Liegen kommt; so soll während der Messungen eine Überdehnung der Aorta und damit eine Verfälschung der Druckmessung verhindert werden. Zunächst wird die Aorta mit der Klemme an der Aufhängung fixiert, anschließend wird die Aorta mit dem Zwirn vor den Gefäßabgängen festgebunden. Die Klemme wird wieder entfernt. Der Ballon wird zusammengedrückt in den linken Ventrikel, welcher durch das Perfusat durchgespült und luftblasenfrei ist, eingeführt.

Die Messkammer wird geschlossen.

Falls keine Herzaktivität vorhanden ist bzw. sich das Herz im Flimmern befindet, wird das Herz mit dem Ringfinger angeschnippt. Bleibt durch diese Maßnahme eine normale Herzaktivität aus, wird dieses in 4 °C kaltes NaCl(0,9%) für 10 sek bei ausgeschalteter Schlauchpumpe eingetaucht.

Die Schlauchpumpe wird so eingestellt, dass in der Aorta ein Druck von 50 mmHg gemessen wird. Durch die Justierspritze des Drucksystems wird der Ballon so weit aufgepumpt, dass im linken Ventrikel ein diastolischer Druck von 10 bis 15 mmHg herrscht. Sobald das Programm Langherz bei den Druckkurven ein Plateau anzeigt, beginnt die 5-minütige Stabilisierungsphase, in der sämtliche Einstellung nachjustiert werden können. Dazu wird die Stoppuhr 1 verwendet. Zu diesem Zeitpunkt sollten die Temperaturen 37 °C erreichen.

Sind die gemessenen Druckwerte für 5 min stabil, wird der Versuch gestartet. Ab jetzt darf nichts mehr nachjustiert werden. Es wird zunächst eine Stabilisierungsphase von 10 min aufgezeichnet.

Für die Ischämie wird die Schlauchpumpe für 45 min ausgeschaltet. Für die Zeitmessung wird die oben genannte Stoppuhr verwendet. Sobald diese Zeit abgelaufen ist, wird die Schlauchpumpe wieder eingeschaltet. Sollte keine Herzaktivität vorhanden sein bzw. sich das Herz im Flimmern befinden, wird wieder das zuvor genannte Verfahren angewendet. Die Reperfusion dauert zwei Stunden.

Hiernach wird der Versuch beendet, das Herz aus der Messkammer entnommen und nun folgt die Mitochondrienisolation.

Um die Normoxie zu simulieren, wird nach der zuvor genannten 10-minütiger Stabilisierungsphase das Herz ausschließlich 15 min lang perfundiert.

2.3 Mitochondrienisolation

Mit dieser Methode der Mitochondrienisolation wird die subsarkolemmale Subpopulation extrahiert.

Alle im Folgenden genannten Schritte und verwendeten Substanzen sollen mit Eiswürfeln aus der Eiswürfelmaschine vorgekühlt und im Verlauf gekühlt werden. Als Transportmedium wird eine Styroporbox – keine besonderen Anforderungen – verwendet.

Es werden Pipetten A verwendet.

Für die nächsten Schritte wird Puffer A und B verwendet. Beide Puffer müssen vor jeder Isolation immer frisch angesetzt werden – in Puffer-Tubes.

Nach dem Abschluss der Langendorff-Messung wird der Aortenbogen abgetrennt. Mit der Waage 3 wird das Gewicht des Herzens bestimmt. Anschließend wird mit der Schere 2 durch die Pulmonalklappenöffnung entlang des Septums der rechte Ventrikel abgetrennt, sodass linker Ventrikel und Septum eine Einheit bilden. In das Septum wird nicht geschnitten. Das Gewicht der separierten Ventrikel wird jeweils mit der Waage 3 bestimmt. Nach dem Wiegen wird das gesamte Herz in das Keramikgefäß gelegt. Zusätzlich werden 5 ml Puffer B hinzugegeben.

Anschließend wird das Herz mit der Schere 2 fein auf ca. 1 x 1 mm zerschnitten.

Das Gewebe-Puffer-Gemisch wird in den Glaspotter überführt. Anschließend werden nochmals 5 ml Puffer B hinzugefügt und diese Suspension wird mit dem Teflonpistill 5-mal gepottert.

Der gesamte Glaspotterinhalt wird in das Rundbodenröhrchen überführt, mit Puffer A auf 10ml aufgefüllt und anschließend bei 800 G und 4 °C für 10 min in Zentrifuge A zentrifugiert.

Danach wird der Überstand auf fünf 2-ml-Eppendorfggefäße (im Folgenden als Gefäß bezeichnet) zu je 2 ml verteilt. Der Absatz wird verworfen. Die Gefäße werden bei 8000 G und 4 °C für 10 min in Zentrifuge B zentrifugiert.

Der Überstand wird verworfen, jedes Gefäß wird mit jeweils 500 µl Puffer A aufgefüllt und das Mitochondrienpellet am Boden des Gefäßes vorsichtig resuspendiert. Das Volumen der Suspension der einzelnen Gefäße wird in einem neu bereitgestellten Gefäß zusammengeführt, wodurch die Anzahl dieser weniger wird. Das Volumen der neuen Gefäße soll möglichst gleichmäßig sein.

Die darauffolgende Zentrifugation in Zentrifuge B unter den zuletzt genannten Parametern sowie der Verwurf des Überstandes und abschließende Resuspension des Pellets wird so lange wiederholt, bis nur noch ein Gefäß vorhanden ist. Dieses wird mit Puffer A auf 2 ml aufgefüllt. Unter den zuletzt genannten Bedingungen wird nochmals zentrifugiert. Danach wird der Überstand verworfen und das Mitochondrienpellet mit 500 µl Homopuffer vorsichtig resuspendiert. Die nun entstandene Lösung wird im weiteren Verlauf als Lösung M bezeichnet.

2.4 Proteinbestimmung nach Lowry

Um die Mitochondrienfunktionsmessungen durchführen zu können, muss die Proteinkonzentration in der Lösung M bestimmt werden.

Es werden Pipetten A verwendet.

Zunächst werden zwei Proben erstellt (Tabelle 1):

Tabelle 1: Probenzusammensetzung für Proteinbestimmung

	Verhältnis	Lösung M	Aqua dest.
Probe 1	1 : 10	2 µl	18 µl
Probe 2	1 : 20	1 µl	19 µl

Eine Standardreihe (Tabelle 2) wird auf die Well-Platte A aufgetragen. Pro Standard-Stufe und für die beiden Proben sollen jeweils zwei Wells verwendet werden.

Von den Standard-Stufen und von den Proben soll jeweils 5 µl in beide Wells pipettiert werden.

1 ml Reagenz A wird mit 20 µl Reagenz S im Gefäß gemischt. Die neu entstandene Zusammensetzung wird Reagenz C genannt.

Anschließend wird 25 µl Reagenz C pro benutzten Well hinzugefügt.

Daraufhin wird 200 µl Reagenz B pro benutzten Well hinzugefügt.

Die Gemische in den Wells sollen für 10 bis 15 min ruhen.

Im Plattenphotometer A wird mit dem Programm Tecan i-Control und dem Computer A die Proteinkonzentration aller Wells gemessen. Als Auswertungsprogramm wird das Excel-Programm Tecan Dummy verwendet. Mit dem Auswertungsprogramm und den photometrischen Werten der Standard-Reihe wird eine Regressionsgerade generiert, die

Tabelle 2: Standardreihe

Standardstufe	Aqua dest.	BSA B
1	100 µl	0 µl
2	90 µl	10 µl
3	80 µl	20 µl
4	70 µl	30 µl
5	60 µl	40 µl
6	50 µl	50 µl
7	40 µl	60 µl
8	30 µl	70 µl

einen Korrelationskoeffizienten von mindestens 9,99 aufweisen muss. Ansonsten müssen alle Schritte zur Proteinbestimmung wiederholt werden.

Das Resultat für Probe 1 wird mit 10 multipliziert, das Resultat für Probe 2 wird mit 20 multipliziert. Beide Produkte werden addiert und daraus der Mittelwert gebildet. Der entstandene Mittelwert entspricht der Protein-Konzentration – µg/µl – der Lösung M.

2.5 Mitochondrienfunktionsmessungen

Nun werden die verschiedenen Messmethoden aufgeführt, die bei der Testung der Mitochondrien verwendet werden.

2.5.1 Respirationsmessung

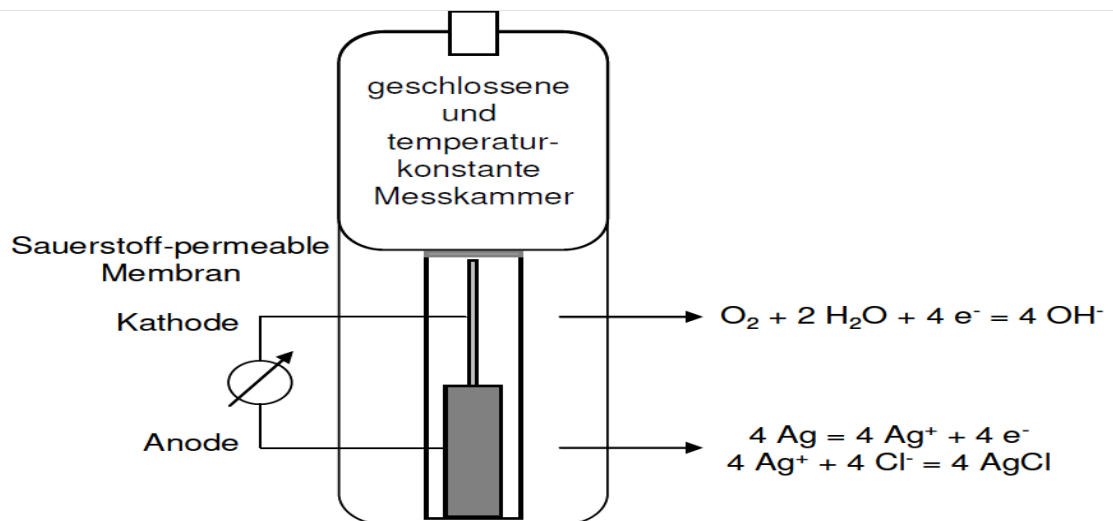
Der Glutamat/Malat-Puffer (Glu/Mal-Puffer) und Succinat-Puffer werden als Inkubationspuffer verwendet. Sie müssen für jeden Versuchstag steril gefiltert werden. Dazu werden die Puffer mit der 20 ml-Spritze über den Sterilfilter in neue Puffer-Tubes überführt.

Es werden die Pipetten B verwendet.

Als Experiment - Geräte werden die Strathkelvin - Apparatur (Abbildung 6), die Wärmepumpe B für die zwei Kammern und der Computer B mit dem Strathkelvin - Programm verwendet.

Nach dem Einschalten der Wärmepumpe B werden die zwei Messkammern auf den Kopf gedreht, damit sich die Außenhülle komplett mit Wasser füllen kann und so konstante Temperaturen während des Versuches gewährleistet sind. Der eingeschaltete Rührfisch sorgt dafür, dass das Kammerinnere beim Versuch gleichmäßig durchgemischt wird.

Abbildung 6: Strathkelvin - Messkammer für Respirationmessung



Quelle: Lokalisierung, Orientierung und Funktion von Connexin 43 in Kardiomyozyten - Mitochondrien; Sabine Stahlhofen; 2010; Monografie; Universität Duisburg - Essen

Die Messung innerhalb der Strathkelvin - Messkammer erfolgt durch eine Elektrode vom Clark - Typ. Sauerstoff aus der Messkammer gelangt über die Membran zur Reaktionskammer. In dieser wird Silber an der Anode oxidiert und der vorhandene Sauerstoff an der Kathode reduziert, wodurch ein Stromfluss entsteht. Anhand des abnehmenden Stromflusses wird der Sauerstoffverbrauch bestimmt (Stahlhofen, 2010).

Der Inhalt des Inneren beider Kammern wird entfernt und anschließend 3 - mal mit destilliertem Wasser (Aqua dest.), 3 - mal mit Ethanol (70%) und nochmals 3 - mal mit Aqua dest. hintereinander gespült. Nach jedem der neun Spülschritte wird die jeweilige Flüssigkeit aus beiden Kammern entfernt.

In die linke Kammer wird 550 μ l Glu/Mal - Puffer hinzugegeben. In die rechte Kammer wird 550 μ l Succinat - Puffer und Rotenon (Zielkonzentration: 2 μ mol/l) hinzugegeben.

Es sollte dringend vermieden werden, dass die linke Kammer mit Rotenon verunreinigt wird. Tritt dieser Fall ein, soll gründlichst mit Ethanol(70%) – mindestens 4-mal – gespült werden.

Es wird gewartet, bis der Graph im Strathkelvin-Programm einen geradlinigen Verlauf aufweist. Anschließend wird der Deckel auf beide Kammern gesetzt. Es ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen eingeschlossen werden. Im Strathkelvin-Programm wird der Graph auf 267 $\mu\text{mol/l}$ O_2 -Konzentration kalibriert. Mit dem Start der Messung im Strathkelvin-Programm soll gleichzeitig die Stoppuhr 2 gestartet werden.

Es wird nach folgendem Schema verfahren(Tabelle 3):

Tabelle 3: Ablauf Respirationsmessung¹⁰

Zeitpunkt nach Messstart	Aufgabe	Menge	Zielkonzentration
1 min	Zugabe von Mitochondrien in beide Kammern.	50 μg (aus Lösung M)	-
4 min	Zugabe von ADP in beide Kammern.	-	40 $\mu\text{mol/l}$
7 min (erster Schritt)	Zugabe von TMPD in beide Kammern.	-	300 $\mu\text{mol/l}$
7 min (zweiter Schritt)	Zugabe von ASC in beide Kammern.	-	3 mmol/l
9 min	Zugabe von FCCP in beide Kammern.	-	1 $\mu\text{mol/l}$
zwischen 10 und 11 min	Stoppen der Messung.	-	-

Ist die Messung abgeschlossen, wird der Inhalt des Inneren beider Kammern entfernt und anschließend jeweils 3-mal mit Aqua dest., Ethanol(70%) und erneut mit Aqua dest. hintereinander gespült.

Alle aufgeführten Substanzen werden im zeitlichen Ablauf mit der Hamilton-Spritze über die Öffnung im Deckel in die Kammern injiziert. In jede der zwei Kammern werden jeweils mit einer separaten Hamilton-Spritze die Mitochondrien hinzugefügt. Das ADP für die jeweilige Kammer wird mit der Hamilton-Spritze der Mitochondrien für die je-

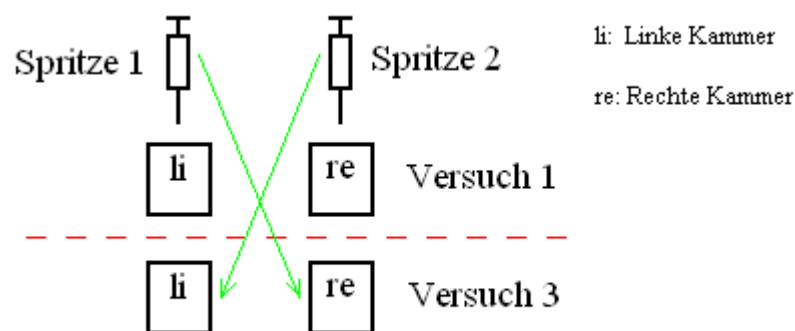
¹⁰ In der Tabelle aufgeführten Abkürzungen werden im Fließtext ausgeschrieben.

weilige Kammer injiziert. Für Ascorbat(ASC) und Tetramethylphenylendiamin (TMPD) wird jeweils eine eigene Spritze verwendet. Die Spritzen für ASC und TMPD werden für beide Kammern verwendet. Carbonyl Zyanid-4-(trifluoromethoxy)-phenylhydrazin(FCCP) wird für beide Kammern mit den Spritzen für ASC und TMPD injiziert.

Nach jeder Substanz wird jede einzelne Hamilton - Spritze jeweils 3 - mal mit Aqua dest., Ethanol (70 %) und erneut mit Aqua dest. hintereinander gespült. Nach den zwei 7 - min - Schritten für die erste Kammer wird jede verwendete Spritze 5 - mal mit Aqua dest. gespült.

Pro Experiment - Tag werden zwei verschiedene Mitochondrienproben jeweils hintereinander in der Strathkelvin - Apparatur gemessen. Dies wird 3 - mal wiederholt. Jedes Mal, wenn die zweite Mitochondrienprobe 10 min lang gemessen wurde, werden die Hamilton - Spritzen für die Mitochondrien getauscht, sodass Spritze 1, die vor dem Tausch für die linke Kammer verwendet wurde, jetzt für die rechte Kammer verwendet wird und Spritze 2 dementsprechend getauscht wird. Da für das FCCP ebenfalls gleichzeitig zwei Spritzen verwendet werden, wird hier das gleiche zuvor genannte Tauschprinzip angewendet (Abbildung 7). Damit sollen die individuellen Ungenauigkeiten der Messskalen beider Hamilton - Spritzen gleichmäßig auf beide Kammern verteilt werden.

Abbildung 7: Schema vom Tauschprinzip - Respirationsmessung



2.5.2 Calcium - Retention - Capacity

Die Messungen erfolgen mit dem Plattenphotometer B am Computer C mit dem Programm X. Es werden Pipetten C verwendet.

Es können parallele Messungen durchgeführt werden, in denen Mitochondrien mit und ohne Zusatz von CsA getestet werden.

In zwei Küvetten werden jeweils folgende Substanzen pipettiert (Tabelle 4):

Tabelle 4: Zusammensetzung Calcium - Retention - Capacity

Substanz	Menge	Zielkonzentration
Ca - Puffer	2 ml	-
ADP	-	40 $\mu\text{mol/l}$
EGTA	-	5 $\mu\text{mol/l}$
CaCl ₂	-	15 $\mu\text{mol/l}$
Calcium Green	-	250 nmol/l
Mitochondrien	200 μg (aus Lösung M)	-

In eine der beiden Küvetten wird zusätzlich CsA (Zielkonzentration: 1 $\mu\text{mol/l}$) hinzugefügt. Zunächst werden die Küvetten im Photometer für 4 min inkubiert. Danach werden sowohl das Programm als auch die Stoppuhr 2 gestartet.

Nach 1 min wird 10 nmol CaCl₂ in beide Küvetten gegeben. Der letzte Schritt wird alle 3 min für die Dauer einer Stunde wiederholt.

Calcium Green dient als Indikator - Substanz, welche durch ihre Fluoreszenz die Anwesenheit von Calcium signalisiert. Nach Zugabe von CaCl₂ steigt die gemessene Intensität der verursachten Fluoreszenz. Die im weiteren Verlauf abnehmende Intensität ist ein Maß für die Aufnahme des Calciums in das Mitochondrium. Sobald es nicht mehr zu einer Abnahme kommt, ist der Zustand erreicht, bei dem es zu einer Öffnung der mPTP kommt und Calcium wieder freigesetzt wird, was sich in einer Zunahme der Fluoreszenzintensität äußert (Awais, et al., 2017).

2.5.3 Messung der Autofluoreszenz und des Membranpotentials

Die Messung erfolgt mit dem Plattenphotometer B am Computer D mit dem Programm X2. Es werden Pipetten D verwendet.

In zwei Küvetten wird 2 ml Glu/Mal - Puffer gegeben. Anschließend wird Rhodamin 123 (Zielkonzentration: 200 nmol/l) hinzugegeben. Die gemessene Intensität soll zwischen 600 und 800 a.u. liegen. Sofern sie niedriger ist, wird mehr Rhodamin 123 hinzugegeben. Zu hohe Konzentrationen würden Teile der Atmungskette hemmen, und somit artifiziell das Membranpotential reduzieren.

Die Messung und die Stoppuhr 2 werden zeitgleich gestartet.

Es wird nach folgendem Schema verfahren (Tabelle 5):

Tabelle 5: Ablauf Autofluoreszenz- und Membranpotentialmessung

Zeitpunkt nach Messstart	Aufgabe	Menge	Zielkonzentration
1 min	Zugabe von Mitochondrien.	1 mg (aus Lösung M)	-
20 min	Zugabe von ADP.	-	40 µmol/l
30 min	Zugabe von FCCP.	-	100 nmol/l
40 min	Stoppen der Messung.	-	-

NAD(P)H dient als Fluoreszenzsubstrat, dessen Strahlungsintensität gemessen wird. Sobald das NAD(P)H zu NAD(P)⁺ oxidiert wird, sinkt die gemessene Intensität, womit die Autofluoreszenz bestimmt wird (Schramm, et al., 1998). Da Rhodamin 123 von den Mitochondrien aufgenommen wird, sinkt die gemessene Fluoreszenzintensität. Sobald das Membranpotential abnimmt, wird dieser Stoff wieder freigegeben, wodurch die Intensität zunimmt (Baracca, et al., 2003).

2.5.4 Amplex Ultra Red Hydrogen Peroxide Peroxidase Assay/ROS-Messung

Die Messung erfolgt mit dem Plattenphotometer C am Computer D mit dem Programm X2. Es werden Pipetten D verwendet. Für die Substanzen wird die Well - Platte B benötigt.

Es wird eine Doppelbestimmung durchgeführt. Zunächst werden 100 µg Mitochondrien (aus Lösung M) mit dem Glu/Mal - Puffer auf 100 µl aufgefüllt. Dann wird je 50 µl Mitochondrien - Puffer - Gemisch auf zwei Wells verteilt. Zu jedem Well wird jeweils 50 µl Amplex Working Solution hinzugegeben und die Messung gleichzeitig mit der Stoppuhr 2 innerhalb einer Sekunde gestartet. Parallel soll mit Glu/Mal - Puffer in Doppelbestimmung – als Leerwert – eine Messung gemacht werden. Nach 10 min wird der Versuch beendet.

Der im letzten Absatz beschriebene Versuchsablauf wird noch zweimal wiederholt. Dabei wird jeweils zusätzlich Antimycin A (Zielkonzentration: 32 mg/l) bzw. Rotenon (Zielkonzentration: 4 µmol/l) verwendet.

Wasserstoffperoxid, das zu den ROS gezählt wird, reagiert mit der Amplex Working Solution, wodurch ein Fluoreszenzsubstrat entsteht, dessen Strahlungsintensität gemessen wird (Mohanty, et al., 1997).

2.6 Molekularbiologische Analysen

In diesem Kapitel sind Arbeitstechniken aufgelistet, um Folgendes nachzuweisen:

Einerseits wird der Genotyp bestimmt, damit bei der Auswertung die einzelnen Proben einer der beiden Vergleichsgruppen zugeordnet werden können. Andererseits soll durch den quantitativen Nachweis von Ribonukleinsäure (RNS) dargelegt werden, dass eine verstärkte Expression vom ANT-1 bei den transgenen Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Tieren tatsächlich stattgefunden hat.

Bei allen folgenden Methoden – Ausnahme: Gelelektrophorese und erster Tag der Desoxyribonukleinsäure-Polymerase-Kettenreaktion (DNS-PCR) – werden die verwendeten Proben und Substanzen mit Eiswürfeln aus der Eiswürfelmaschine vor und nach der Verarbeitung gekühlt. Als Transportmedium dient die Plastikbox.

Sofern die Proben oder Substanzen in den Gefäßen aufgrund der Lagerung noch gefrorene Komponenten aufweisen, wird das entsprechende Gefäß im Schüttler 2 bei 1400 bis 1800 Drehungen/min wiederholt für 10 bis 15 sek geschüttelt, bis alles gelöst und die Lösung homogen ist.

2.6.1 DNS-Isolation

Bei dieser Methode wird die benötigte DNS für die Genotypisierung extrahiert.

Es werden Pipetten E verwendet.

Mit dem Skalpell wird ein ca. ein Millimeter großes Stück von der Leber, Ohr- oder Schwanzspitze – die Proben wurden vorher jeweils schockgefroren – des zu untersuchenden Tieres abgeschnitten. Das abgetrennte Stück wird in das Reaktionsgefäß 1 überführt, in das vorher 300 µl Gewebepuffer vorgelegt wurde.

Nach Zugabe von Proteinase K (Zielkonzentration: 0,2 mg/ml) wird die Probe über Nacht (mindestens 12 Stunden) bei 55 °C im Heizblock 1 inkubiert.

Am folgenden Tag werden Pipetten F verwendet und unter Abzug 2 gearbeitet.

Es wird in das Gefäß Phenol-Chloroform-Lösung (Aufbewahrung separat in der Glasflasche; Verhältnis = 1:1; Verhältnis Phenol/Chloroform:Probe = 1:1) hinzugegeben. Dabei muss die zuletzt genannte Lösung durch die Phase, welche sich an der Oberfläche der Lösung im Gefäß gebildet hat, hindurchpipettiert werden. Anschließend wird im Schüttler 1 auf der zweiten Stufe für eine Minute geschüttelt und dann für 10 min in Zentrifuge C bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert.

Der entstandene Überstand wird samt Interphase in das neu bereitgestellte Reaktionsgefäß 2 überführt.

Nun wird Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (Aufbewahrung separat in der Glasflasche; Verhältnis=23 : 1; Verhältnis Chloroform/Isoamylalkohol : Probe = 1 : 1) hinzugegeben. Es folgen wieder das Schütteln im Schüttler 1 – gleiche Stufe, gleiche Dauer – und die Zentrifugation für 10 min in Zentrifuge C bei 13000 rpm und 4 °C.

Wieder wird der Überstand in ein neu bereitgestelltes Reaktionsgefäß 2 überführt. In dieses wird Isopropanol gegeben (Verhältnis Isopropanol : Probe = 1 : 1). Zum Schluss wird wieder im Schüttler 1 – gleiche Stufe, gleiche Dauer – geschüttelt und danach für 30 min in Zentrifuge C bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert.

Diesmal wird der Überstand verworfen und Ethanol (70%) (Verhältnis Ethanol : Probe = 1 : 1) hinzupipettiert, gefolgt von einer Zentrifugation für 20 min in Zentrifuge C bei 13000 rpm und 4 °C.

Dann wird die gesamte Flüssigkeit vorsichtig entfernt und das geöffnete Gefäß bei Raumluft für ca. eine Stunde getrocknet. Auf dem Boden befindet sich nun die isolierte DNS.

Zum Schluss wird in das Gefäß 50 µl TE-Puffer gegeben und bei -80 °C gelagert.

2.6.2 DNS-PCR

Für die Gelelektrophorese wird die extrahierte DNS zunächst mit der PCR repliziert.

Es werden Pipetten E verwendet.

In das PCR-Reaktionsgefäß mit dem PCR-Reaktionsgefäß-Deckel werden folgende Substanzen pipettiert (Tabelle 6):

Tabelle 6: DNS-PCR-Zusammensetzung

Substanz	Menge
10 x PCR-Puffer	2,5 µl
MgCl ₂	1,25 µl
Forward DNS-Primer (1 µg/µl - 1 : 25)	1,25 µl
Reverse DNS-Primer (1 µg/µl - 1 : 25)	1,25 µl
DNS-Nukleotide	0,15 µl
Aqua dest.	17,5 µl
DNS-Polymerase	0,1 µl
Zu replizierende DNS-Probe	1 µl

Das Reaktionsgefäß mit den zusammengeführten Reagenzien und anschließend mit dem Deckel verschlossen wird im Thermocycler 1 erhitzt. Dazu wird das Programm X4 und der Computer I verwendet.

Zusätzlich wird eine Positivprobe(DNS von einem bekannten TG-ANT-Tieres) und eine Negativprobe(Aqua dest.) verwendet. Im oben aufgeführten Ansatz wird die zu replizierende DNS -Probe jeweils durch die Positiv- bzw. Negativprobe ersetzt.

Nach folgendem Schema wird die PCR durchlaufen(Tabelle 7):

Tabelle 7: DNS-PCR-Schema

Prozess	Temperatur	Dauer	Durchläufe
Initial - Melting	93 °C	5 min	1
Melting	93 °C	1 min	33
Annealing	61 °C	1 min	33
Elongation	72 °C	2 min	33
Terminale Elongation	72 °C	10 min	1

2.6.3 Gelelektrophorese

Die vervielfältigte DNS wird durch diese Methode aufgetrennt und sichtbar gemacht.

Es werden Pipetten F verwendet.

Agarose – mit der Waage 3 abgewogen – wird im Erlenmeyerkolben zusammen mit TAE -Puffer(Agarose -Zielkonzentration: 2%) und mit dem Gel-Red-Farbstoff(Zielkonzentration: 5 µl/100 ml) in der Mikrowelle bei mittlerer Stufe für 2 bis 3 min zum Kochen gebracht. Sollte hiernach der Puffer noch nicht kochen, wird der letzte Schritt so lange wiederholt, bis die Flüssigkeit kocht und sich die gesamte Agarose aufgelöst hat.

Danach werden unter dem Abzug 3 die zusammengeführten Reagenzien in die Gelelektrophorese -Apparatur gegossen. Die Apparatur wird durch die Glasplatten und den Taschenkamm vervollständigt. Die komplett zusammengebaute Apparatur samt Inhalt wird unter einer Plastikschele – keine besonderen Anforderungen – lichtgeschützt zum Härten des Gels für 30 bis 90 min aufbewahrt.

Nach dem Härten wird zunächst zu der DNS im Gefäß DNS -Farbstoff(Zielkonzentration: 0,6 mg/ml) hinzugegeben und im Vortexer ca. 5 sek gerüttelt.

Jede Geltasche wird mit dem TAE -Puffer aufgefüllt, anschließend wird in jede Tasche außer der ersten jeweils 24 µl DNS -Probe mit der Pipette G pipettiert. In die erste Geltasche werden 12,5 µl eines Markers(DNS -Eichbanden) hinzugefügt.

In die Gelelektrophorese - Apparatur wird TAE - Puffer hinzugegeben, bis die Wanne der Apparatur zur Hälfte gefüllt ist. Anschließend wird die Elektrophorese durch den Stromerzeuger – Stromstärke bei 90 mA – 30 bis 60 min betrieben.

Zum Schluss wird das Gel mit der UV -Lampe am Computer G mit dem Programm X3 beleuchtet. Hierbei soll das Programm so eingestellt werden, dass das Gel subjektiv nicht überleuchtet wirkt und die Banden zeitgleich klar zu erkennen sind.

2.6.4 RNS - Isolation

Bei dieser Methode wird die benötigte RNS extrahiert, um im weiteren Verlauf nachzuweisen, dass eine verstärkte Expression vom ANT - 1 stattgefunden hat.

Alle Arbeitsmaterialien und -flächen werden mit dem RNase - Inhibitor 1 behandelt.

Es werden Pipetten F verwendet.

Mit dem Skalpell wird ein ca. ein Millimeter großes Stück von einem der zuvor eingefrorenen Herzen abgeschnitten und in die Mikroschraubröhre mit 0,6 g Zirkonia - Kugeln – Mit Waage 3 abgewogen – überführt.

Es wird 1 ml TRIzol hinzugegeben und die Probe wird im Homogenisator bei 5000 Einheiten – gerätspezifisch – zweimal für 20 sek zerkleinert, bis eine breiige Konsistenz entsteht. Sofern hiernach noch Stückchen vorhanden sind, wird wiederholt für 20 sek die Probe zerkleinert bis die geforderte Konsistenz entstanden ist. Dann wird Chloroform (Verhältnis TRIzol : Chloroform = 4 : 1) hinzupipettiert.

Anschließend wird diese Zusammensetzung im Schüttler 1 auf der zweiten Stufe so lange geschüttelt, bis eine rötlich - breiige Masse entsteht, welche in der Zentrifuge C bei 12000 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugiert wird.

Der klare Überstand wird in das Reaktionsgefäß 2, welches zunächst 5 min im UV - Strahler von RNAsen befreit wird, überführt. Daraufhin wird Isopropanol (Verhältnis Isopropanol : Probe = 1 : 1) hinzugegeben, das Gefäß wird händisch kurz geschüttelt und für mindestens 20 min bei 4 °C gekühlt. Abschließend wird es in der Zentrifuge C bei 12000 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugiert.

Die Flüssigkeit wird nun abgegossen und 500 µl Ethanol (70 %) hinzugegeben. Das Gefäß wird im Schüttler 1 auf der zweiten Stufe für 5 sek geschüttelt. Nun wird wieder in der Zentrifuge C bei den zuvor genannten Bedingungen zentrifugiert.

Wieder wird die Flüssigkeit abgegossen und das Gefäß mit der Öffnung nach unten zum Trocknen für 30 min hingelegt. Dieser Prozess soll daraufhin im Heizblock 2 bei 37,8 °C für 15 min unterstützt werden.

In ein separates Reaktionsgefäß 2 wird Aqua dest. und RNase-Inhibitor 2 (Zielkonzentration: 0,8 U/µl) hinzupipettiert. Abhängig von der Größe des getrockneten RNS-Pellet wird 10 bis 50 µl der zuvor beschriebenen RNase-Inhibitor-Lösung hinzugefügt. Das Gefäß mit der RNS und dem zuvor genannten Inhibitor wird im Schüttler 1 auf der zweiten Stufe für 5 sek geschüttelt und abschließend für mindestens 30 min bei 4 °C gekühlt.

Die auf diese Weise isolierte RNS wird bei -80 °C gelagert.

2.6.5 Bestimmung RNS-Konzentration

Um einheitliche Mengen von RNS für die Herstellung von komplementärer DNS (cDNS) zu gewährleisten, wird in diesem Kapitel beschrieben, wie die Konzentration der RNS nach derer Isolation bestimmt wird.

Dazu werden das Spektralphotometer, der Computer J, das Programm X5 und die Pipetten E verwendet. Nach jeder Messung jeglicher Art wird die Flüssigkeit auf dem Sensor mit dem Papierhandtuch entfernt. Vor dem Auftragen der zu untersuchenden Flüssigkeit wird das entsprechende Gefäß mit dem Schüttler 3 für 1 sek bei 2500 Drehungen/min geschüttelt.

Zunächst wird das Gerät mit Aqua dest. geeicht, indem 1 bis 2 µl auf den Sensor pipettiert werden. Anschließend wird 1 bis 2 µl der RNase-Inhibitor-Lösung – im Kapitel RNS-Isolation beschrieben – auf den Sensor pipettiert, um einen Leerwert zu erstellen. Abschließend wird mit der gleichen Menge an RNS-Probe verfahren, um die Konzentration an RNS in dieser zu ermitteln. Die ermittelte Konzentration hat die Einheit ng/µl. 1000 wird durch die entsprechende Zahl der der RNS-Konzentration geteilt. So wird die später benötigte Menge an RNS-Probe in µl berechnet.

2.6.6 Herstellung cDNS

Zunächst muss von der isolierten RNS die cDNS hergestellt werden, anhand derer die erhöhte Expression vom ANT-1 gezeigt werden soll.

Ins Reaktionsgefäß 2, welches zunächst 5 min im UV-Strahler von RNAsen befreit wird, werden folgenden Substanzen hinzupipettiert (Tabelle 8).

Die Menge der RNS-Probe wurde im Kapitel „Bestimmung RNS-Konzentration“ berechnet. Diese Menge wird von 12 µl subtrahiert, woraus sich die Menge des benötigten Aqua dest. berechnet. Der Wipeout-Puffer wird über den Rand des Reaktionsgefäßes in dieses pipettiert. Das Gefäß samt Inhalt wird in der Zentrifuge D so lange zentrifugiert,

Tabelle 8: RNS - Probenzusammensetzung für die cDNS - Herstellung

Reihenfolge der Hinzugabe	Substanz	Menge
1	RNS - Probe	X
2	RNS - Wasser	12 µl minus X
3	Wipeout - Puffer	2 µl

bis 10000 rpm erreicht sind und nach dem darauffolgenden Beenden das Gerät zum Stillstand gekommen ist.

Die RNS - Probenzusammensetzung samt Gefäß wird im Thermocycler 2 für 5 min bei 42 °C erhitzt, wodurch eventuell vorhanden DNS zerstört wird.

In einem separaten Reaktionsgefäß 2 werden in der Zwischenzeit folgende Komponenten für das Reverse Transkriptase Komposit pipettiert (Tabelle 9):

Tabelle 9: Zusammensetzung Reverse Transkriptase Komposit für cDNS - Herstellung

Substanz	Menge
Reverse Transkriptase	1 µl
Reverse Transkriptase Puffer	4 µl
RNS - Primer	1 µl

Das Reverse Transkriptase Komposit samt Gefäß wird in der Zentrifuge D nach dem zuvor beschriebenen Schema zentrifugiert. Das Komposit wird zur RNS - Probenzusammensetzung, nachdem diese das Erhitzen durchlaufen hat, über den Rand des jeweiligen Gefäßes hinzupipettiert. Das Gefäß samt RNS - Probenzusammensetzung und dem Komposit wird in der Zentrifuge D – unverändertes Schema – zentrifugiert.

Abschließend wird das Reaktionsgefäß in den Thermocycler 2 gesetzt.

Mit den folgenden Einstellungen wird die cDNS generiert (Tabelle 10):

Tabelle 10: Einstellungen für cDNS - Herstellung

Prozess	Temperatur	Dauer
Elongation	42 °C	15 min
Inaktivierung	95 °C	3 min

2.6.7 Real-Time-PCR

Mit dieser quantitativen Methode soll nachgewiesen, dass eine verstärkte Expression vom ANT-1 bei den transgenen Tieren stattgefunden hat.

Zusätzlich zu der PCR vom ANT-1 werden die Haushaltsgene Beta-2-Mikroglobulin (B2M), 18-S-ribosomale-RNS (18S-rRNS), Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) repliziert. Es werden Pipetten E verwendet.

In das PCR-Reaktionsgefäß mit dem PCR-Reaktionsgefäß-Deckel werden folgende Substanzen für das jeweilige Gen pipettiert (Tabelle 11):

Tabelle 11: Zusammensetzung Real-Time-PCR

Gen	cDNS-Menge	Reaktionspuffer	Aqua dest.	Primer
ANT-1	2 µl	10 µl	6,8 µl	0,6 µl ¹¹
B2M	2 µl	10 µl	6,8 µl	0,6 µl ¹¹
GAPDH	3 µl	10 µl	6,4 µl	0,6 µl
HPRT	3 µl	10 µl	6,4 µl	0,6 µl
18S-rRNS	2 µl	10 µl	6 µl	2 µl

Für jedes Gen wird zusätzlich ein Leerwert erstellt, um Verunreinigungen auszuschließen. Hierzu wird anstelle der jeweiligen cDNS-Menge eine identische Menge an Aqua dest. verwendet. Die dazugehörigen Mengen der übrigen Substanzen bleiben unverändert.

Das Reaktionsgefäß wird mit dem entsprechenden Deckel verschlossen und in den Thermocycler 1 eingesetzt. Dazu wird das Programm X4 und der Computer I verwendet.

Folgende Einstellungen werden gewählt (Tabelle 12):

Tabelle 12: Einstellungen Real-Time-PCR

Prozess	Temperatur	Dauer	Durchläufe
Initial-Melting	93 °C	5 min	1
Melting	93 °C	1 min	33
Annealing	X	1 min	33
Elongation	72 °C	2 min	33
Terminale Elongation	72 °C	10 min	1

¹¹ Das angegebene Volumen bezieht sich sowohl auf den Forward- als auch den Reverse-Primer.

Die Annealing - Temperatur muss für jedes Gen entsprechend Tabelle 13 angepasst werden.

Tabelle 13: Annealing - Temperatur

Gen	Annealing - Temperatur
ANT - 1	64 °C
B2M	65 °C
GAPDH	62 °C
HPRT	63 °C
18S - rRNS	59,8 °C

3 Auswertung

Nachdem mit den verschiedenen Methoden Daten gewonnen wurden, wird in diesem Kapitel beschrieben, wie die einzelnen Daten auszuwerten sind.

3.1 Mitochondrienfunktionsmessungen

Dieser Abschnitt umfasst alle Vorschriften, anhand derer die Daten aus allen Mitochondrientestungen ausgewertet werden.

3.1.1 Respirationsmessung

Am Computer B wird mit Hilfe des Strathkelvin-Programms der Versuch ausgewertet. Im Programm soll für beide Kammern die Biomasse auf 0,05 mg, das Volumen auf 0,5 ml eingestellt sowie die Konfiguration Norm Ratio angegeben werden.

Folgende Graphenintervalle werden für die Auswertung nach folgendem Schema markiert (Abbildung 8, Tabelle 14):

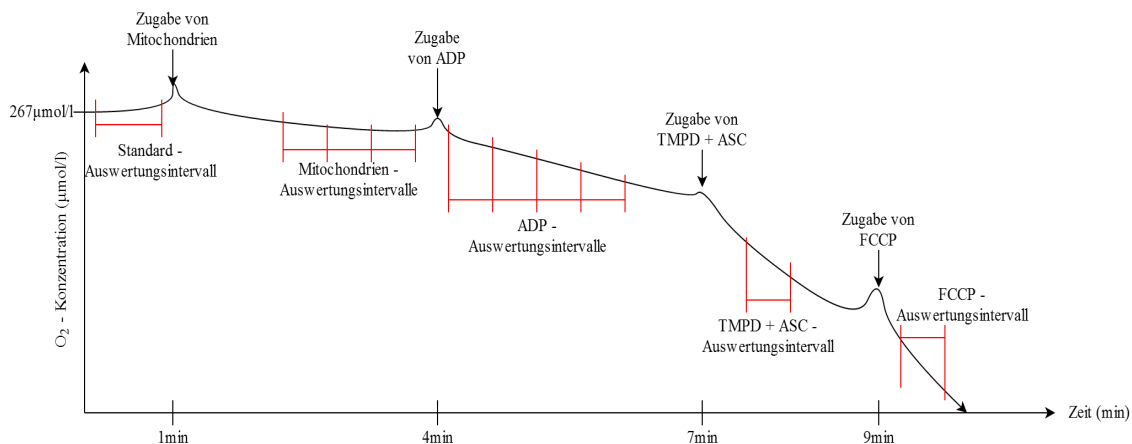
Tabelle 14: Auswertungsschema Respirationsmessung

Graphenintervall	Zeitraum	Graphenbereich	Auswertungsbereich
Standard	2 bis 50 sek	-	komplett
Mitochondrien	ab 2:20 min	-	3 - mal 30 - sek - Intervalle hintereinander
ADP	-	Ab ADP - Zugabe - Peak	ersten 10 Sekunden auslassen; dann 4 - mal 30 - sek - Intervalle hintereinander
TMPD + ASC	-	entsprechender Graphenabschnitt	30 Sekunden von möglichst peak - freiem Verlauf
FCCP	-	entsprechender Graphenabschnitt	30 Sekunden von möglichst peak - freiem Verlauf

Die ersten 10 Sekunden für das ADP sollen ab dem Anstieg des entsprechenden Peaks gezählt werden. Der Anstieg wird rein optisch bestimmt. Sofern kein Peak sichtbar ist, soll der Graph vergrößert werden, bis jener ersichtlich wird. Bei der Auswahl des Intervalls für das TMPD + ASC und FCCP soll der jeweilige Peak nicht enthalten sein. Das Strathkelvin-Programm überführt die Steigungen der jeweiligen Intervalle als Zahlenwert auf die Excel-Tabelle 1. Mit dem Programm Excel werden alle überführten Zahlen mit -1000 multipliziert.

Alle nachfolgenden Schritte werden mit Excel durchgeführt.

**Abbildung 8: Auswertungsschema für Respirationssmessung
(Graph idealisiert, nicht maßstabsgetreu)**



Von den drei Intervallwerten für die Mitochondrien wird derjenige ausgewählt, welcher die mittlere Größe aufweist. Falls zwei Werte gleich groß sind, wird einer von diesen übernommen.

Von den vier ADP - Werten wird der höchste gewählt. Die Werte für FCCP und TMPD + ASC werden komplett übernommen.

Da pro Mitochondrienprobe drei Versuchsdurchläufe gemacht werden, wird aus den drei ausgesuchten Einzelwerten für das jeweilige Substanzintervall der Mittelwert gebildet. Die nun entstandenen Werte werden für die Statistik benutzt.

3.1.2 Calcium - Retention - Capacity

Die erhaltenen Messwerte, welche in die Excel-Tabelle 1 transferiert werden, werden mit dem Programm Excel in einen Graphen überführt. Auf der Abszisse werden Hilfslinien mit Intervallgröße von 3 min hinzugefügt (Abbildung 9).

Nach Zugabe vom Calcium kommt es zu einem sprunghaften Anstieg der Intensität und direkt danach zu einer Abnahme (Peak), weil die Mitochondrien das Calcium aufnehmen (siehe Pfeil, Abbildung 9). Diese Peaks erscheinen solange, bis die Mitochondrien kein Calcium mehr aufnehmen können, die Pore sich öffnet und die Intensität nur noch kontinuierlich steigt.

Um eine möglichst objektive Zählung zu erhalten, wird das Excel-Programm DATA-ANALYZER verwendet.

Folgende Grundeinstellungen werden verwendet:

Threshold: 7

Mittelwertbreite: 5

Das Programm generiert einen Punkt über einem Graphenanstieg, den das Programm als Peak interpretiert. Nichtsdestotrotz soll der Graph parallel rein visuell betrachtet werden, um eindeutige Peaks, die nicht mitgezählt werden, zusätzlich zu erfassen und in die Zählung mitaufzunehmen sowie gesetzte Punkte über nicht vorhandenen Peaks nicht mitzuzählen. Die in Abbildung 10 dargestellten Peakformen sollen als Hilfestellung dienen.

Abbildung 9: Calcium - Retention - Capacity (Graph idealisiert)

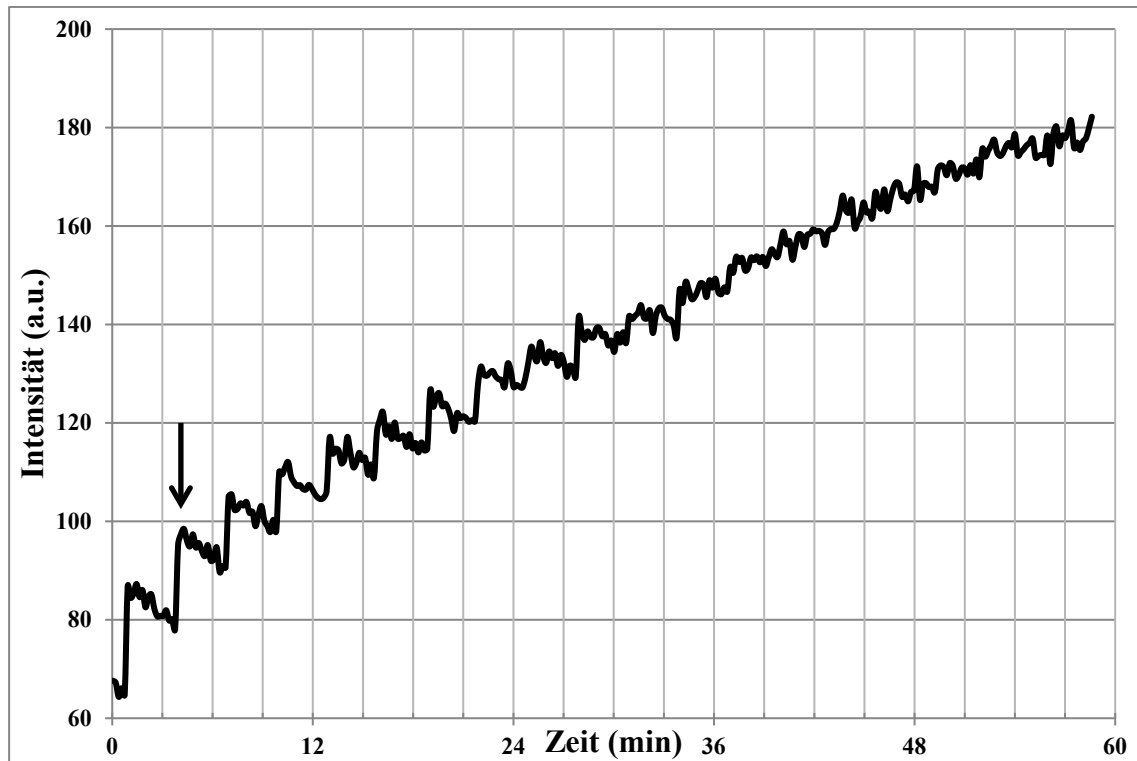
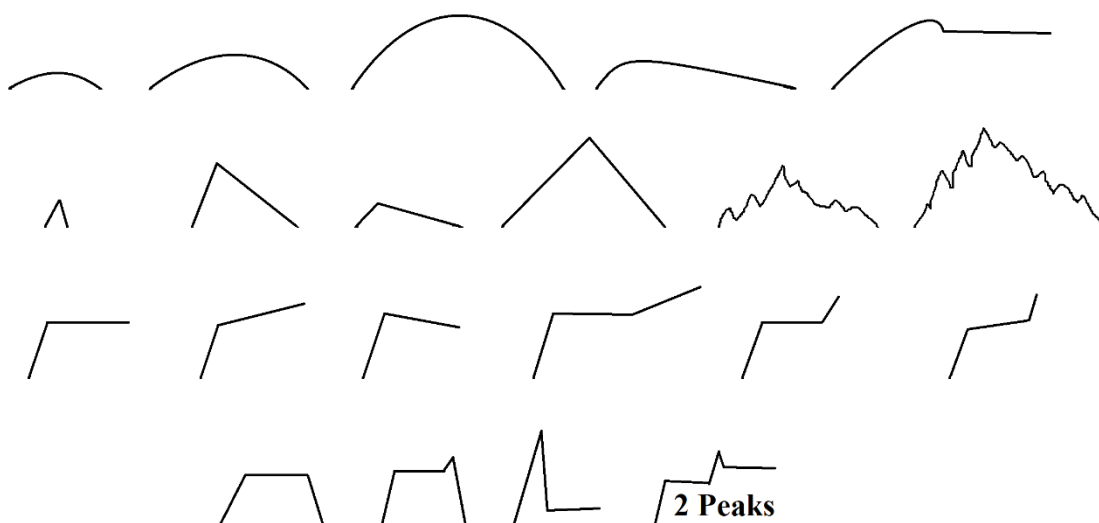


Abbildung 10: Peak-Formen bei Calcium - Retention - Capacity



Nach folgenden Regeln werden zusätzliche Peaks erfasst bzw. falsch gesetzte Punkte außer Acht gelassen:

- Alle generierten Punkte, die einen Wert kleiner als 1,5 auf der Ordinate haben, werden nicht gezählt.
- Ist der Abstand zwischen zwei maschinellen Punkten kleiner als 3 min, aber zwei Peaks sind eindeutig zu sehen, werden beide gezählt. Falls unter dem zweiten Punkt kein eindeutiger Peak zu sehen ist, wird nur der erste Punkt als Peak gewertet.
- Ist der Abstand zwischen zwei maschinellen Punkten nicht kleiner als 1,8 min, aber zwei Peaks sind eindeutig zu sehen, werden beide gezählt.
- Ist der Abstand zwischen zwei maschinellen Punkten kleiner als 1 min, unter dem ersten Punkt ist kein eindeutiger Peak zu sehen, werden beide nicht als Peak gezählt; sofern der erste Punkt über einem eindeutigen Peak liegt, werden beide gezählt.
- Ist der Abstand zwischen zwei maschinellen Punkten kleiner als 0,5 min, wird nur ein Punkt als Peak gezählt, sofern unter dem ersten Punkt eindeutig ein Peak zu sehen ist.
- Ist der Abstand zwischen zwei maschinellen Punkten – zwei Peaks sind eindeutig zu sehen – 3 bis 5 min und innerhalb dieses Intervalls finden sich weder Punkte noch eindeutige Peaks, so werden nur zwei Peaks gezählt.
- Falls nach dem zuletzt maschinell als eindeutig markierten Peak mehr als 5 bis 6 min vergangen sind und wieder Punkte über eindeutigen Peaks gesetzt wurden, so werden innerhalb dieses Intervalls keine Peaks mitgezählt.
- Falls sich zwischen zwei maschinell markierten Peaks, die als solche eindeutig zu erkennen sind, weitere eindeutige Peaks befinden, die maschinell nicht erfasst wurden und die Regeln eins bis vier nicht anwendbar sind, wird die entsprechende Anzahl gezählt.
- Sind vor dem ersten maschinell als eindeutig markierten Peak weitere eindeutige Peaks, die maschinell nicht erfasst wurden, wird die entsprechende Menge gezählt.
- Folgt nach einem maschinell als eindeutig markierten Peak ein weiterer vermeintlicher Peak, dessen Form nicht in der o.g. Abbildung aufgeführt ist, darüber aber ein Punkt gesetzt wurde, so wird dieser mitgezählt. Ab hier wird die Zählung beendet, sofern im weiteren Verlauf des Graphens subjektiv keine weiteren Peaks mehr zu sehen sind, das Programm aber weitere Punkte setzte.
- Sofern der vom Programm generierte Mittelwert am Anfang des Graphen negativ ist und hieraus vermeintliche Peaks durch Punkte markiert wurden, werden diese Punkte nicht mitgezählt.

Die Anzahl der Peaks für den jeweiligen Graphen wird mit 10 nmol multipliziert.

Die nun entstandenen Werte werden für die Statistik benutzt.

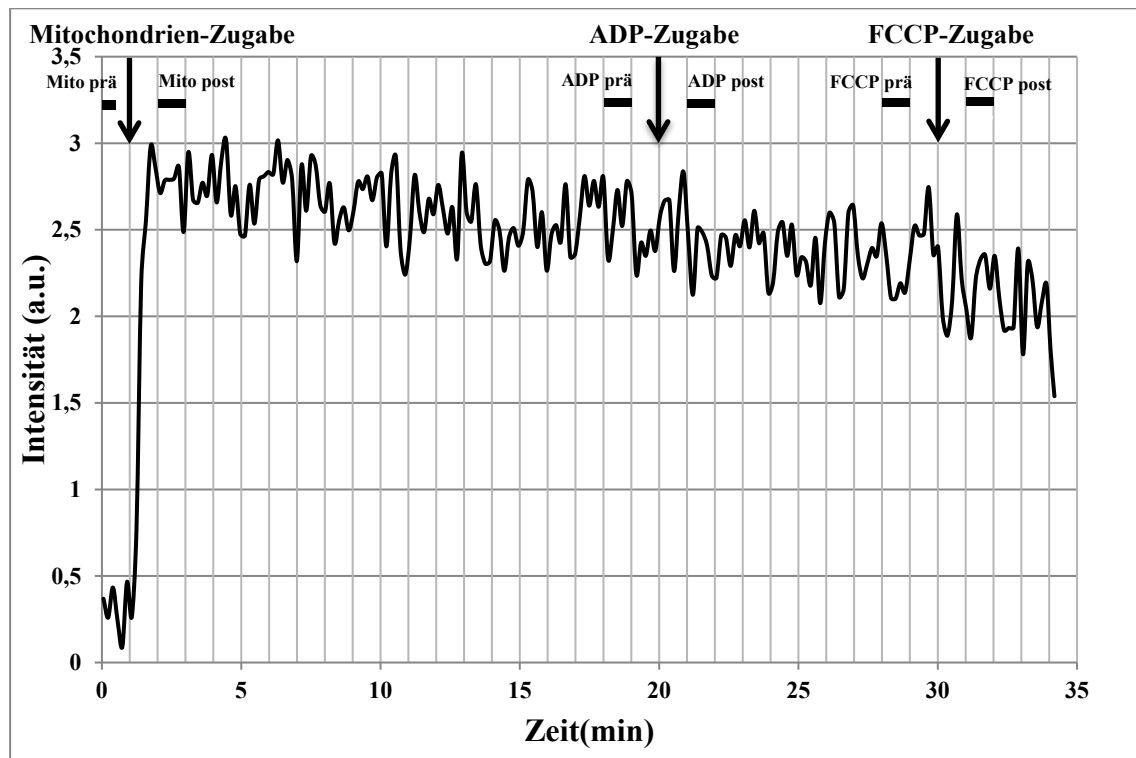
3.1.3 Messung der Autofluoreszenz

Anhand der Werte, welche nach dem Versuch in die Excel-Tabelle 2 transferiert wurden, werden mit Hilfe des Programms Excel die Zeitpunkte bestimmt, zu denen jeweils Mitochondrien, ADP und FCCCP hinzugegeben wurden. Am besten können diese Zeitpunkte festgelegt werden, indem für diese die Zeitwerte genommen werden, die im Membranpotentialversuch der gerade betrachteten Mitochondrienprobe enthalten sind. Als Zugabezeitpunkt wird derjenige Wert genommen, nach welchem die Intensitätswerte im zeitlichen Mittel eine Differenz von mindestens eins zu den Vorwerten aufweisen. Die festgestellten Zugabezeiten dienen als Bezugspunkt (Abbildung 11).

Bei der Mitochondrienzugabe werden alle Intensitätswerte berücksichtigt, die 0,5 bis maximal 1,5 min vor dem Zugabezeitpunkt liegen. Nach dem Zugabezeitpunkt werden alle Intensitätswerte berücksichtigt, die zwischen 1 und 2 min nach dem Zeitpunkt liegen.

Sowohl bei den ADP- als auch den FCCCP-Werten werden alle Intensitätswerte berück-

Abbildung 11: Autofluoreszenz-Messzeitpunkte (Graph idealisiert)



sichtigt, die zwischen 1 und 2 min vor und nach dem jeweiligen Zugabezeitpunkt liegen. Aus allen Intensitätswerten, die einem der 1 - min - Intervalle zugeordnet sind, wird mit dem Programm Excel der Mittelwert berechnet. Dies wird für alle sechs Intervalle gesondert durchgeführt.

Die nun entstandenen Werte werden für die Statistik benutzt.

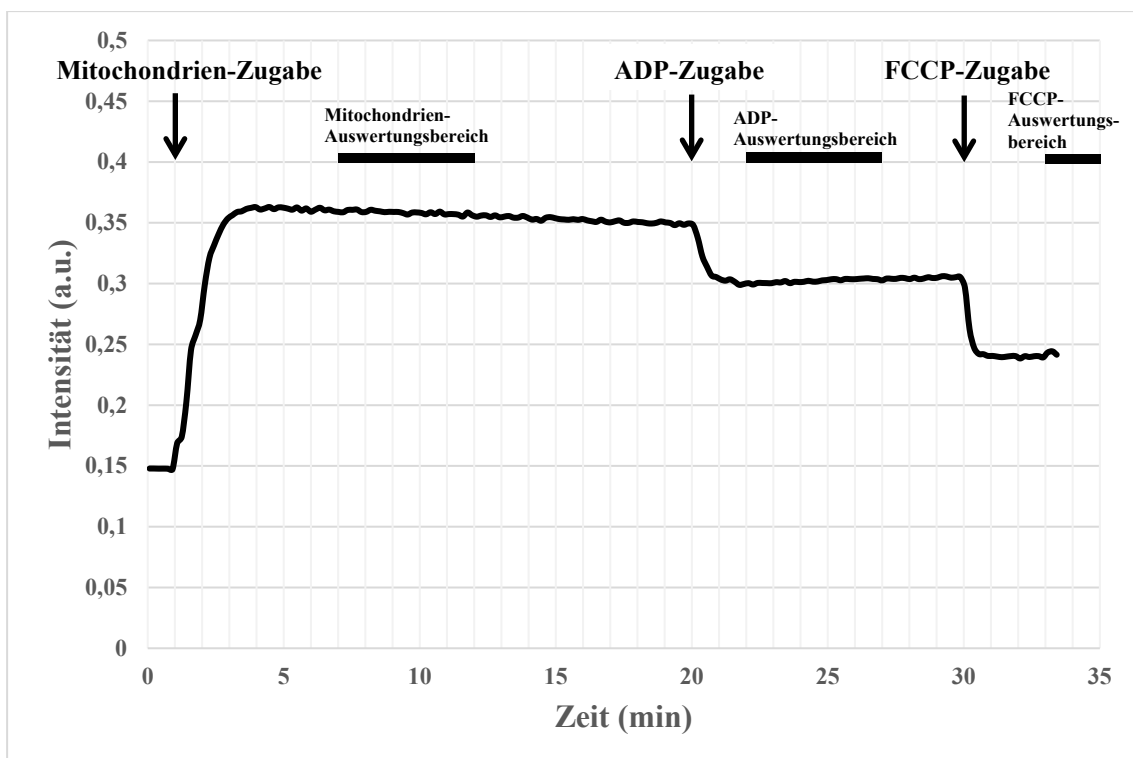
3.1.4 Messung des Membranpotentials

Die generierten Zeit- und Intensitätswerte werden automatisch in die Excel-Tabelle 2 überführt. Alle folgenden mathematischen Schritte werden mit dem Programm Excel durchgeführt.

Zuerst wird aus jedem Intensitätswert der Kehrwert gebildet und dieser mit 100 multipliziert. Aus den Intensitätswerten von den Intervallen 7 bis 12 min, 22 bis 27 min und die letzten 2 min werden jeweils die Mittelwerte gebildet (Abbildung 12).

Falls eine Messung 20 min dauert, werden 4 bis 7 min, 11 bis 14 min und die letzten 2 min als alternative Intervalle genommen. Generell soll darauf geachtet werden, dass die Intervalle innerhalb des Bereiches von dem Graphen liegen, in dem die jeweilige

Abbildung 12: Membranpotential-Messzeitpunkte (Graph idealisiert)



Substanz hinzugegeben wurde. Es sollen die Zeitwerte als Grenze genommen werden, wo zum ersten Mal die oben genannten Zahlen unabhängig von den Nachkommastellen stehen.

Das Intervall 7 bis 12 min bzw. 4 bis 7 min entspricht dem Mitochondrienzugabebereich, das Intervall 22 bis 27 min bzw. 11 bis 14 min entspricht dem ADP-Zugabebereich und die letzten 2 min entsprechen dem FCCP-Zugabebereich.

Aus den Mittelwerten der jeweiligen Bereiche werden folgenden Differenzen gebildet:

- Mitochondrien minus ADP
- Mitochondrien minus FCCP
- ADP minus FCCP

Die nun entstandenen Werte werden für die Statistik benutzt.

3.1.5 Amplex Ultra Red Hydrogen Peroxide Peroxidase Assay/ROS-Messung

Die generierten Zeit- und Intensitätswerte werden automatisch in die Excel-Tabelle 2 überführt. Alle folgenden mathematischen Schritte werden mit dem Programm Excel durchgeführt.

Für jeden Messzeitpunkt wird aus den beiden gemessenen Intensitätswerten der Mittelwert gebildet. Dies wird für alle vier Versuchsanordnungen separat durchgeführt. Aus den beiden Zeitwerten, die korrespondierend zu einem Intensitätswertepaar sind, wird ebenfalls jeweils der Mittelwert gebildet. Auch hierbei wird dies separat für alle vier Versuchsanordnungen durchgeführt.

Weiterhin wird der Mittelwert aus den vier korrespondierenden gemittelten Zeitwerten ermittelt. Dies wird in der Zeitwertereihe für jedes einzelne Element durchgeführt.

Anschließend wird die Steigung in den ersten 3 min für die vier Versuchsanordnungen bestimmt. Der Wert für die Steigung des Leerwertes wird jeweils von den anderen drei Steigungswerten subtrahiert.

Die nun entstandenen Differenzen werden für die Statistik benutzt.

3.2 ANT-1-Expressionsanalyse

Mit Hilfe der Real-Time-PCR werden Cycle-Threshold-Werte (C_t -Werte) für alle untersuchten Gene generiert. Für jedes untersuchte Tier werden folgende Schritte durchgeführt.

Mit dem Excel-Programm BestKeeper wird aus den jeweiligen C_t -Werten aller vier Haushaltsgene zusammen ein Indexwert gebildet (Pfaffl, et al., 2004).

Alle nun folgenden Schritte erfolgen durch das Programm Excel.

Der gebildete Indexwert wird vom C_t -Wert, welcher für das ANT-1-Gen bestimmt wurde, subtrahiert.

Die Differenzen der einzelnen Tiere aus der Gruppe, die das WT-Herz aufweist und der Normoxie ausgesetzt war, werden dazu verwendet, einen Median zu bilden.

Der gebildete Median wird anschließend von der Differenz aus C_t -Wert des ANT-1-Gens und des Indexwertes eines jeden einzelnen untersuchten Tieres subtrahiert.

Um die relative Expression zu berechnen, wird die Zahl zwei mit der zuletzt bestimmten Differenz, nachdem diese mit minus eins multipliziert wurde, potenziert.

Die nun entstandenen Werte werden für die Statistik benutzt.

3.3 Statistik

Alle gesammelten Daten werden entweder mit dem T-Test für unabhängige Stichproben oder mit dem Mann-Whitney-U-Test auf Signifikanz geprüft.

Alle hier genannten Tests werden mit dem Programm SPSS auf dem Computer durchgeführt.

Zunächst muss jede Gruppe auf Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilk-Test überprüft werden. Falls diese nicht gegeben [$p < 0,05$] oder in einer Gruppe $N < 3$ ist, wird der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Sobald eine Stichprobe $N > 30$ überschreitet, kann die Normalverteilung angenommen werden.

Abschließend wird mit dem Levene-Test [$p < 0,05$] entschieden, welche Signifikanz beim Ergebnis des T-Tests genutzt wird:

$p < 0,05$: Werte für Signifikanz aus dem Abschnitt „Varianzen sind nicht gleich“ übernehmen.

$p > 0,05$: Werte für Signifikanz aus dem Abschnitt „Varianzen sind gleich“ übernehmen.

Damit die statistische Signifikanz gegeben ist, soll der α -Fehler $< 5\%$ sein.
Als ergänzender Test wird der Zweifaktorielle-ANOVA-Test verwendet.

4 Ergebnisse

Ein Teil der Ergebnisse, welche in dieser Arbeit erhoben wurden, wurden bereits 2021 in der Fachzeitschrift „Membranes“ und dem folgenden Titel veröffentlicht (Dörner, Andrea, et al. 2021. Mitochondria Isolated from Hearts Subjected to Ischemia/Reperfusion Benefit from Adenine Nucleotide Translocase 1 Overexpression. Membranes (Basel). 2021, Bd. 11, PMID: 34832065).

4.1 ANT-1-Expressionsanalyse

Um die ANT-1-Expression nach I/R zu beurteilen, wurde die ANT-1-mRNS-Expression bei den ANT-TG- und WT-Ratten analysiert, nachdem diese einer Normoxie bzw. I/R ausgesetzt waren.

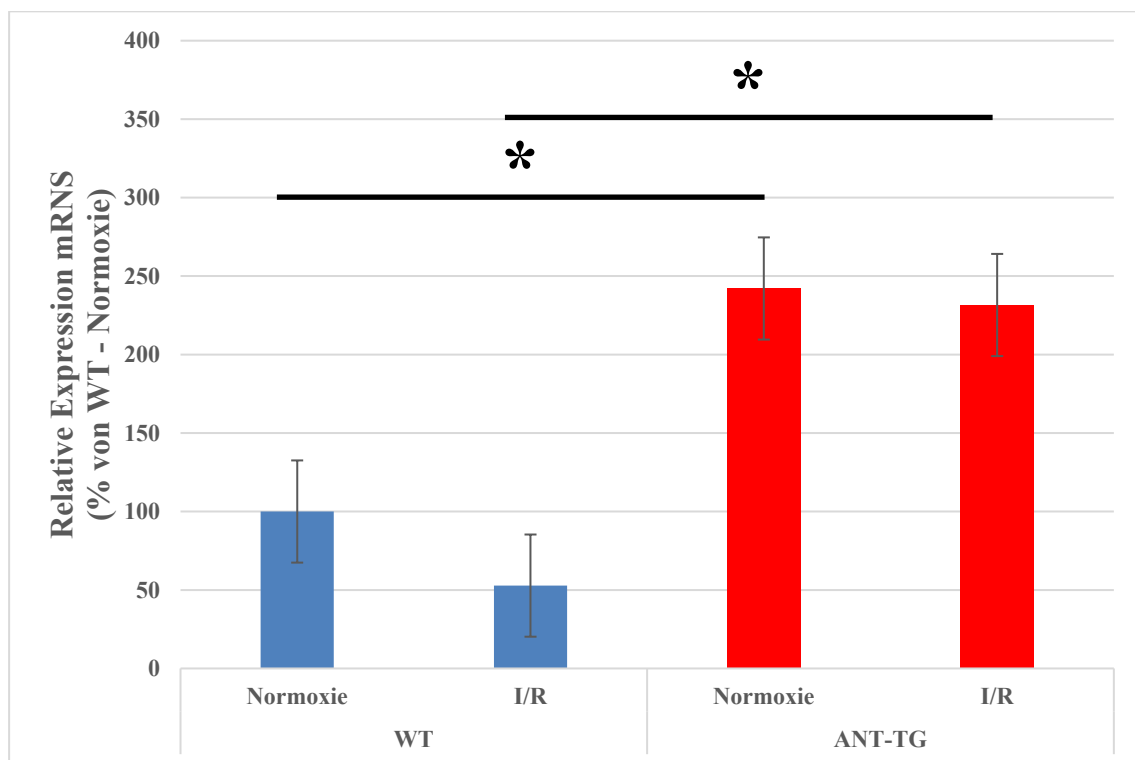


Abbildung 13: Expression ANT-1-mRNS: Zunächst wurde nach 10 min Stabilitätsphase entweder eine Normoxie (15 min basale Perfusion) bzw. I/R (45 min Ischämie gefolgt von 120 min Reperfusion) durchgeführt.

Anschließend wurde für jede der vier Gruppen die Menge an ANT-1-mRNS mittels Real-Time-RT-PCR bestimmt. Um die relative Expression zu bestimmen, wurde die absolute Expression der jeweiligen Gruppe in Bezug zur WT-Normoxie-Gruppe gesetzt. Als interne Kontrolle für die mRNS-Expression wurde das Programm BestKeeper benutzt, welches eine Korrelation der Haushaltsgene B2M, GAPDH, HRPT und 18S-rRNS untereinander berechnet.

(WT-Normoxie)N=6; (WT-I/R; TG-ANT-Normoxie)N=5; (TG-ANT-I/R)N=4; *: p<0,05

In den transgenen Tieren wird sowohl bei Normoxie als auch bei I/R signifikant mehr ANT-1-RNS im Vergleich zu den jeweiligen WT-Tieren synthetisiert (Normoxie: 242,1%±32,56 vs. 100%±32,57, p=0,036; I/R: 231,58%±32,56 vs. 52,79%±32,56,

$p=0,014$), (Abbildung 13). Dies spiegelt die Überexpression der ANT - TG - Herzen wider. Der erhobene Wert dient zudem als Korrelatparameter für eine erhöhte ANT - 1 - Proteinsynthese, welche von der Arbeitsgruppe um Andrea Dörner bestätigt wurde (Dörner, et al., 2021).

WT - Herzen bilden nach I/R weniger ANT - 1 - mRNS, wobei der Unterschied nicht signifikant ist. Dieser Unterschied zwischen Normoxie und I/R verschwindet fast vollständig, wenn ANT - 1 überexprimiert wird. Die ANT - 1 - Überexpression bleibt nach I/R erhalten ($242,1\% \pm 32,56$ vs. $231,58\% \pm 32,56$, $p=0,86$), (Abbildung 13).

4.2 Biometrie

In diesem Kapitel soll analysiert werden, ob die Herzen auf makroskopischer Ebene von einer Überexpression von ANT - 1 einen protektiven Benefit nach Ischämie und Reperfusion haben. Anhand der Gewichte sollen Rückschlüsse auf eine mögliche Ödembildung bedingt durch die entstandene Infarzierung gemacht werden. Hierbei wurden weibliche und männliche Tiere zusammen betrachtet. Um Verzerrungen durch geschlechtsspezifische Unterschiede zu minimieren, wurden zusätzlich das Gesamterzgewicht bzw. das Gewicht des linken Ventrikels in Bezug zum Körpergewicht und Tibialänge gesetzt. Der Quotient, welcher die Tibialänge berücksichtigt, scheint weniger durch das Geschlecht beeinflusst zu sein, da das Körpergewicht bedingt durch den Geschlechtsdimorphismus und den gesundheitlichen Zustand variieren kann (Tiemann, et al., 2003). Die Tiere haben nach I/R signifikant höhere Werte sowohl beim absoluten Gewicht des gesamten Herzens als auch bei beiden entsprechenden Quotienten verglichen mit der Normoxie, unabhängig davon ob es sich um ANT - 1 - oder WT - Herzen handelt (Tabelle 15). Dies spricht dafür, dass nach Ischämie und Reperfusion sich ein Ödem gebildet hat. Beim ANOVA - Test zeigt sich, dass die Unterschiede darauf beruhen, ob vorher normoxische Bedingungen oder I/R herrschten. Der Genotyp hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Herzgewicht bzw. auf den Quotienten aus Herzgewicht/Tibialänge. Außerdem gab es keine Wechselwirkungen zwischen den Genotypen und den beiden Bedingungen Normoxie bzw. I/R (Tabelle 16). Der Herzgewicht/Körpergewicht - Quotient hat beim ANOVA - Test einen p - Wert von $0,026$. Herzgewicht/Tibialänge hat hingegen einen p - Wert oberhalb von $0,05$; im T - Test von Herzgewicht/Körpergewicht liegt die Signifikanz oberhalb von $0,05$. Diese Konstellation kann als Bestätigung herangeführt werden, dass keine Unterschiede zwischen den Genotypen gibt.

Genotyp		TG-ANT	WT	TG-ANT	WT
Bedingung		Normoxie		I/R	
N		11(3m+8w)	12(3m+9w)	19(8m+11w)	18(5m+13w)
Herzgewicht (g)	μ	1,31	1,39	1,81	1,79
	σ	$\pm 0,32$	$\pm 0,4$	$\pm 0,44$	$\pm 0,60$
Herzgewicht/Körpergewicht (g/g)	μ	0,00375	0,00342	0,00457	0,00408
	σ	$\pm 0,00071$	$\pm 0,00068$	$\pm 0,00059$	$\pm 0,00089$
Herzgewicht/Tibialänge (g/cm)	μ	0,312	0,317	0,418	0,399
	σ	$\pm 0,065$	$\pm 0,075$	$\pm 0,08$	$\pm 0,102$
p(T-Test)					
		TG-ANT I/R vs. WT I/R	TG-ANT Normoxie vs. WT Normoxie	WT Normoxie vs. WT I/R	TG-ANT Normoxie vs. TG-ANT I/R
Herzgewicht (g)		0,66	0,88	0,048	<0,01
Herzgewicht/Körpergewicht (g/g)		0,053	0,12	0,039	<0,01
Herzgewicht/Tibialänge (g/cm)		0,31	0,86	0,025	<0,01

Tabelle 15: Biometrie des Gesamtherzens: Das Herz, die Tibia und das Körpergewicht wurden nach 10 min Stabilitätsphase gefolgt von Normoxie (15 min basale Perfusion) bzw. I/R (45 min Ischämie gefolgt von 120 min Reperfusion) gewogen bzw. gemessen und aus diesen Werten wurden noch zusätzlich die entsprechenden Quotienten gebildet. Bei den jeweiligen Gruppen wurden hieraus der Mittelwert (μ) und die Standardabweichung (σ) bestimmt. Bei der Gruppengröße (N) wird noch zusätzlich die Anzahl der Männchen (m) und Weibchen (w) aufgeführt.

Im unteren Teil der Tabelle wird die Signifikanz (p) des jeweiligen Unterschiedes im Mittelwert beim Gruppenvergleich aufgeführt.

p(Zwei-Faktor-ANOVA)	Genotyp	Bedingung	Genotyp x Bedingung
Herzgewicht (g)	0,8	<0,01	0,69
Herzgewicht/Körpergewicht (g/g)	0,026	<0,01	0,7
Herzgewicht/Tibialänge (g/cm)	0,76	<0,01	0,59

Tabelle 16: Biometrie des Gesamtherzens – Statistische Ergänzungen zu Tabelle 15: Es werden die unterschiedlichen Signifikanzen (p) angezeigt, wenn Genotyp und Bedingung mithilfe des Zweifaktoriellen-ANOVA-Tests überprüft werden.

Die Unterschiede, die vorher beim Gesamtherz beschrieben wurden, begrenzen sich auf den linken Ventrikel. Dieser zeigt ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen Normoxie und I/R, nicht aber beim Genotyp. Beim rechten Ventrikel dagegen sind keine signifikanten Unterschiede bei den erhobenen Parametern vorhanden – Daten nicht aufgeführt.

Die geforderte Signifikanz für den linken Ventrikel des WT-Herzens wird nicht erreicht. Das Gewicht und der Quotient aus linkem-Ventrikel/Tibialänge hat einen p-Wert von 0,068 und 0,06. Aber die Tendenz geht zu höheren Werten nach I/R. Und die Signifikanz verbessert sich, sobald das ANT-Herz betrachtet wird. So zeigen alle drei Parameter signifikante Unterschiede mit jeweils niedrigeren Werten zugunsten einer erhöhten Expression von ANT-1 (Tabelle 17). Gestützt bzw. bestätigt wird das ganze durch den ANOVA-Test, bei welchem alle drei Parameter signifikante Unterschiede bei der Betrachtung der Bedingung zeigen (Tabelle 18). Zusätzlich kommt es beim Quotienten aus linkem-Ventrikel/Körpergewicht zu einer signifikanten Wechselwirkung zwischen Genom und der Bedingung (Tabelle 18). Der gleiche Quotient zeigt signifikant

niedrigere Werte in der ANT-Gruppe, wenn beide Gruppen I/R als Grundbedingung haben (Tabelle 17).

Genotyp		TG-ANT	WT	TG-ANT	WT
Bedingung		Normoxie		I/R	
N		11 (3m+8w)	12 (5m+7w)	9 (3m+6w)	12 (5m+7w)
Linker Ventrikel (g)	μ	0,87	1	1,24	1,39
	σ	$\pm 0,15$	$\pm 0,25$	$\pm 0,3$	$\pm 0,65$
Linker Ventrikel/Körpergewicht (g/g)	μ	0,00249	0,00246	0,00327	0,00274
	σ	$\pm 0,00026$	$\pm 0,00038$	$\pm 0,00035$	$\pm 0,00063$
Linker Ventrikel/Tibialänge (g/cm)	μ	0,207	0,227	0,292	0,298
	σ	$\pm 0,026$	$\pm 0,042$	$\pm 0,061$	$\pm 0,114$
p(T-Test)					
		TG-ANT I/R vs. WT I/R	TG-ANT Normoxie vs. WT Normoxie	WT Normoxie vs. WT I/R	TG-ANT Normoxie vs. TG-ANT I/R
Linker Ventrikel (g)		0,86	0,19	0,068	<0,01
Linker Ventrikel/Körpergewicht (g/g)		0,036	0,62	0,83	<0,01
Linker Ventrikel/Tibialänge (g/cm)		0,65	0,18	0,06	<0,01

Tabelle 17: Biometrie des linken Ventrikels: Der linke Ventrikel, die Tibia und das Körpergewicht wurden nach 10 min Stabilitätsphase gefolgt von Normoxie (15 min basale Perfusion) bzw. I/R (45 min Ischämie gefolgt von 120 min Reperfusion) gewogen bzw. gemessen und aus diesen Werten wurden noch zusätzlich die entsprechenden Quotienten gebildet. Bei den jeweiligen Gruppen wurden hieraus der Mittelwert (μ) und die Standardabweichung (σ) bestimmt. Bei der Gruppengröße (N) wird noch zusätzlich die Anzahl der Männchen (m) und Weibchen (w) aufgeführt.

Im unteren Teil der Tabelle wird die Signifikanz (p) des jeweiligen Unterschiedes im Mittelwert beim Gruppenvergleich aufgeführt.

p(Zwei-Faktor-ANOVA)	Genotyp	Bedingung	Genotyp x Bedingung
Linker Ventrikel (g)	0,25	<0,01	0,95
Linker Ventrikel/Körpergewicht (g/g)	0,087	<0,01	0,029
Linker Ventrikel/Tibialänge (g/cm)	0,56	<0,01	0,73

Tabelle 18: Biometrie des linken Ventrikels – Statistische Ergänzungen zu Tabelle 17: Es werden die unterschiedlichen Signifikanzen (p) angezeigt, wenn Genom und Bedingung mithilfe des Zweifaktoriellen-ANOVA-Tests überprüft werden.

4.3 Respirationsmessungen

Anhand des Sauerstoffverbrauches unter verschiedenen Bedingungen soll geprüft werden, ob die ANT-1-Überexpression einen Einfluss auf die Aktivität von Komplex I und II und somit auf die Respiration hat und diese nach Ischämie und Reperfusion verändert ist.

Werden normoxische Bedingungen betrachtet, so zeigt Komplex I keine signifikanten Unterschiede zwischen den ANT-1- und WT-Herzen. Diese fehlende Signifikanz wird sowohl unter basalen Bedingungen (ohne ADP-Stimulation) als auch nach ADP-Stimulation beobachtet (Abbildung 14). Auch nach I/R zeigen sich ähnliche Ergebnisse, wenn ANT-1- mit WT-Herzen verglichen werden (Abbildung 14).

Nur bei den WT-Tieren verbraucht Komplex I bei Normoxie signifikant mehr Sauerstoff als nach I/R. Dies gilt sowohl für ADP-stimulierte als auch unstimulierte Mito-

chondrien (Basal: $18,94 \text{ nmol O}_2 \pm 3,32^{12}$ vs. $12,91 \text{ nmol O}_2 \pm 4,19$, $p=0,034$;
 ADP: $42,89 \text{ nmol O}_2 \pm 13$ vs. $22,65 \text{ nmol O}_2 \pm 6,51$, $p<0,01$), (Abbildung 14). Diese Unterschiede sind bei Überexpression von ANT-1 auch nach zuvor beschriebener unterschiedlicher Stimulation nicht mehr vorhanden (Abbildung 14).

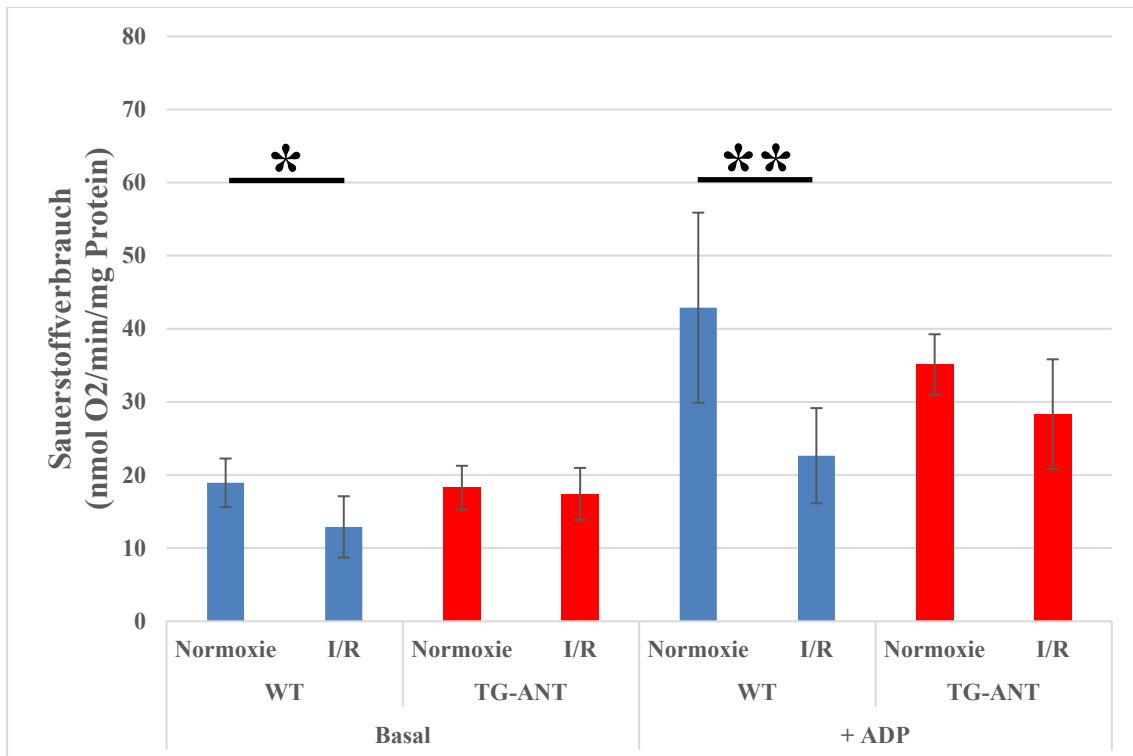


Abbildung 14: Respiration Komplex I: Bei WT- und TG-ANT-1-Mitochondrien wurde der Sauerstoffverbrauch gemessen. Dieser Verbrauch wurde jeweils nach 10 min Stabilitätsphase gefolgt von Normoxie (15 min basale Perfusion) bzw. I/R (45 min Ischämie gefolgt von 120 min Reperfusion) gemessen. Zusätzlich wurde der Verbrauch nach Stimulation durch ADP (**Zielkonzentration: 40 $\mu\text{mol/l}$**) bestimmt. Hierbei war Komplex I aktiv. (WT-Normoxie; WT-I/R; TG-ANT-Normoxie)N=6; (TG-ANT-I/R)N=5; *: $p<0,05$; **: $p<0,01$

Komplex II bei WT-Tieren zeigt nur nach ADP-Zugabe einen signifikant höheren Sauerstoffverbrauch bei Normoxie. Werden basale Bedingungen (ohne ADP-Zugabe) betrachtet, so entstehen keine Unterschiede, aber es zeigt sich ein Trend zu einem höheren Sauerstoffverbrauch bei Normoxie (Basal: $36,83 \text{ nmol O}_2 \pm 8,88$ vs. $24,07 \text{ nmol O}_2 \pm 14$, $p=0,22$; ADP: $88,89 \text{ nmol O}_2 \pm 35,62$ vs. $34,56 \text{ nmol O}_2 \pm 17,27$, $p<0,01$), (Abbildung 15).

Ebenso wenn ANT-Tiere mit WT-Tieren verglichen werden, werden beim Komplex II

¹² Es wird aus Gründen der Übersicht auf das volle Ausschreiben der Einheit verzichtet [komplett: $\text{nmol O}_2/\text{min}/\text{mg Protein}$]

keine signifikanten Unterschiede beim Sauerstoffverbrauch festgestellt, unabhängig davon ob die Grundbedingung die Normoxie bzw. I/R ist oder ob mit ADP stimuliert wird oder nicht (Abbildung 15).

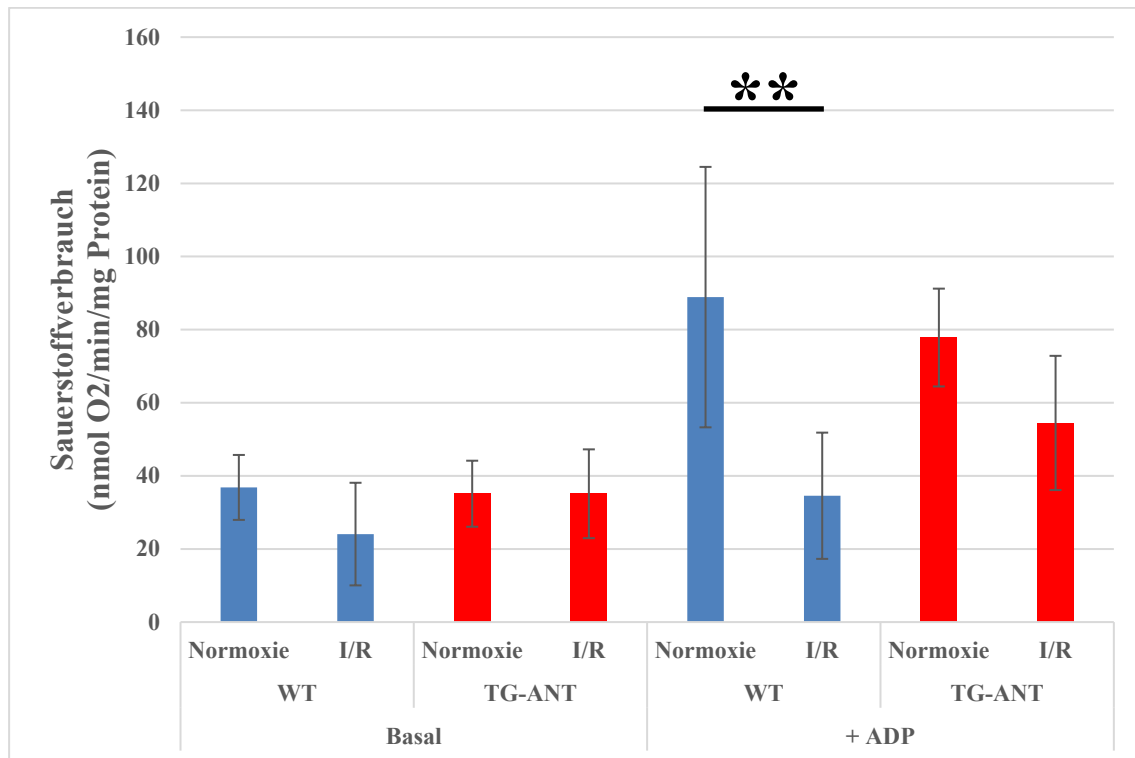


Abbildung 15: Respiration Komplex II: Bei WT- und TG-ANT-1-Mitochondrien wurde der Sauerstoffverbrauch gemessen. Dieser Verbrauch wurde jeweils nach 10 min Stabilitätsphase gefolgt von Normoxie (15 min basale Perfusion) bzw. I/R (45 min Ischämie gefolgt von 120 min Reperfusion) gemessen. Zusätzlich wurde der Verbrauch nach Stimulation durch ADP (Zielkonzentration: 40 µmol/l) bestimmt. Hierbei war Komplex I inaktiv.

(WT-Normoxie; WT-I/R; TG-ANT-Normoxie)N=6; (TG-ANT-I/R)N=5; **: p<0,01

Unter basalen und ADP-stimulierten Bedingungen ermöglicht die verstärkte Expression vom ANT-1 nach I/R ein Funktionsniveau der Mitochondrien, welches dem bei Normoxie entspricht (Komplex I basal: 18,28 nmol O₂±2,99 vs. 17,43 nmol O₂±3,55, p=0,75; Komplex I ADP: 35,11 nmol O₂±4,15 vs. 28,33 nmol O₂±7,5, p=0,14; Komplex II basal: 35,11 nmol O₂±9,03 vs. 35,1 nmol O₂±12,15, p=0,5; Komplex II ADP: 77,83 nmol O₂±13,38 vs. 54,47 nmol O₂±18,36, p=0,051), (Abbildung 14, Abbildung 15). Dieses Angleichen des Funktionsniveaus findet für Komplex II unter basalen Bedingungen nicht statt, da bereits beim WT-Herz keine signifikanten Unterschiede bestehen (Abbildung 15).

4.4 Calcium-Retention-Capacity

Mit der Messung der aufgenommenen Calciummenge soll überprüft werden, inwieweit eine Überexpression von ANT-1 die Fähigkeit der Mitochondrien verbessert, nach Ischämie und Reperfusion Calcium zurückzuhalten, wodurch die Öffnung der mPTP hinausgezögert wird.

Es werden wieder zuerst die ANT-1- und WT-Herzen verglichen.

Nach Ischämie und Reperfusion können TG-ANT-Mitochondrien im Vergleich zu WT-Tieren unter basalen Bedingungen und unter Zusatz von CsA signifikant mehr Calcium aufnehmen, bevor sich die mPTP öffnet (Basal: $86 \text{ nmol} \pm 29,66$ vs. $50 \text{ nmol} \pm 15,5$, $p=0,029$; CsA: $120 \text{ nmol} \pm 29,15$ vs. $78,33 \text{ nmol} \pm 30,61$, $p=0,047$), (Abbildung 16). CsA ist einer der beiden wichtigsten Inhibitoren der mPTP, weshalb der Gebrauch die Öffnung verzögern soll (Karch, et al., 2019).

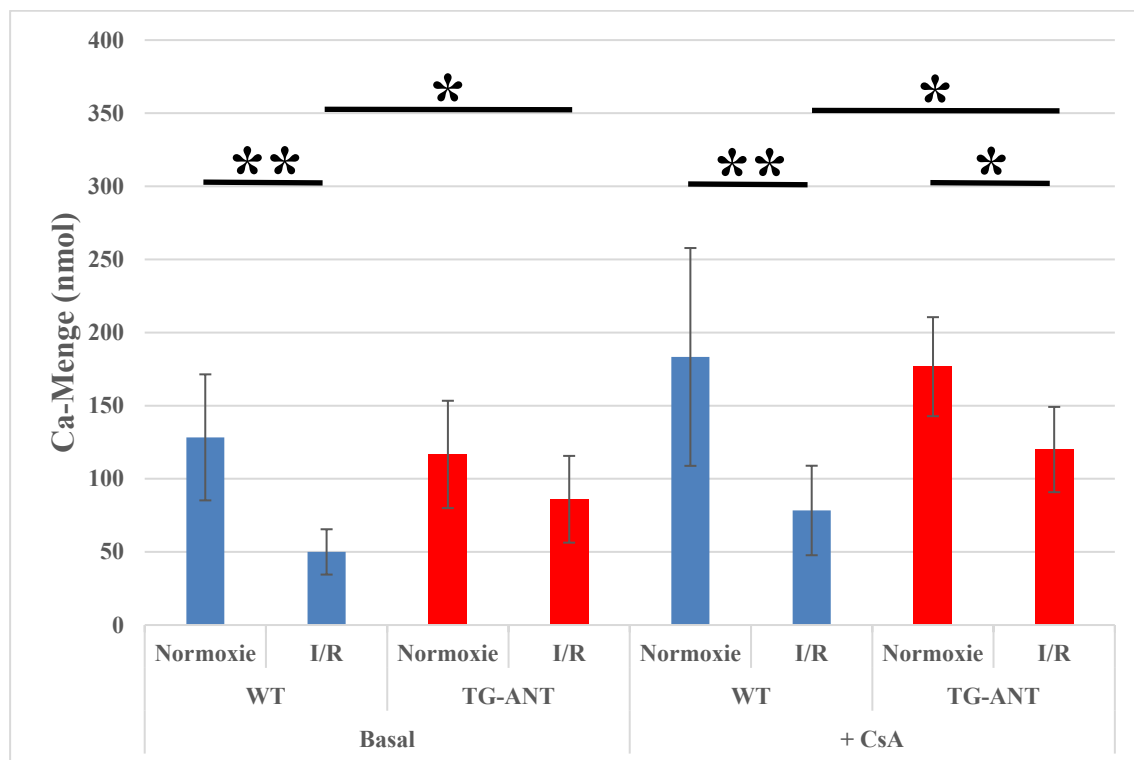


Abbildung 16: Calciumaufnahme: Bei Mitochondrien mit und ohne Überexpression von ANT-1 wurde nach 10 min Stabilitätsphase gefolgt von Normoxie (15 min basale Perfusion) bzw. I/R (45 min Ischämie gefolgt von 120 min Reperfusion) die Menge an Calcium gemessen, bei welcher sich die mPTP öffnet. Auch nach Zugabe von CsA (**Zielkonzentration: $1 \mu\text{mol/l}$**) wurde die Menge bestimmt, bei der es zu einer Porenöffnung kommt. (WT-Normoxie; WT-I/R; TG-ANT-Normoxie)N=6; (TG-ANT-I/R)N=5; *: $p<0,05$; **: $p<0,01$

Nun wird die Normoxie-Gruppe mit der I/R-Gruppe verglichen.

WT-Mitochondrien können nach I/R im Vergleich zur Normoxie signifikant weniger Calcium aufnehmen ($50 \text{ nmol} \pm 15,49$ vs. $128 \text{ nmol} \pm 43,09$, $p<0,01$), (Abbildung 16). So

kommt es nach Ischämie und Reperfusion schneller zu einer Calciumüberladung mit konsekutiver Öffnung der mPTP, was zur Folge hat, dass die Mitochondrien hierdurch früher geschädigt werden. Dadurch werden bei gleichen Calciummengen nach I/R die Mitochondrien auch stärker geschädigt. Ein Hochregulieren vom ANT - 1 ermöglicht es, dass Mitochondrien nach I/R ähnlich viel Calcium aufnehmen können wie bei Normoxie ($116,67 \text{ nmol} \pm 36,7$ vs. $86 \text{ nmol} \pm 29,66$, $p=0,16$), (Abbildung 16). Sowohl bei ANT-1- als auch WT-Herzen kommt es zu signifikanten Unterschieden zwischen Normoxie und I/R, wenn letztgenannten Gruppen mit CsA behandelt werden (WT: $183,33 \text{ nmol} \pm 74,48$ vs. $78,33 \text{ nmol} \pm 30,61$, $p<0,01$; ANT: $176,67 \text{ nmol} \pm 33,86$ vs. $120 \text{ nmol} \pm 29,15$, $p=0,015$), (Abbildung 16).

4.5 Autofluoreszenz

Mit der Autofluoreszenz wird die Menge an NAD(P)H gemessen. Dieses Molekül dient als Elektronenträger, womit in der Atmungskette Energie in Form von ATP gewonnen wird. So soll überprüft werden, inwieweit eine Überexpression vom ANT - 1 die Menge an NAD(P)H nach Ischämie und Reperfusion verändert.

Es werden die einzelnen Messzeitpunkte betrachtet.

Unter basalen Bedingungen weisen die Mitochondrien bei Normoxie signifikant höhere Mengen an NAD(P)H im Vergleich zu I/R auf. Dies gilt sowohl bei der Betrachtung von WT- als auch ANT-Tieren (WT Mito post: $6,02 \text{ a.u.} \pm 1,02$ vs. $2,45 \text{ a.u.} \pm 0,48$, $p<0,01$; ANT Mito post: $5,93 \text{ a.u.} \pm 0,76$ vs. $3,41 \text{ a.u.} \pm 1,15$, $p<0,01$), (Abbildung 17).

Ähnliche signifikante Unterschiede werden auch vor und nach Zugabe von ADP bei beiden Genotypen beobachtet (WT ADP prä: $5,19 \text{ a.u.} \pm 0,79$ vs. $2,29 \text{ a.u.} \pm 0,32$, $p<0,01$; WT ADP post: $4,59 \text{ a.u.} \pm 0,62$ vs. $2,14 \text{ a.u.} \pm 0,39$, $p<0,01$; ANT ADP prä: $5,06 \text{ a.u.} \pm 0,52$ vs. $2,99 \text{ a.u.} \pm 0,95$, $p<0,01$; ANT ADP post: $4,67 \text{ a.u.} \pm 0,48$ vs. $2,78 \text{ a.u.} \pm 0,84$, $p<0,01$), (Abbildung 18).

Auch kann festgestellt werden, dass vor und nach Zugabe von FCCP ebenso ähnliche signifikante Unterschiede bestehen, sowohl innerhalb der WT- als der ANT-Gruppe (WT FCCP prä: $4,62 \text{ a.u.} \pm 0,53$ vs. $2,09 \text{ a.u.} \pm 0,31$, $p<0,01$; WT FCCP post: $4,48 \text{ a.u.} \pm 0,52$ vs. $1,98 \text{ a.u.} \pm 0,28$, $p<0,01$; ANT FCCP prä: $4,65 \text{ a.u.} \pm 0,42$ vs. $2,76 \text{ a.u.} \pm 0,91$, $p<0,01$; ANT FCCP post: $4,32 \text{ a.u.} \pm 0,32$ vs. $2,45 \text{ a.u.} \pm 0,8$, $p<0,01$), (Abbildung 19).

Der direkte Vergleich der WT-Gruppe mit der ANT-Gruppe zeigt zu keinem Messzeitpunkt signifikante Unterschiede.

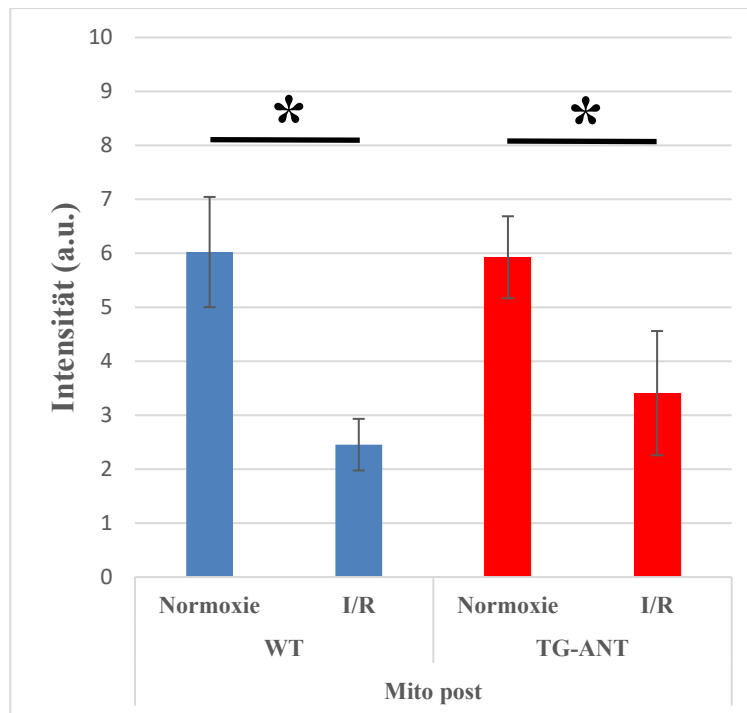


Abbildung 17: Autofluoreszenz basal: Bei unstimulierten Mitochondrien mit und ohne Überexpression von ANT-1 wurde nach 10 min Stabilitätsphase gefolgt von Normoxie (15 min basale Perfusion) bzw. I/R (45 min Ischämie gefolgt von 120 min Reperfusion) die Autofluoreszenz und die damit verbundene Produktion von NAD(P)H gemessen.

(WT-Normoxie; WT-I/R; TG-ANT-Normoxie)N=6; (TG-ANT-I/R)N=5; *: p<0,01

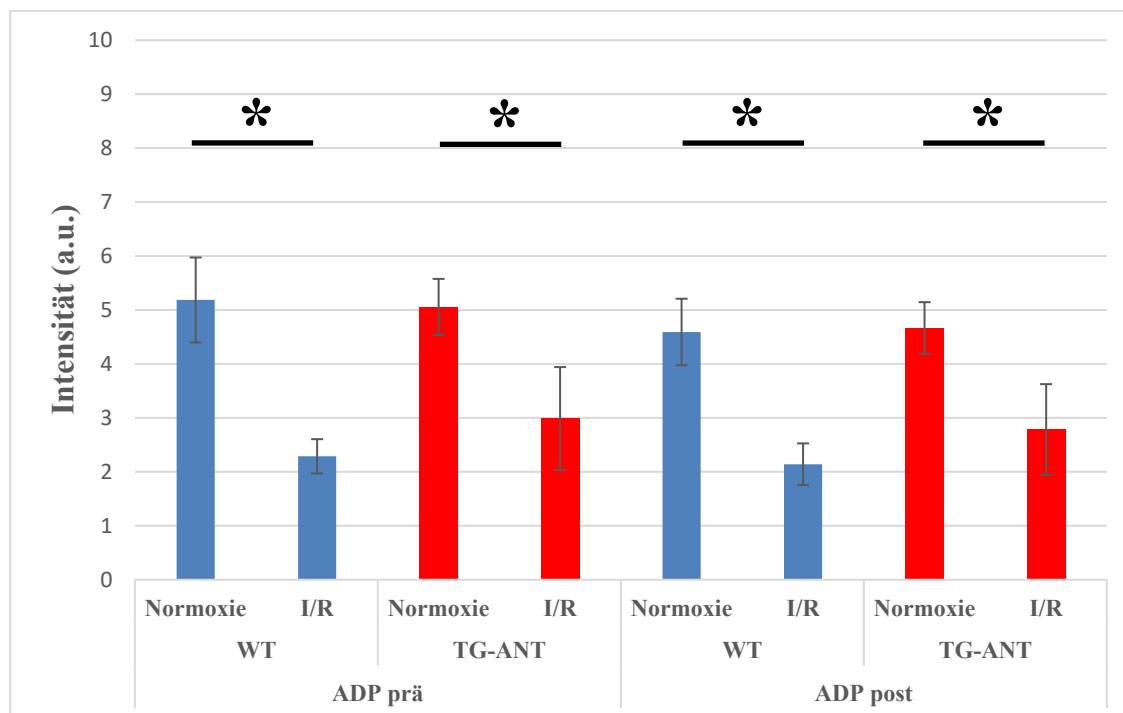


Abbildung 18: Autofluoreszenz unter ADP: Bei mit ADP (Zielkonzentration: 40 $\mu\text{mol/l}$) stimulierte Mitochondrien mit und ohne Überexpression von ANT-1 wurde nach 10 min Stabilitätsphase gefolgt von Normoxie (15 min basale Perfusion) bzw. I/R (45 min Ischämie gefolgt von 120 min Reperfusion) die Autofluoreszenz und die damit verbundene Produktion von NAD(P)H gemessen.

(WT-Normoxie; WT-I/R; TG-ANT-Normoxie)N=6; (TG-ANT-I/R)N=5; *: p<0,01

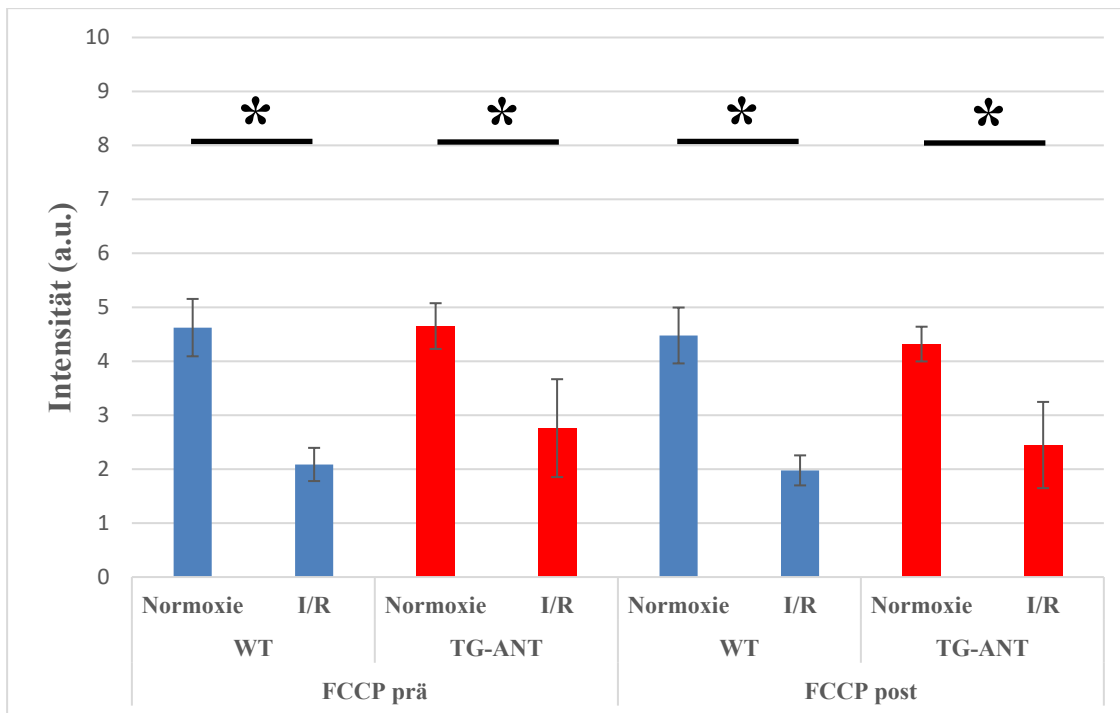


Abbildung 19: Autofluoreszenz unter FCCP: Bei mit FCCP (Zielkonzentration: 100 nmol/l) stimulierte Mitochondrien mit und ohne Überexpression von ANT-1 wurde nach 10 min Stabilitätsphase gefolgt von Normoxie (15 min basale Perfusion) bzw. I/R (45 min Ischämie gefolgt von 120 min Reperfusion) die Autofluoreszenz und die damit verbundene Produktion von NAD(P)H gemessen. (WT-Normoxie; WT-I/R; TG-ANT-Normoxie) N=6; (TG-ANT-I/R) N=5; *: p<0,01

So scheint die Menge an NAD(P)H nach Ischämie und Reperfusion durch eine Überexpression von ANT-1 nicht beeinflusst zu sein.

4.6 Membranpotential

Nach Ischämie und Reperfusion kommt es nach einer Calciumüberladung zu einer Öffnung der mPTP, wodurch das Membranpotential abnimmt. In diesem Kapitel soll überprüft werden, inwiefern eine verstärkte Expression von ANT-1 den Membranpotentialverlust reduzieren bzw. allgemein gesprochen dieses Potential stabilisieren kann.

Bei WT-Mitochondrien (mit ADP stimuliert) ist zwar das Membranpotentialniveau nach I/R niedriger als bei Normoxie, aber diese Differenz ist nicht signifikant ($100\% \pm 14,65$ vs. $71,41\% \pm 1,17$, $p=0,11$), (Abbildung 20). Bei ANT-1-Mitochondrien gleichen sich die bestehenden Membranpotentiale an ($102,99\% \pm 16,62$ vs. $105,66\% \pm 7,43$, $p=0,74$), (Abbildung 20).

Bei Normoxie hat die WT-Gruppe ein ähnliches Membranpotential wie die ANT-Gruppe (Abbildung 20). TG-ANT-Mitochondrien zeigen gegenüber dem WT-Pendant nach I/R ein signifikant stabileres Membranpotential, nachdem diese mit ADP stimuliert wurden ($105,66\% \pm 7,43$ vs. $71,41\% \pm 1,17$, $p=0,018$), (Abbildung 20).

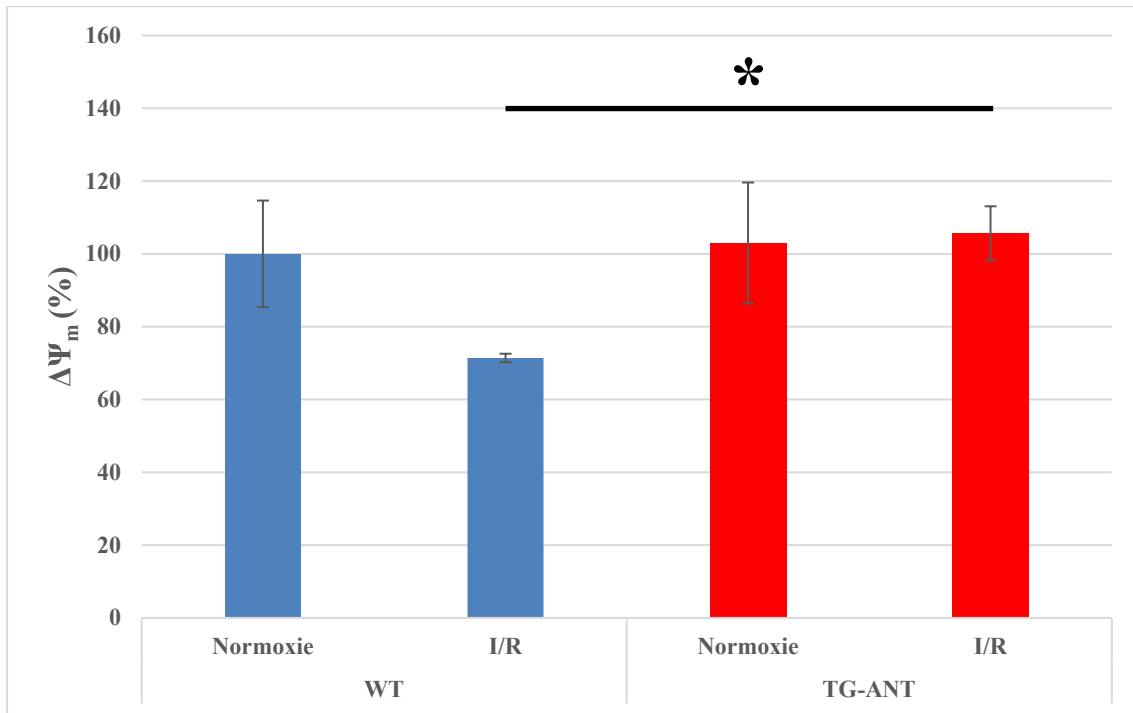


Abbildung 20: Membranpotentialabnahme: Zunächst erfolgte eine 10-minütige Stabilitätsphase, gefolgt entweder von Normoxie (15 min basale Perfusion) bzw. I/R (45 min Ischämie gefolgt von 120 min Reperfusion). Anschließend wurden für alle vier Gruppen jeweils die Abnahme des Membranpotentials nach Zugabe von ADP (Zielkonzentration: $40\ \mu\text{mol/l}$) bestimmt und in Bezug zu der WT-Normoxie-Gruppe gesetzt.

(WT-Normoxie; TG-ANT-Normoxie)N=6; (WT-I/R; TG-ANT-I/R)N=5; *: $p < 0,05$

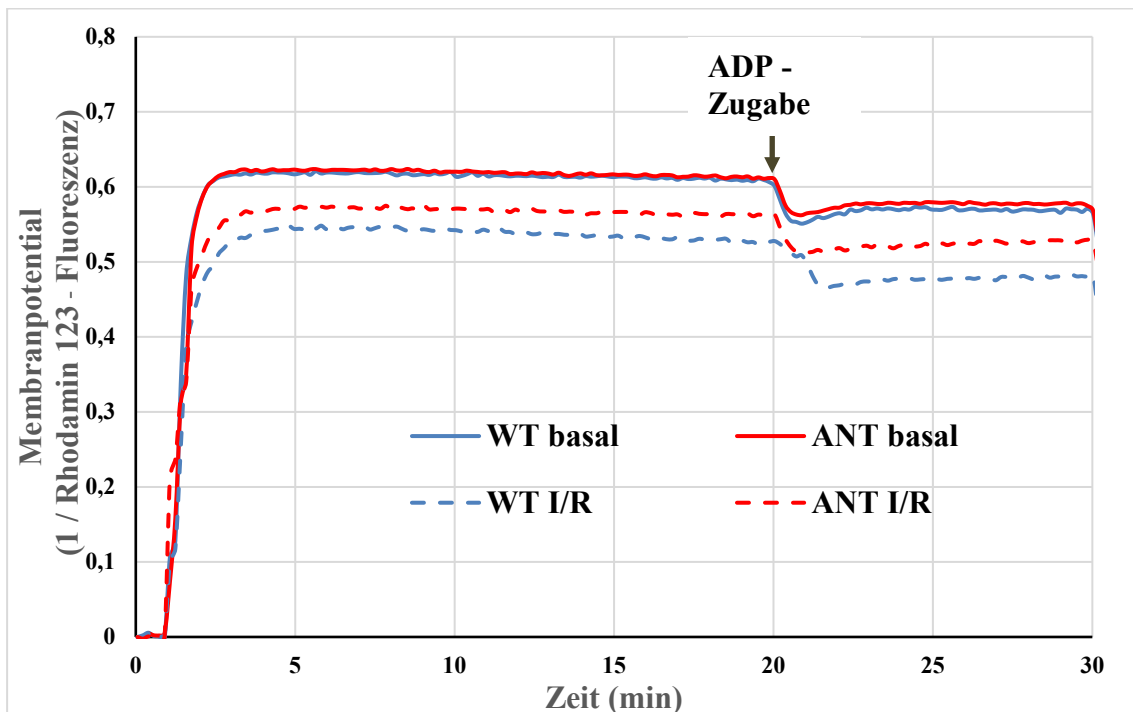


Abbildung 21: Zeitlicher Verlauf des Membranpotential: Zunächst erfolgte eine 10-minütige Stabilitätsphase, gefolgt entweder von Normoxie (15 min basale Perfusion) bzw. I/R (45 min Ischämie gefolgt von 120 min Reperfusion). Anschließend wird der zeitliche Verlauf des Membranpotentials aller vier Gruppen dargestellt und wie er sich nach Zugabe von ADP (Zielkonzentration: $40\ \mu\text{mol/l}$) verändert.

4.7 Amplex Ultra Red Hydrogen Peroxide Peroxidase Assay/ROS-Messung

Ischämie und Reperfusion schädigen Mitochondrien und führen zu vermehrter Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies. Nun soll evaluiert werden, welchen Einfluss eine ANT-1-Überexpression auf die ROS-Produktion hat.

Mitochondrien mit einer ANT-1-Überexpression produzieren sowohl nach Ischämie und Reperfusion als auch bei Normoxie basal ohne jegliche Zusätze signifikant mehr ROS im Gegensatz zum WT-Herz (I/R: 1,34 a.u.±0,43 vs. 0,77 a.u.±0,19, p=0,036; Normoxie: 1,12 a.u.±0,14 vs. 0,84 a.u.±0,2, p=0,019), (Abbildung 22). Innerhalb der WT-Mitochondrien bzw. ANT-Mitochondrien gibt es zwischen Normoxie und I/R keine signifikanten Unterschiede bei der ROS-Produktion unter basalen Bedingungen (Abbildung 22).

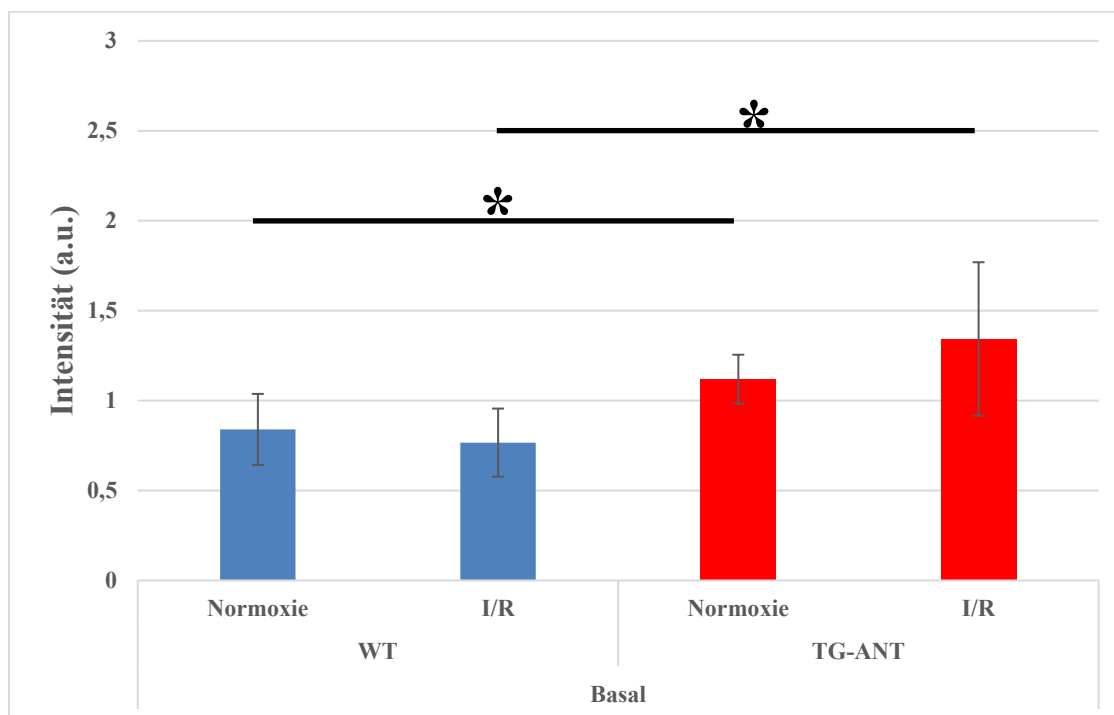


Abbildung 22: ROS-Produktion basal: Bei den Mitochondrien der verschiedenen Gruppen wurde jeweils die gebildete Menge an ROS innerhalb der ersten drei Minuten bestimmt. Zuvor hat nach einer 10-minütigen Stabilitätsphase entweder Normoxie (15 min basale Perfusion) bzw. I/R (45 min Ischämie gefolgt von 120 min Reperfusion) stattgefunden. (WT-Normoxie; WT-I/R; TG-ANT-Normoxie) N=6; (TG-ANT-I/R) N=5; *: p<0,05

Beim Vergleich der Normoxie mit I/R produzieren die Mitochondrien aus dem WT-Herz nach Rotenon-Gabe bei Normoxie signifikant mehr ROS im Vergleich nach I/R (2,67 a.u.±0,35 vs. 1,7 a.u.±0,24, p<0,01), (Abbildung 23). Sobald in beiden Vergleichsgruppen ANT-1 überexprimiert wird, gleicht sich die Produktionsleistung der Mitochondrien, die I/R ausgesetzt waren, der bei Normoxie an (2,93 a.u.±0,27 vs. 2,21 a.u.±0,91, p=0,15), (Abbildung 23).

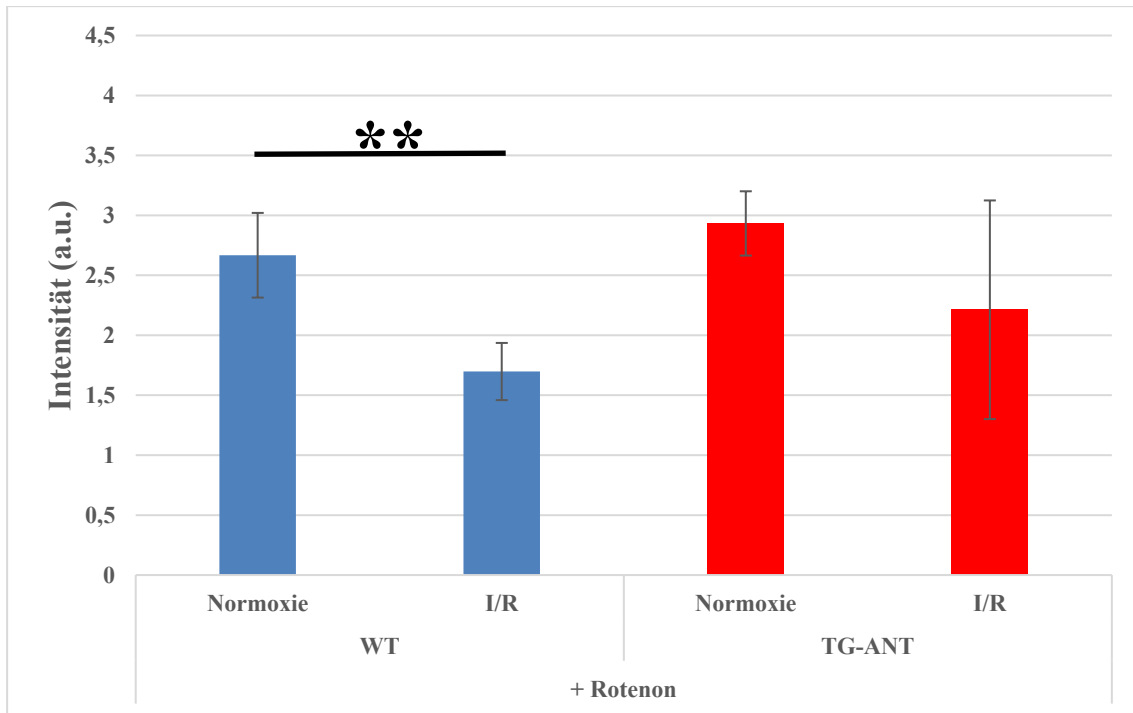


Abbildung 23: ROS-Produktion unter Rotenon: Nach einer 10-minütigen Stabilitätsphase mit anschließender Normoxie (15 min basale Perfusion) bzw. I/R (45 min Ischämie gefolgt von 120 min Reperfusion) wurde Rotenon (**Zielkonzentration: 4 μ mol/l**) hinzugegeben und in den jeweiligen Gruppen die Menge an gebildeten ROS innerhalb der ersten drei Minuten bestimmt. (WT-Normoxie; WT-I/R; TG-ANT-Normoxie)N=6; (TG-ANT-I/R)N=5; **: p<0,01

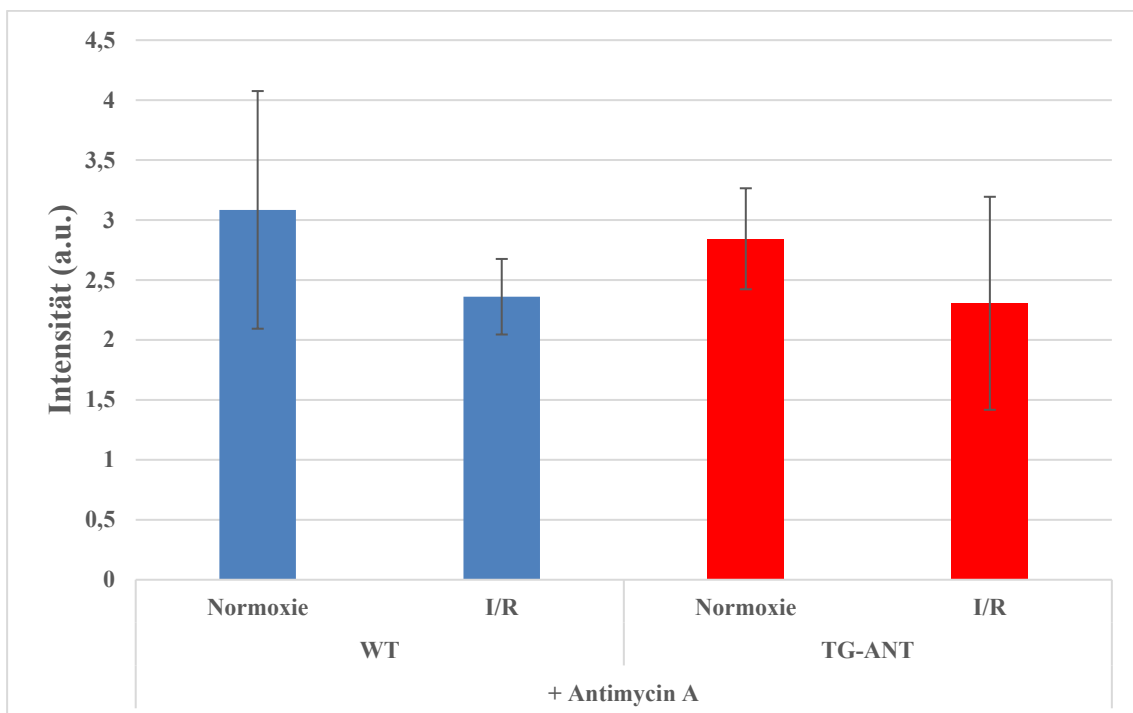


Abbildung 24: ROS-Produktion unter Antimycin A: Nach einer 10-minütigen Stabilitätsphase mit anschließender Normoxie (15 min basale Perfusion) bzw. I/R (45 min Ischämie gefolgt von 120 min Reperfusion) wurde Antimycin A (**Zielkonzentration: 32 mg/l**) hinzugegeben und in den jeweiligen Gruppen die Menge an gebildeten ROS innerhalb der ersten drei Minuten bestimmt. (WT-Normoxie; WT-I/R; TG-ANT-Normoxie)N=6; (TG-ANT-I/R)N=5; **: p<0,01

Bei einer ANT-1-Überexpression zeigt sich eine ähnlich hohe ROS-Produktion nach I/R wie bei Normoxie. Dies gilt sowohl nach der Gabe von Rotenon als auch nach Antimycin A (Abbildung 23, Abbildung 24). Rotenon ist ein Inhibitor von Komplex I und Antimycin A ist ein Inhibitor von Komplex III. Beide Stoffe führen zu einer Erhöhung bzw. Akkumulation von ROS (Georgakopoulos, et al., 2017).

5 Diskussion

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse im Kontext des am Eingang dieser Arbeit beschriebenen Wissensstandes sowie der formulierten Fragestellung interpretiert. Bereits publizierte Arbeiten sollen die Plausibilität dieser Ergebnisse stützen. Zusätzlich werden Daten, welche Widersprüchlichkeiten oder Abweichungen gegenüber der Arbeitshypothese aufweisen, nach ergänzender Recherche erörtert.

5.1 Interpretation der Ergebnisse

Die erhobenen Daten zeigen nach Ischämie und Reperfusion mehrere positive Effekte, wenn ANT-1 überexprimiert wird.

Komplex I und II der Atmungskette zeigen einen Sauerstoffverbrauch nach I/R der dem bei Normoxie ähnlich ist. Sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach ADP-Zugabe ist dieses zu beobachten. Dies trifft für WT-Mitochondrien nicht zu. Nach I/R ist die Funktion beider Komplexe von WT-Mitochondrien signifikant reduziert. Somit erhält die ANT-1-Überexpression die Funktion beider Komplexe während I/R. Dies kann als protektive Eigenschaft angesehen werden. Nach Ischämie und Reperfusion zeigen zwar beide Komplexe von Mitochondrien aus ANT-1-Herzen gegenüber WT-Herzen keine signifikanten Unterschiede, aber es ist ein Trend zu sehen, dass beide Komplexe von Mitochondrien aus ANT-1-Herzen tendenziell einen höheren Sauerstoffverbrauch aufweisen. Die geringere Abnahme des Sauerstoffverbrauchs vom Komplex II nach I/R ist möglicherweise auf eine gesteigerte Funktion von diesem bei ANT-1-Überexpression zurückzuführen (Walther, et al., 2007). Beide Beobachtungen stützen die protektiven Effekte der ANT-1-Überexpression. Dies ist umso entscheidender, da ANT-1 in einem der wichtigsten Regulationsschritte der oxidativen Phosphorylierung involviert ist. ANT-1 kontrolliert die Steady-State-Atmungsraten von Mitochondrien, welche aus normalen bzw. post-ischämischen Herzen isoliert wurden (Borutaité, et al., 1993).

ANT-1-Mitochondrien können im Vergleich zur WT-Gruppe nach I/R signifikant mehr Calcium zurückhalten, bevor es zu einer Öffnung der mPTP kommt, sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach Zugabe von CsA. Zusätzlich findet unter basalen Bedingungen wie bei den Komplexen der Atmungskette nach ANT-1-Überexpression ein Angleichen der aufgenommenen Calciummenge nach I/R an das Niveau bei Normoxie statt. Wenn CsA hinzugegeben wird, öffnet sich die mPTP bei Normoxie im Vergleich zu I/R erst bei signifikant höheren Calciummengen, unabhängig vom Genotyp.

Die letzte Beobachtung erlaubt die Schlussfolgerung, dass ein Mechanismus existieren könnte, über welchen ANT-1 unabhängig von CsA die mPTP modifiziert, wodurch die Sensitivität dieser gegenüber Calcium gesenkt wird. Zumal Untersuchungen existieren, bei welchen das Cyp-D-Gen inaktiviert wurde und es trotzdem zu einer Öffnung der mPTP kam (Basso, et al., 2005; Nakagawa, et al., 2005). So kann bei diesen Ergebnissen festgehalten werden, dass die ANT-1-Überexpression die mPTP gegenüber Calcium desensibilisiert und somit einen protektiven Effekt nach Ischämie und Reperfusion hat. Weil bei der Calcium-Retention-Capacity ANT-1-Mitochondrien im Vergleich zur WT-Gruppe nach I/R signifikant höhere Mengen an Calcium aufnehmen können, kann ebenfalls interpretiert werden, dass bei Komplex I und II der Atmungskette nach I/R die ANT-1-Überexpression verglichen mit der WT-Gruppe zu einer gesteigerten Aktivität führen könnte, was im Einklang mit den zuvor beschriebenen Trends steht. Hohe ATP-Konzentrationen führen zu einer Desensibilisierung der mPTP (Morciano, et al., 2025). So könnte die gesteigerte Aktivität der Komplexe eine Erklärung sein, weshalb bei ANT-1-Überexpression höhere Mengen an Calcium für eine mPTP-Öffnung notwendig sind. Eventuell sind größere Gruppen notwendig, um die geforderte Signifikanz zu erreichen.

Transgene Mitochondrien weisen ein stabileres Membranpotential nach I/R im Vergleich zu den WT-Mitochondrien auf. Dies ist vereinbar mit den Ergebnissen aus der Calcium-Retention-Capacity, in der transgene Mitochondrien signifikant mehr Calcium aufnehmen können. Nach I/R ist das Membranpotential bei transgenen Mitochondrien ähnlich stabil wie während Normoxie, wohingegen es bei WT-Mitochondrien zu einer Abnahme des Membranpotentials nach I/R kommt. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine ANT-1-Überexpression das Membranpotential nach I/R aufrechterhalten kann. Unter normoxischen Bedingungen wird dieses aber nicht über das physiologische Niveau gesteigert.

Zusätzlich produzieren Mitochondrien der ANT-Tiere nach I/R verglichen mit den Wildtyp-Tieren basal mehr radikale Sauerstoffspezies. Dies muss nicht im Widerspruch zur zu Beginn dargelegten Annahme stehen. Da auch bei Normoxie ANT-Tiere signifikant mehr ROS produzieren, kann dies vielmehr als Ausdruck einer erhöhten Aktivität der Atmungskette gewertet werden. So erscheint unter diesem Gesichtspunkt die erhöhte Produktion nach I/R plausibel. Die erhöhte Expression von ANT-1 erhält die Aktivität der Atmungskette. Möglicherweise hat eine genetische Konditionierung durch die Überexpression nach I/R stattgefunden. Darauf deutet der fehlende Unterschied bei der

ROS-Produktion zwischen Normoxie und I/R unter basalen Bedingungen bei den ANT-Gruppen hin. Da geschädigte Mitochondrien tendenziell mehr ROS produzieren, wären nach I/R erhöhte Werte erwartbar, welche aber ausbleiben (Ikeda, et al., 2015). Auch gleicht nach I/R die Überexpression des Translokators die Produktion von ROS (bei inhibiertem Komplex I) an die Menge an, welche bei Normoxie entsteht. Da durch Rotenon Komplex I gehemmt wird, ist der Benefit von ANT-1 bei den Komplexen II und III zu suchen. Und weil es nach Antimycin-A-Gabe – Komplex-III-Inhibitor – keine signifikanten Unterschiede zwischen der Normoxie- und der I/R-Gruppe bei der ROS-Produktion gibt, unabhängig davon ob ANT-1 überexprimiert ist oder nicht, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass ANT-1 vor allem einen protektiven Effekt auf den Komplex III hat. Und wie bereits erwähnt, konnte Walther et al. bei seiner Arbeit zeigen, dass die Überexpression von ANT-1 unter anderem zu einer erhöhten Aktivität von diesem Komplex führt (Walther, et al., 2007).

Gleichzeitig verursachen ROS eine Carbonylierung von Proteinen, ANT mitinbegriffen, was zu einer Einschränkung der Funktion dieser führt. Das carbonylierende Molekül ist unter anderem 4-Hydroxynonenal (HNE), (Chen, et al., 1995; Clarke, et al., 2008; Morciano, et al., 2015; Klumpe, et al., 2016). Dörner et al. konnte zeigen, dass nach I/R WT-Herzen eine signifikant höhere Menge an HNE-modifiziertem ANT-1-Protein aufweisen im Vergleich zur Normoxie. Diese Erhöhung wurde nach ANT-1-Überexpression nicht festgestellt (Dörner, et al., 2021). Weil hierdurch die Menge an nicht-modifiziertem ANT-1 höher ist, ist folglich auch die Funktion der Atmungskette von ANT-1-Herzen im Vergleich zu WT-Herzen weniger eingeschränkt.

Es erscheint paradox, dass parallel zur erhöhten ROS-Produktion von ANT-Tieren nach I/R der basale Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien bei der Respirationsmessung nicht signifikant erhöht ist. Gleiches gilt bei Normoxie. Zusätzlich zur oxidativen Phosphorylierung ist die Acyl-CoA-Dehydrogenase, ein Enzym des Fettsäuremetabolismus, welches ebenfalls in der Mitochondrienmatrix lokalisiert ist, eine weitere Quelle von ROS (Schartl, et al., 2009; Rodrigues, et al., 2012; Dambrova, et al., 2021). Vor allem, wenn letztgenannter Stoffwechselweg nicht mit der oxidativen Phosphorylierung gekoppelt ist, kann es zu einer gesteigerten ROS-Produktion kommen (Dambrova, et al., 2021). Dies wäre eine Erklärung, weshalb eine gesteigerte ROS-Genese transgener Tiere nach I/R nicht von einem gesteigerten Sauerstoffverbrauch der Atmungskette begleitet wird. Weiterhin haben Walther et al. bei ihren Untersuchungen festgestellt, dass obwohl Komplex II bis IV in ihrer Aktivität durch ANT-1 gesteigert werden, aber die

zelluläre Menge an ADP und ATP sich nicht verändert. Diese Arbeitsgruppe folgerte hieraus, dass durch diesen Translokator der Energietransfer beschleunigt wird (Walther, et al., 2007). Carreira et al. vermuten aufgrund ihrer Untersuchungen, bei welchen ischämisch präkonditionierte Rattenherzmitochondrien hinsichtlich der Entkopplung der Atmungskette untersucht wurden, dass die Aktivität von ANT durch die Präkonditionierung gesteigert wird, wodurch diese Entkopplung durch Fettsäuren gefördert wird (Carreira, et al., 2007). Ähnliche Folgewirkungen von ANT-1 wurden bei Mitochondrien aus Skelettmuskelzellen von trainierten Menschen im Vergleich zu untrainierten gefunden (Sparks, et al., 2016). Ergänzend muss hinzugefügt werden, dass die beiden letztgenannten Untersuchungen nur hinweisenden Charakter haben, da Dambrova et al. die funktionelle Trennung der Atmungskette vom Fettstoffwechsel beschreiben, Carreira et al. und Sparks et al. hingegen den Protonenfluss über die innere Mitochondrienmembran unter Umgehung des Komplex V untersucht haben. Auch ist es interessant zu ergründen, wie die Wechselbeziehungen zwischen ANT-1 und dem Fettstoffwechsel sind. Einerseits wird, wie eingangs in dieser Arbeit beschrieben, der Translokator durch Fettsäuren gehemmt. Andererseits scheint von Seiten des Translokators ein Einfluss unklarer Grundlage auf Fettsäuren zu existieren. Und da Fettsäuren normalerweise bei der Energiegewinnung vom Herzen einen Anteil von 50-60% haben, ist hier ein entsprechend großer Fokus vorhanden (Pape, et al., 2019).

Sowohl die Ergebnisse der Membranpotentialmessung als auch die ähnlich hohen ROS-Produktionen bei I/R und Normoxie (bei inhibiertem Komplex I) sind konkordant mit den Ergebnissen beim Sauerstoffverbrauch der Atmungskette und bei der Menge des aufgenommenen Calciums.

Unter basalen Bedingungen, nach ADP-Gabe und nach FCCP-Gabe weisen die Mitochondrien bei Normoxie signifikant höhere Mengen an NAD(P)H im Vergleich zu I/R auf. Dies gilt sowohl bei der Betrachtung von WT - als auch ANT - Tieren. Dies erscheint plausibel, da unter Sauerstoffmangel einerseits die Reserven verbraucht werden und andererseits durch die mangelnde Zufuhr an Substrat kein neues NAD(P)H gebildet werden kann. Die Menge an NAD(P)H im direkten Vergleich von hochreguliertem ANT-1 mit WT zeigt keine signifikanten Unterschiede, unabhängig von der Grundbedingung.

Auf makroskopischer Ebene entsteht nach Ischämie und Reperfusion ein Ödem, welches sich vor allem auf den linken Ventrikel begrenzt und größer ist im Vergleich bei Normoxie. Während dieser Phase herrscht eine gestörte Versorgung der Myokardzellen, wo-

durch es unter anderem zu einer gestörten Homöostase von Elektrolyten kommt, welche einen intrazellulären Fluss von Flüssigkeit bedingen (Morciano, et al., 2015). Die Bildung eines Ödems ist die logische Konsequenz. Dieses Ödem ist jedoch nicht von einem vergrößerten Infarktareal begleitet, wie Dörner et al. bei ihren Untersuchungen feststellen konnten (Dörner, et al., 2021). Auch konnte durch statistische Analysen ausgeschlossen werden, dass die verstärkte Ödembildung auf unterschiedliche Genotypen zurückzuführen wäre. Der Quotienten aus linkem - Ventrikel / Körpergewicht zeigt im ANOVA - Test eine signifikante Wechselwirkung zwischen Genom und Bedingung. Eventuell liegt eine Verzerrung vor, da der Quotient, für welchen die Tibialänge benötigt wird, der zuverlässigere von den Parametern ist und genauso wie das Gewicht des linken Ventrikels beim ANOVA - Test bezüglich Wechselwirkung keine Signifikanz zeigt (Tiemann, et al., 2003).

5.2 Beurteilung des Ischämie - Reperfusion - Modells

Bei in dieser Arbeit durchgeführten Langendorff - Versuchen handelt es sich um eine In-vitro - Methode. Werden die Herzen aus dem Organismus entnommen und unter artifizialen Bedingungen untersucht, geht ein Teil der Vorgänge, welche im Gesamtorganismus während und nach I/R stattfinden, verloren. Dies kann aber auch als Vorteil gesehen werden, da neurohumorale Effekte und die Effekte der Innervation durch den Sympathikus und Parasympathikus ausgeschlossen werden können, wodurch ausschließlich die Reaktion des Herzens untersucht werden kann (Sutherland, et al., 2000). Außerdem existiert für Langendorff - Messungen an Rattenherzen die meiste Expertise (Sutherland, et al., 2000). Gegenüber In - vivo - Versuchen, bei welchen operativ die linke Koronarie ligiert wird, besteht der große Vorteil, dass das Herz direkt beobachtet werden kann und bei etwaigen Rhythmusstörungen oder Stillstand interveniert werden kann (Sutherland, et al., 2000). Ligaturen einer Koronarie weisen eine tatsächliche Okklusion auf, wohingegen bei der Langendorff - Methode nur der Blutfluss sistiert. Nichtsdestotrotz findet bei beiden Methoden keine Koronarperfusion mehr statt. Beide Modelle scheinen eine ähnliche zeitliche Limitierung zu besitzen. So kommt es binnen 20 bis 24 Stunden zum kompletten Versagen des Herzens (Sutherland, et al., 2000). Die Langendorff - Methode erlaubt ein sehr hohes Maß an Standardisierung (Lindsey, et al., 2018). Bei der Ligatur der Koronarie gibt es mehrere Varianten. Entweder ist diese permanent oder es folgt ein anschließendes Entfernen. Außerdem kann die Höhe der Ligatur variiert werden (De Villiers, et al., 2020). Das Wiedereröffnen spiegelt Ischämie und Reperfusion wider,

wohingegen bei permanenter Ligation Unterschiede bei Infarktgrößen leichter festgestellt werden können (De Villiers, et al., 2020). Die verschiedenen Varianten der Ligation werden vor allem dazu genutzt, um Langzeitfolgen wie Narbenbildung, Remodeling oder Neovaskularisierung zu beurteilen (Lindsey, et al., 2018).

Bei Langendorff-Messungen findet eine retrograde Perfusion statt, wodurch von einer veränderten Mechanik des Herzens ausgegangen werden muss. Es muss festgehalten werden, dass während der durchgeführten Ischämie Scherkräfte fehlen, die wiederum bei der ausschließlichen Reperfusion in der Vergleichsgruppe vorhanden sind. Wäre ein Fluss innerhalb der Ventrikel während der Ischämie vorhanden – in vivo gegeben –, würde dies die Wandspannung erhöhen, was NO in den Koronarien freisetzen könnte mit konsekutiver Dilatation und dadurch in vivo die Ischämie abschwächen (Davies, 1995). Das bei den Versuchen verwendete Perfusat rezirkuliert im Gegensatz zum Blut nicht und schwämmt kontinuierlich die aus dem Herzen freigesetzten Mediatoren aus, wodurch von einem veränderten Verhalten des Herzens auf makroskopischer und molekularer Ebene ausgegangen werden muss. Als Beispiel wäre hier das Heat Shock Protein 27 (HSP27) zu nennen, welches in infarzierten Arealen das Membranpotential stabilisiert und Caspase 3 und 7 inhibiert (Chen, et al., 2023). Im Umkehrschluss muss davon ausgegangen werden, dass aus dieser Arbeit gezogene Schlüsse nicht vollends auf weiterführende In-vivo-Versuche übertragen werden können.

Nachteilig wirkt sich auch die fehlende Biokinetik bei isoliert betrachteten Organen aus, weshalb es zu Fehlinterpretationen bei den erhobenen Daten kommen kann (Saeidnia, et al., 2015). Als vorteilhaft kann angesehen werden, dass mögliche Störfaktoren bei In-vitro-Versuchen eliminiert werden, wodurch in dieser Arbeit vorrangig die Effekte der ANT-1-Überexpression festgehalten wurden. So kann davon ausgegangen werden, dass diese Überexpression synergistische Effekte mit den Reaktionen des Organismus – als Beispiel seien intrazelluläre oder interzelluläre Reaktionen genannt – generieren.

Abschließend wird erörtert, warum das Langendorff-Modell gewählt wurde, um Ischämie und Reperfusion zu simulieren. Wie bereits beschrieben, beträgt der Anteil der Reperfusion am finalen Infarktareal bis zu 50% (Ong, et al., 2015). Die Fragestellung dieser Arbeit befasst sich damit, ob eine ANT-1-Überexpression einen protektiven Benefit nach I/R aufweist. Würde nur Ischämie simuliert werden, wäre bis zu Hälfte der Pathologie unberücksichtigt geblieben. Es wurden vor allem mitochondriale Teilaspekte untersucht, weshalb keine Ligatur-Verfahren angewendet wurde. Beim Langendorff-Verfahren kann die Dauer der Ischämie und Reperfusion separat eingestellt werden. Sowohl

die Ischämie als auch die Reperfusion bei diesem Verfahren führen unabhängig voneinander zu einer Infarzierung des Herzens (Rossello, et al., 2016). Je länger die Ischämie dauert, desto größer wird das Infarktareal (Rossello, et al., 2016). Um eine ausreichende Infarktgröße zwecks signifikanter Unterschiede zu generieren, wurde eine Ischämiedauer von 45 min gewählt. Während der Reperfusion kommt es bei Ratten zu zwei verschiedenen Zeitpunkten zum Reperfusionsschaden, einmal zwischen 2 und 20 min und einmal zwischen 30 und 120 min (Povlsen, et al., 2014; Rossello, et al., 2016). Damit der gesamte Reperfusionsschaden bei den späteren Untersuchungen berücksichtigt wird, wurde eine Reperfusionsdauer von 120 min gewählt.

5.3 Mögliche Benefits für den Menschen

Beim Menschen ist das Ziel der Koronarrekatheterisierung, die Infarktgröße zu begrenzen. So könnte eine Überexpression von ANT-1 beim Menschen vor allem nach der Rekanalisierung zu einer Reduktion der Infarktgröße führen, indem es unter anderem die mPTP gegenüber Calcium – Akkumulation während Ischämie – desensibilisiert und es nicht oder nur zu einer verzögerten Öffnung mit apoptotischen Konsequenzen kommt. Wie bereits durch Dörner et al. gezeigt, ist zumindest bei Ratten die Infarktgröße trotz Überexpression nicht signifikant verändert (Dörner, et al., 2021). Weil aber die gleiche Arbeitsgruppe auch feststellen konnte, dass ANT-1 - Herzen im Vergleich zu WT - Herzen einen niedrigeren diastolischen Blutdruck haben – Koronarperfusion findet während der Diastole statt – sowie die Ergebnisse von Walther et al., bei denen diese Überexpression vor Apoptose, bedingt durch eine Renin-Überexpression, schützt, kann angenommen werden, dass die ANT-1-Überexpression zu einer Minderung des Infarktareals führt (Walther, et al., 2007; Dörner, et al., 2021). Eventuell ist es methodenbedingt zu einem Verlust von protektiven Faktoren wie dem HSP27 gekommen (Chen, et al., 2023). Weiterhin besteht bei ANT-1-Überexpression eine erhaltene Funktion der Atmungskette mit einem stabileren Membranpotential sowie einer niedrigeren Sensitivität der mPTP gegenüber Calcium. Das sind starke Indikatoren, dass auch auf subzellulärer Ebene eine verbesserte funktionelle Integrität gegeben ist.

Zwei Limitationen sind bei dieser Arbeit zu nennen. Es wurden Ratten als Spezies genutzt und es handelt sich um einen In-vitro-Aufbau. Beim Infarkt selber kommt es zur Freisetzung diverser Zytokine, welche in weiteren Kardiomyozyten die Apoptose induzieren können (Mahtta, et al., 2020). Beim Langendorff-Versuchsaufbau werden diese Zytokine entfernt. Auch das in vivo begrenzende Perikard fehlt bei dieser Versuchsan-

ordnung. In dieser Arbeit kam es nach I/R zu einer Gewichtszunahme des Herzens von 29 bis 38 %, was auf eine Ödembildung zurückzuführen ist. Das menschliche Herz wiegt zwischen 250 und 300 g und 150 bis 200 ml an akuter Akkumulation von Perikardflüssigkeit können zu hämodynamisch relevanten Einschränkungen führen (Lorentz, 1931; Ball, et al., 1997). Gesunde quergestreifte Muskulatur weist eine durchschnittliche Dichte von $1,06 \text{ g/cm}^3$ auf (Leonard, et al., 2021). In Analogie zur Gewichtszunahme bei den Rattenherzen würde der beschriebene Perikarderguss bei einem 300 g Herz zu einer Gewichtszunahme von 53 bis 71 % führen. Wenn zusätzlich noch angenommen wird, dass ödematöses Gewebe eine tendenziell erniedrigte Dichte aufweist, sowie dass bei Menschen mit Herzinfarkt auch eine Herzhypertrophie angenommen werden kann, nähert sich die prozentuale Zunahme beim Menschen der bei Ratten an (Herold, 2015). Bei einem 350 g schweren Herzen würde ein 150 ml Perikarderguss (Dichte von 1 g/cm^3) bereits eine Zunahme von 43 % entsprechen. Diese Volumenzunahme ist von erhöhtem intraperikardialen Druck begleitet, was zur Folge hat, dass das Schlagvolumen geringer wird, wodurch auch die Perfusion der Koronarien eingeschränkt wird (Ball, et al., 1997). Die verwendeten Tiere hatten keine KHK. Dies ist insoweit relevant, da bei Menschen mit einem stattgehabten Herzinfarkt diese Erkrankung regelhaft vorrausgeht und stenosierte Koronarien unter Ischämie zu vermehrter Stenosierung neigen (Sambuceti, et al., 1997). Zusätzlich haben diverse weitere Pathologien einen negativen Einfluss. Myokardhypertrophie – unter anderem durch höheren Sauerstoffverbrauch und niedrigeren Kapillarfluss –, Hyperlipidämie – unter anderem durch mikrovaskuläre Dysfunktion –, Typ II Diabetes, Vorhofflimmern – unter anderem durch Sympathikusaktivierung, erniedrigten Koronarfluss und endotheale Dysfunktion – und chronische Nierenerkrankungen führen zu ischämischer Intoleranz und schränken Anpassungen an Ischämien ein und führen zu einer höheren Anfälligkeit bzw. zu einer niedrigeren Toleranz gegenüber dem I/R-Schaden und zu Verstärkung von diesem (Ferdinandy, et al., 2023). Die ersten drei genannten Pathologien stören ebenfalls kardioprotektive Signalkaskaden (Ferdinandy, et al., 2023). Die aufgeführten Mechanismen können das Infarktareal vergrößern. So wäre es denkbar, dass im primär betroffenen ischämischen Areal die ANT-1-Überexpression die Reduktion des Infarktareales nicht vermag, aber in sekundär betroffenen Bereichen protektive Effekte hat. Diese Vermutung beruht auf den Ergebnissen von Dörner et al., bei denen nach I/R im Vergleich zu Normoxie nur WT-Mitochondrien eine signifikant erhöhte Aktivität von Caspase 3 hatten, ANT-1-Mitochondrien hingegen aber nicht (Dörner, et al., 2021). Denkbar wäre ein Schutz vor

Apoptoseinduktion – bedingt durch die besagten Zytokine – in Arealen mit weiteren stenosierten Gefäßen, die nicht von einer thrombotischen Okklusion betroffen sind. Klumpe et al. nutzten einen Versuchsaufbau, bei dem in vivo bei Ratten der Ramus interventrikularis anterior ligiert wurde. Hierbei führte die ANT-1-Überexpression zu einem kleineren Infarktareal im Vergleich zu der WT-Gruppe (Klumpe, et al., 2016). Diese Untersuchung zeigt, dass Faktoren, welche in vivo vorhanden sind, bei dieser In-vitro-Arbeit verloren gegangen sind. Yergöz et al. konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass die ANT-1-Überexpression ein anti-inflammatorisches Zytokinmuster fördert. Wurden mit diesem anti-inflammatorischen-Zytokin-Sekretom hypoxische WT-Kardiomyozyten aus Ratten behandelt, zeigten diese Zellen eine höhere Lebensfähigkeit (Yergöz, et al., 2021). Diese wurde mit Hilfe des Gesamt-ATPs gemessen. Des Weiteren wurde festgestellt, dass bei diesen ANT-Tieren die enddiastolischen Füllungsdrücke geringer waren, was als Begrenzung der Fibrosierung im Rahmen des Remodeling gewertet werden kann. Dies kann dadurch gestützt werden, dass ebenso festgestellt wurde, dass in isolierten Kardiomyozyten mit ANT-1-Überexpression die Menge an TGF- β -Subtypen-mRNS im Vergleich zur WT-Gruppe erniedrigt war (Yergöz, et al., 2021). TGF- β 1 ist ein wichtiger Mediator, welcher beim Herzen zum Remodeling führt (Williams, 2001). Der Blutfluss in den Koronarien findet vorwiegend während der Diastole statt. Deshalb wird die wichtige Bedeutung einer guten diastolischen Funktion für die Versorgung der Kardiomyozyten ersichtlich (Herold, 2015).

Da eine Präkonditionierung genutzt werden kann, um die Energiebereitstellung einer Zelle und die Resistenz der mPTP gegenüber Calcium nach I/R zu verbessern, so kann die ANT-1-Überexpression als genetische Modifikation angesehen werden, die ähnliche Effekte aufweist. Die Herangehensweise und die involvierten Mechanismen sind sicherlich verschieden, aber beide Methoden könnten somit genutzt werden, um die Größe des entstehenden Infarktes zu begrenzen.

5.4 Klinischer Ausblick

Durch Präkonditionierung wird die Menge an ANT-Protein und die Mitochondrienfunktion, gemessen anhand des Sauerstoffverbrauchs der untersuchten Ratten, nach I/R gesteigert (Yabe, et al., 1997). Ebenso kann in dieser Arbeit durch eine künstlichen Überexpression von ANT-1 ein Benefit unter anderem beim Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien und der Sensitivität der mPTP gegenüber Calcium festgehalten werden. So könnte durch die Aufrechterhaltung der Expression von ANT-1 während der Reka-

nalisierung eines Herzkranzgefäßes eine neue therapeutische Option entstehen, um die Funktion des Herzens nach einem Myokardinfarkt aufrechtzuerhalten.

Im weiteren Ausblick könnten zwei Strategien angewendet werden, um bei Risikogruppen die Ischämie- und Reperfusionstoleranz beim Herzen während eines Infarktes zu erhöhen. Eine ist bereits etabliert und sollte weiterhin konsequent umgesetzt werden. Hierbei handelt es sich um die Optimierung des Fettstoffwechsels unter anderem mit Statinen (Rittger, et al., 2022). Wie bereits festgehalten, führen Dyslipidämien zu einer Störung vom ANT (Woldegiorgis, et al., 1981; Dörner, et al., 2007). So könnten bereits vor einem Infarkt günstige Bedingungen geschaffen werden, bei welchen die Energiebereitstellung der Zellen auf ischämische Ereignisse präkonditioniert wird.

Die andere Strategie wäre es, gezielt Induktoren von ANT-1 zu entwickeln, welche bereits präklinisch in der rettungsdienstlichen Versorgung angewendet werden, um die Folgen des Reperfusionsschaden bei der Rekanalisierung abzumildern.

Nach ausführlichen Studienrecherche über PubMed und Google Scholar konnte kein etablierter Induktor vom ANT-1 gefunden werden. Nichtsdestotrotz gibt es indirekte Hinweise, dass Inhibitoren des Tumornekrosefaktor-alpha (TNF α) diese Funktion erfüllen könnten. So konnte in einer Studie gezeigt werden, dass durch die Inhibition vom nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF- κ B), welcher durch TNF α aktiviert wird, die Transkription von ANT-1 gesteigert wurde (Beg, et al., 1993; Zhang, et al., 2017). Bei weiterer Recherche konnten zwei Studien identifiziert werden, bei welchen der Einsatz von TNF α -Inhibitoren zu einer Reduktion der Infarktgröße führte (Pei, et al., 2015; Livia, et al., 2024). Weitere Untersuchungen sollten angestrebt werden, ob diese bereits etablierte Medikamentenklasse auch für die Behandlung des I/R-Schadens nutzbar gemacht bzw. als Sekundärprophylaxe nach stattgehabtem Herzinfarkt genutzt werden kann.

6 Zusammenfassung

6.1 Deutsch

Der Herzinfarkt steht an vierter Stelle der häufigsten Todesursachen in Deutschland im Jahr 2022. Die perkutane Koronarintervention stellt das Mittel der Wahl dar, um verschlossene Koronarien wieder zu eröffnen. Paradoxerweise trägt die nachfolgende Reperfusion zur Infarktgröße bei, sogenannter Ischämie-Reperfusionsschaden (I/R-Schaden).

Der Adenin-Nukleotid-Translokator-1 (ANT-1) ist ein Transporter, welcher überwiegend im Herzen exprimiert wird und den Austausch von ATP und ADP an der inneren Mitochondrienmembran ermöglicht. Des Weiteren ist ANT-1 einer der wichtigsten Regulatoren der mitochondrialen Permeability Transition Pore (mPTP) und die Öffnung dieser ist das zentrale Ereignis, welches zum Schaden nach Reperfusion führt. Während I/R ist ANT-1 herunterreguliert, aber bereits existierende Arbeiten konnten zeigen, dass eine Überexpression von ANT-1 kardioprotektive Wirkungen aufweist.

Ziel dieser Arbeit war es zu überprüfen, ob bei Ratten eine herzspezifische Überexpression von ANT-1 (TG-ANT) im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (WT) zur Protektion von Mitochondrien und damit des Herzens nach I/R führt.

I/R am Herzen wurde mit Hilfe der Langendorff-Messung simuliert. Hiernach wurden die Effekte von WT und TG-ANT an isolierte Herzmitochondrien anhand von Sauerstoffverbrauch, Calcium-Retention-Capacity, Membranpotentialmessung, NAD(P)H-Menge und ROS-Produktion gemessen.

Im Vergleich zu WT, bei denen der Sauerstoffverbrauch nach I/R abnahm, zeigten Mitochondrien aus TG-ANT-Heuten nach I/R einen ähnlich hohen Sauerstoffverbrauch bei Komplex I und II wie bei Normoxie. TG-ANT-Mitochondrien konnten nach I/R mehr Calcium aufnehmen, bevor es zu einer Öffnung der mPTP kam, auch war das Membranpotential stabiler nach I/R im Vergleich zu WT. Die ROS-Produktion war nach I/R bei TG-ANT-Mitochondrien höher im Vergleich zu WT. Makroskopisch kam es nach I/R zu einer Ödembildung im Herzen, welche sich vor allem auf den linken Ventrikel begrenzte. Dies war unabhängig vom Genom.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine Überexpression von ANT-1 in Rattenherzen nach Ischämie und Reperfusion protektive Effekte aufweist, die sich in einer erhaltenen Funktion der Atmungskette, sowie stabileren Membranpotential und einer niedrigeren Sensitivität der mPTP gegenüber Calcium äußern.

6.2 English

Myocardial infarction is the fourth leading cause of death in Germany in the year 2022. The percutaneous coronary intervention is the first-line therapy for opening occluded coronary vessels. Paradoxically the subsequent reperfusion contributes to the increase of the infarction size, so-called ischemia-reperfusion-injury (I/R-injury).

The adenine-nucleotide-translocator-1 (ANT-1) is a transporter which is predominantly expressed in the heart and facilitates the exchange of ATP and ADP across the inner mitochondrial membrane. Furthermore ANT-1 is one of the most important regulators of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) and its opening is the central event which leads to the injury after reperfusion. During I/R ANT-1 is downregulated but recent studies showed that overexpression of ANT-1 has cardioprotective effects.

The aim of this study was to investigate whether there is protection of the mitochondria and the heart after I/R by heart-specific overexpressing of ANT-1 (TG-ANT) in rats compared to wild-type animals (WT).

I/R in hearts was simulated by the Langendorff-method. The impact of I/R on WT and TG-ANT in isolated mitochondria were measured by oxygen consumption, calcium retention capacity, decrease of the membrane potential, amount of NAD(P)H and ROS production.

In mitochondria from TG-ANT hearts compared to WT complex I and II showed similar oxygen consumption after I/R compared to normoxia. TG-ANT mitochondria were able to take up more calcium after I/R before mPTP opened. In addition, after I/R the membrane potential was more stable compared to WT. The ROS production of TG-ANT mitochondria was higher compared to WT after I/R. Macroscopically the hearts developed an oedema after I/R. This oedema was limited to the left ventricle. The development was independent from the genome.

In summary, overexpression of ANT-1 in rat hearts provides protection after ischemia and reperfusion. This is due to a preserved function of the respiratory chain, a stable membrane potential and a lower sensitivity of the mPTP to calcium.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau Mitochondrium.....	3
Abbildung 2: Strukturen der oxidativen Phosphorylierung	5
Abbildung 3: Aufbau mitochondriale Permeability Transitions Pore.....	17
Abbildung 4: Langendorff-Apparatur (Übersicht)	27
Abbildung 5: Langendorff-Apparatur (Detailansicht).....	28
Abbildung 6: Strathkelvin-Messkammer für Respirationmessung.....	33
Abbildung 7: Schema vom Tauschprinzip - Respirationmessung.....	35
Abbildung 8: Auswertungsschema für Respirationmessung.....	47
Abbildung 9: Calcium-Retention - Capacity.....	48
Abbildung 10: Peak-Formen bei Calcium-Retention - Capacity	48
Abbildung 11: Autofluoreszenz - Messzeitpunkte.....	50
Abbildung 12: Membranpotential - Messzeitpunkte.....	51
Abbildung 13: Expression ANT-1 - mRNA	55
Abbildung 14: Respiration Komplex I.....	59
Abbildung 15: Respiration Komplex II.....	60
Abbildung 16: Calciumaufnahme	61
Abbildung 17: Autofluoreszenz basal	63
Abbildung 18: Autofluoreszenz unter ADP	63
Abbildung 19: Autofluoreszenz unter FCCP	64
Abbildung 20: Membranpotentialabnahme.....	65
Abbildung 21: Zeitlicher Verlauf des Membranpotential	65
Abbildung 22: ROS-Produktion basal.....	66
Abbildung 23: ROS-Produktion unter Rotenon	67
Abbildung 24: ROS-Produktion unter Antimycin A.....	67

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Probenzusammensetzung für Proteinbestimmung	31
Tabelle 2: Standardreihe.....	32
Tabelle 3: Ablauf Respirationsmessung.....	34
Tabelle 4: Zusammensetzung Calcium - Retention - Capacity	36
Tabelle 5: Ablauf Autofluoreszenz- und Membranpotentialmessung	37
Tabelle 6: DNS - PCR - Zusammensetzung.....	39
Tabelle 7: DNS - PCR - Schema.....	40
Tabelle 8: RNS - Probenzusammensetzung für die cDNS - Herstellung.....	43
Tabelle 9: Zusammensetzung Reverse Transkriptase Komposit für cDNS - Herstellung	43
Tabelle 10: Einstellungen für cDNS - Herstellung	43
Tabelle 11: Zusammensetzung Real - Time - PCR.....	44
Tabelle 12: Einstellungen Real - Time - PCR.....	44
Tabelle 13: Annealing - Temperatur	45
Tabelle 14: Auswertungsschema Respirationsmessung.....	46
Tabelle 15: Biometrie des Gesamtherzens	57
Tabelle 16: Biometrie des Gesamtherzens – Statistische Ergänzungen zu Tabelle 15...57	
Tabelle 17: Biometrie des linken Ventrikels.....	58
Tabelle 18: Biometrie des linken Ventrikels – Statistische Ergänzungen zu Tabelle 1758	
Tabelle 19: Pufferzusammensetzungen für die Funktionsmessungen der Mitochondrien.....	xxii

Abkürzungsverzeichnis

A	-	Ampere
ADP	-	Adenosindiphosphat
AMP	-	Adenosinmonophosphat
ANT	-	Adenin Nukleotid Translokator; ADP/ATP-Translokator
Aqua dest.	-	Destilliertes Wasser
Aqua bidest.	-	Zweifach destilliertes Wasser
ASC	-	Ascorbat
ATP	-	Adenosintriphosphat
a.u.	-	Arbitrary unit (willkürliche Einheit)
Bax	-	Bcl-2-like Protein 4
Bcl-2	-	B-cell lymphoma 2
bp	-	Basenpaare
BSA	-	Bovines Serumalbumin
bzw.	-	beziehungsweise
B2M	-	Beta-2-Mikroglobulin
ca.	-	circa
Ca	-	Calcium
CaCl ₂	-	Calciumchlorid
cDNS	-	complementary (komplementäre) DNS
cm	-	Zentimeter
cm ³	-	Kubikzentimeter
CO ₂	-	Kohlenstoffdioxid
COX5A	-	Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheit 5a
CsA	-	Cyclosporin A
C _t	-	Cycle Threshold (Zyklusschwelle)
dest. H ₂ O	-	Destilliertes Wasser
dm ³	-	Kubik-Dezimeter
DMSO	-	Dimethylsulfoxid
DNS	-	Desoxyribonukleinsäure
Drp-1	-	Dynamin-related Protein 1
EDTA	-	Ethylendiamintetraessigsäure

EGTA	-	Ethylenglycol - bis (aminoethylether) - N, N, N', N' - tetraessigsäure
FAD ⁺ /FADH ₂	-	Flavin - Adenin - Dinukleotid
FCCP	-	Carbonyl Zyanid - 4 - (trifluoromethoxy) - phenylhydrazin
g	-	Gramm
G	-	Gravitation (Erdbeschleunigung)
GAPDH	-	Glycerinaldehyd - 3 - phosphat - Dehydrogenase
GB	-	Giga - Byte
GHz	-	Giga - Hertz
Glu	-	Glutamat
HIF - 1	-	Hypoxie - induzierter Faktor 1
HNE	-	4 - Hydroxynonenal
HPLC	-	High performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HPRT	-	Hypoxanthin - Phosphoribosyl - Transferase
HRP	-	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
HSP27	-	Heat Shock Protein 27
H ₂ O	-	Wasser
IFM	-	Interfibrilläres Mitochondrium
I/R	-	Ischämie/Reperfusion
ISO	-	International Organization for Standardization
KCl	-	Kaliumchlorid
kDa	-	Kilo - Dalton
kg	-	Kilogramm
KHK	-	Koronare Herzkrankheit
KH ₂ PO ₄	-	Kaliumdihydrogenphosphat
kNm	-	Kilo - Newton - Meter
l	-	Liter
LDH	-	Laktatdehydrogenase
li.	-	links
mA	-	Milli - Ampere
Mal	-	Malat
max.	-	maximal

MB	-	Mega - Byte
MEK	-	Methylethylketon
mg	-	Milligramm
MgCl ₂	-	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	-	Magnesiumsulfat
MHz	-	Mega - Hertz
min	-	Minute
ml	-	Milliliter
mm	-	Millimeter
mmHg	-	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	-	Millimol
MOPS	-	3 - (N - Morpholino) propansulfonsäure
mPTP	-	Mitochondrial Permeability Transition Pore
ms	-	Millisekunde
N	-	Gruppegröße
Na	-	Natrium
NaCl	-	Natriumchlorid
NAD ⁺ /NADH+H ⁺	-	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP ⁺ /NADPH+H ⁺	-	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaHCO ₃	-	Natriumhydrogencarbonat
NCX	-	Natrium - Calcium - Exchanger (Natrium - Calcium - Austauscher)
NF - κB	-	Nuclear factor 'kappa - light - chain - enhancer' of activated B - cells
ng	-	Nanogramm
nm	-	Nanometer
Nm	-	Newton - Meter
nmol	-	Nanomol
NO	-	Stickstoffmonoxid
Nr.	-	Nummer
N ₂	-	Stickstoff
O ₂	-	Sauerstoff
p	-	Probabilitas (Signifikanzwert)
p.a.	-	pro analysi

PBS	-	Phosphate Buffered Saline
PGC-1 α	-	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 - alpha
PCR	-	Polymerase Chain Reaction (Polymerase - Kettenreaktion)
PDHA1	-	Pyruvatdehydrogenase alpha 1
pH	-	Potentia Hydrogenii
re.	-	rechts
RET	-	Reverser Elektronentransport
RISK	-	Reperfusion Injury Salvage Kinase
RNS	-	Ribonukleinsäure
ROS	-	Reaktive O ₂ -Spezies
rpm	-	Rounds per minute
rRNS	-	ribosomale RNS
S	-	Svedberg
SDS	-	Natriumdodecylsulfat
sek	-	Sekunde
SEN5	-	Sentrin-spezifische Protease 5
SERCA	-	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase (Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums)
sp.	-	Spezies
SSM	-	Subsarkolemmales Mitochondrium
STAT	-	Signal transducer and activator of transcription
TG	-	Transgen
TGF- β 1	-	Transforming-growth-factor- β 1
TLC	-	Thin layer chromatography (Dünnschichtchromatographie)
TMPD	-	Tetramethylphenylendiamin
TNF α	-	Tumornekrosefaktor - alpha
TRIS	-	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	-	Unit
V	-	Volt

vs.	-	versus
W	-	Watt
WT	-	Wildtyp
μ	-	Mittelwert
μg	-	Mikrogramm
μl	-	Mikroliter
μm	-	Mikrometer
μmol	-	Mikromol
σ	-	Standardabweichung
$^{\circ}\text{C}$	-	Grad Celsius

Tierverzeichnis

Ratte

- Stamm: Sprague Dawley
- Typ: RjHAN: SD
- Zuchtlinie: ANT-1 (TG-ANT)
- ANT-Lokalisation: RjHAN: SD-Tg(Myh6-SLC25A4)^{FEM}
- Haltung: Guide for the Care and Use of Laboratory Animals
US National Institutes of Health
Publication Nr.: 85-23
Überarbeitet: 1996
- Gehege: Versuchstierhaltung des Physiologischen Institutes,
Gießen
- Tiertötungsnummer: 469M
- Alter: Bis einschließlich 39ste Lebenswoche

Stoffverzeichnis

Acetat

- Firma: Riedel - de Haën
- Katalog - Nr.: 33206
- Reinheit: 96 %
- CAS: 64 - 19 - 7
- EG - Nr.: 200 - 580 - 7
- UN - Nr.: 2789
- Volumen: 2,5 Liter

ADP

- Zusammensetzung: Natrium - Salz
- Firma: Sigma Aldrich - Life Science
- Herstellung: Aus Mikroorganismen
- Katalog - Nr.: A2754 - G
- Reinheit: $\geq 95\%$ HPLC
- CAS: 20398 - 34 - 9

Agarose

- Firma: Biozym Scientific GmbH
- Katalog - Nr.: 840004
- CAS: 9012 - 36 - 6
- Typ: low electroendosmosis
- Menge: 500 g

Amplex Ultra Red

- Firma: Invitrogen by Thermo Fisher Scientific
- Name: AmplexTMUltraRED reagent
- Katalog - Nr.: A36006
- Menge: 5 - mal 1 mg

Amplex Ultra Red Ansatz

- Amplex Ultra Red: 1 mg
- DMSO: 60 µl

Amplex Working Solution

- Amplex Ultra Red Ansatz: 10 µl
- HRP Working Solution: 20 µl
- Glu/Mal - Puffer: 970 µl

Antimycin A

- Firma: Sigma Aldrich - Life Science
- Ursprung: Aus Streptomyces sp.
- Katalog - Nr.: A8674 - 25MG
- CAS: 1397 - 94 - 0
- Herstellung: Mit Ethanol 100 %

Aqua bidest.

- Herkunft: Destillieranlage des Physiologischen Institutes, Gießen

Aqua dest.¹³

- Firma: Braun
- Name: Ecotainer
- Artikel - Nr.: 0082479E
- Volumen: 1 Liter

Ascorbat (ASC)

- Zusammensetzung: L - Ascorbat
- Firma: Sigma Aldrich - Life Science
- Katalog - Nr.: A5960 - 25G
- CAS: 50 - 81 - 7

¹³ Sofern Aqua dest. nicht verfügbar war oder große Volumina benötigt wurden, wurde Aqua bidest. verwendet.

ATP

- Zusammensetzung: ATP - Dinatrium - Hydrat
- Firma: Sigma Aldrich - Life Science
- Herstellung: Aus Mikroorganismen
- Katalog - Nr.: A2383 - 5G
- Reinheit: $\geq 99\%$
- CAS: 34369 - 07 - 8

BSA A

- Firma: Sigma Aldrich - Life Science
- Herstellung: lyophilized powder, essentially fatty acid free
- Katalog - Nr.: A6003 - 10G
- Reinheit: $\geq 96\%$ (agarose gel electrophoresis)
- Unreinheiten: $\leq 0,01\%$ fatty acid (GC)
- CAS: 9048 - 46 - 8

BSA B

- Firma: Thermo Scientific
- Name: Albumin Standard
- Volumen: 1 ml
- Konzentration: 2 mg/ml
- Referenz - Nr.: 23209

CaCl₂

- Zusammensetzung: mit Dihydrat
- Firma: Sigma Aldrich
- Katalog - Nr.: C - 7902
- Reinheit: $\geq 99\%$
- CAS: 10035 - 04 - 8

CaCl₂ x 2 H₂O

- Firma: Roth
- Artikel-Nr.: 5239.2
- Reinheit: $\geq 99\%$ p.a. ACS
- CAS: 10035-04-8
- EG-Nr.: 2331408
- Menge: 500 g

Calcium Green

- Zusammensetzung: Ca-GreenTM-5N, Hexanatrium
- Firma: Life Technologies
- Katalog-Nr.: C3737
- Herstellung: 500 μ g Calcium Green + 419 μ l Aqua dest.
- Konzentration: 1 mol/l

Carbonyl Zyanid-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazin (FCCP)

- Firma: Sigma Aldrich-Life Science
- Katalog-Nr.: C2920-10MG
- CAS: 370-86-5
- Herstellung: mit Ethanol(100%)
- Konzentration: 100 μ mol/l

Chloroform

- Firma: Roth
- Artikel-Nr.: 33131
- Reinheit: $\geq 99\%$ p.a.
- CAS: 67-66-3
- EG-Nr.: 2006638
- UN-Nr.: 1888
- Volumen: 1 Liter

CsA

- Firma: Sigma Aldrich - Life Science
- Katalog - Nr.: 30024 - 100MG
- Reinheit: $\geq 98,5\%$ TLC
- CAS: 59865 - 13 - 3

DMSO

- Firma: Roth
- Artikel - Nr.: A994.2
- Reinheit: $\geq 99,5\%$
- EG - Nr.: 20006643
- Menge: 250 ml

DNS - Eichbanden

- Firma: New England BioLabs
- Katalog - Nr.: N3231L
- Größe: 100 - 1517 bp
- Menge: 0,5 ml

DNS - Farbstoff

- Substanz: Bromphenolblau
- Firma: Sigma Aldrich
- Katalog - Nr.: B0126
- CAS: 115 - 39 - 9
- Menge: 25 g
- Herstellung: Mit Ethanol (100 %)
- Konzentration: 10 mg / ml

DNS - Nukleotide

- Firma: highQu
- Katalog - Nr.: NUM0201
- Volumen: 1 ml

DNS - Polymerase

- Firma: Invitrogen by Thermo Fisher Scientific
- Katalog-Nr.: 10342-046
- Produkt-Paket: Taq DNS - Polymerase, rekombinant
- Spezies: Taq - Polymerase
- Typ: rekombinant
- Menge: 3 mal 100 µl

DNS - Primer

DNS - PCR:

ANT - 1:

- Firma: Invitrogen by Thermo Fisher Scientific
- Forward: 5' - GGA TGA TGA TGC AGT CTG G - 3'
- Reverse: 5' - TAG AAG GCA CAG TCG AGG - 3'

Real - Time - PCR:

ANT - 1:

- Firma: Invitrogen by Thermo Fisher Scientific
- Forward: 5' - TAA GGA CTT CCT GGC AGG TG - 3'
- Reverse: 5' - ACC CCT CCA GAA GGA GAG AA - 3'

B2M:

- Firma: Invitrogen by Thermo Fisher Scientific
- Forward: 5' - GCC GTC GTG CTT GCC ATTC - 3'
- Reverse: 5' - CTG AGG TGG GTG GAA CTG AGA C - 3'

GAPDH:

- Firma: Invitrogen by Thermo Fisher Scientific
- Forward: 5' - TCC ATG CCA TCA CTG CCA CTC - 3'
- Reverse: 5' - TGA CCT TGC CCA CAG CCT TG - 3'

HPRT:

- Firma: Invitrogen by Thermo Fisher Scientific
- Forward: 5' - CCA GCG TCG TGA TTA GTG AT - 3'
- Reverse: 5' - CAA GTC TTT CAG TCC TGT CC - 3'

18 S - rRNS:

- Firma: Qiagen
- Bestell - Nr.: QT00199374

EDTA

- Firma: Sigma
- Artikel - Nr.: E5134 - 100G
- CAS: 6381 - 92 - 6

EGTA

- Firma: Sigma Aldrich - Life Science
- Katalog - Nr.: E0396 - 25G
- Reinheit: $\geq 99\%$ p.a. ACS
- CAS: 67 - 42 - 5

Ethanol(100 %)

- Firma: Sigma Aldrich - Life Science
- Typ: unvergällt
- Katalog - Nr.: 32205 - 1L
- Reinheit: $\geq 99,8\%$
- CAS: 64 - 17 - 5
- UN - Nr.: 1170

Ethanol(70 %)

Mitochondrienfunktionsmessungen:

- Firma: Roth
- Typ: vergällt
- Artikel - Nr.: K928.1
- Reinheit: $\geq 99,8\%$ mit ca. 1 % MEK
- EG - Nr.: 2005786
- UN - Nr.: 1170
- Herstellung: Im Erlenmeyerkolben mit Aqua dest.

Genotypisierung:

- Firma: Roth
- Artikel-Nr.: 9065.3
- Reinheit: $\geq 99,8\%$ p.a.
- EG-Nr.: 2005786
- UN-Nr.: 1170
- Volumen: 1 Liter
- Herstellung: Im Erlenmeyerkolben mit Aqua dest.

Gel-red-Farbstoff

- Firma: Biotium
- Katalog-Nr.: 41003
- Menge: 0,5 ml

Gewebepuffer

- NaCl: 500 mmol/l
- TRIS: 250 mmol/l
- EDTA: 50 mmol/l
- Herstellung: Mit Aqua dest.
- Modifizierung: Sobald die Konzentrationen der drei genannten Substanzen gegeben sind, wird SDS (10%) hinzugegeben (Zielkonzentration: 0,1%)

Glucose

- Firma: Roth
- Zusammensetzung: D(+) Glucose Monohydrinat
- Artikel-Nr.: 6780.1
- Reinheit: $\geq 99,5\%$ Ph. Eur.
- EG-Nr.: 2000751
- Menge: 1 kg

Glutamat (Glu)

- Zusammensetzung: Glutamat - Natrium - Monohydrat
- Firma: Sigma Aldrich - Life Science
- Katalog - Nr.: G1501 - 100G
- Reinheit: $\geq 99\%$ TLC
- Form: Pulver
- CAS: 6382 - 01 - 0

HRP

- Firma: Thermo Scientific
- Produkt - Nr.: 31490
- Eigenschaft: Moisture sensitive

HRP Ansatz

- HRP: 2 mg
- PBS: 500 μ l
- Zielkonzentration: 500 U/ml

HRP Working Solution

- HRP Ansatz: 5 μ l
- Glu/Mal - Puffer: 45 μ l
- Zielkonzentration: 10 U/ml

Isoamylalkohol

- Firma: Merck
- Bestell - Nr.: 1.00979.1000
- CAS: 123 - 51 - 3
- UN - Nr.: 1219
- Qualität: p.a. ACS
- Volumen: 1 Liter

Isofluran

- Firma: Zoetis
- Name: IsoFlo®
- Katalog-Nr.: TU 061220
- Zustell-Nr.: 400136.00.00
- Volumen: 250 ml

Isopropanol

- Firma: Roth
- Artikel-Nr.: CP41.3
- Reinheit: $\geq 99,5\%$
- CAS: 67-63-0
- EG-Nr.: 2006617
- UN-Nr.: 1219
- Volumen: 2,5 Liter

KCl

Puffer für Mitochondrienfunktionsmessungen:

- Firma: Roth
- Artikel-Nr.: 6781.1
- Reinheit: $\geq 99,5\%$ p.a. ACS, ISO
- EG-Nr.: 2312118

Perfusat:

- Firma: Roth
- Artikel-Nr.: HN02.0
- Reinheit: $\geq 99\%$ Cellpure®
- EG-Nr.: 2312118
- Menge: 500 g

KH₂PO₄

Puffer für Mitochondrienfunktionsmessungen:

- Firma: MERCK
- Katalog-Nr.: 4873.1000

Perfusat:

- Firma: Roth
- Artikel-Nr.: 3904.2
- Reinheit: $\geq 99\%$ p.a. ACS
- EG-Nr.: 2319134
- Menge: 250 g

Malat (Mal)

- Firma: Sigma Aldrich - Life Science
- Katalog-Nr.: M1000 - 100G
- Reinheit: 95 - 100% enzymatisch
- CAS: 97-67-6

MgCl₂

Puffer für Mitochondrienfunktionsmessungen:

- Zusammensetzung: MgCl₂ - Hexahydrat
- Firma: Calbiochem
- Katalog-Nr.: 442611
- Reinheit: 100,5%
- CAS: 7791-18-6

DNS-PCR:

- Firma: Invitrogen by Thermo Fisher Scientific
- Katalog-Nr.: 10342-046
- Produkt-Paket: Taq DNS - Polymerase, rekombinant
- Volumen: 3 ml

MgSO₄

- Zusammensetzung: MgSO₄ - Heptahydrat
- Firma: Roth
- Artikel-Nr.: P027.1
- Reinheit: $\geq 99\%$ p.a. ACS
- EG-Nr.: 2312982

MgSO₄x7H₂O

- Firma: Roth
- Artikel-Nr.: T888.1
- Reinheit: $\geq 99\%$ Ph. Eur.
- EG-Nr.: 2312982

MOPS

- Firma: Sigma Aldrich-Life Science
- Katalog-Nr.: M1254-1KG
- Reinheit: $\geq 99,5\%$
- CAS: 1132-61-2

NaCl

- Firma: Roth
- Artikel-Nr.: 3957.1
- Reinheit: $\geq 99,5\%$ p.a. ACS, ISO
- CAS: 7647-14-5
- EG-Nr.: 2315983
- Menge: 1 kg

NaCl(0,9%)

- Firma: Braun
- Name: Ecotainer
- Artikel-Nr.: 3570160
- Volumen: 1 Liter

NaHCO₃

- Firma: Roth
- Artikel-Nr.: 6885.1
- Reinheit: $\geq 99,5\%$ p.a. ACS, ISO
- CAS: 144-55-8
- EG-Nr.: 2056338
- Menge: 1 kg

PBS

- Firma: Life Technologies™ Corp.
- Name: DPBS/Dulbeccos PBS
- Typ: Gibco
- Katalog-Nr.: 14190-094
- Konzentration: Einfach

PCR-Puffer

- Firma: Invitrogen by Thermo Fisher Scientific
- Katalog-Nr.: 10342-046
- Produkt-Paket: Taq DNS-Polymerase, rekombinant
- Volumen: 7,5 ml

Perfusat

- NaCl: 118 mmol/l
- KCl: 4,7 mmol/l
- MgSO₄ x 7 H₂O: 0,8 mmol/l
- KH₂PO₄: 1,2 mmol/l
- Glucose: 5 mmol/l
- NaHCO₃: 25 mmol/l
- Natrium-Pyruvat: 1,99 mmol/l
- CaCl₂ x 2 H₂O: 2,5 mmol/l
- Herstellung: Mit Aqua dest.
- Waage: Waage 2

Perfusat - Gas

- Firma: Nippon Gases
- Bestell-Nr.: 4800171025
- Gebinde-Nr.: 338440017438
- UN-Nr.: 3156
- Zusammensetzung: 95 % O₂ und 5 % CO₂

Phenol

- Firma: Sigma Aldrich
- Katalog-Nr.: P4557-100ML
- Reinheit: >99%
- CAS: 108-95-2

Proteinase K

- Firma: PanReac AppliChem
- Herstellung: Aus Tritirachium album
- Bestell-Nr.: A3830
- CAS: 39450-01-6
- EG-Nr.: 254-457-8
- Konzentration: 20 mg/ml

Puffer

Tabelle 19: Pufferzusammensetzungen für die Funktionsmessungen der Mitochondrien¹⁴

Substanz	Homopuffer	Puffer A	Puffer B	Glu/Mal-Puffer	Succinat-Puffer	Ca-Puffer
	Endkonzentration	Endkonzentration	Endkonzentration	Endkonzentration	Endkonzentration	Endkonzentration
KCL	100 mmol/l	100 mmol/l	100 mmol/l	125 mmol/l	125 mmol/l	125 mmol/l
TRIS-MOPS	0	0	0	10 mmol/l	10 mmol/l	10 mmol/l
KH ₂ PO ₄	0	0	0	1,2 mmol/l	1,2 mmol/l	1,2 mmol/l
MgCl ₂	0	0	0	1,2 mmol/l	1,2 mmol/l	1,2 mmol/l
EGTA	1 mmol/l	1 mmol/l	1 mmol/l	20 µmol/l	20 µmol/l	0
Glutamat	0	0	0	2,5 mmol/l	0	2,5 mmol/l
Malat	0	0	0	1,25 mmol/l	0	1,25 mmol/l
Succinat	0	0	0	0	5 mmol/l	0
MOPS	50 mmol/l	50 mmol/l	50 mmol/l	0	0	0
MgSO ₄	5 mmol/l	5 mmol/l	5 mmol/l	0	0	0
ATP	0	1 mmol/l	1 mmol/l	0	0	0
BSA A	0	0	0,04%	0	0	0
pH-Wert	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4
pH-Stabilisator	TRIS	TRIS	TRIS	TRIS	TRIS	TRIS
Herstellung	Mit Aqua dest.					

¹⁴ Mit Waage 3 wurden die einzelnen Stoffe abgewogen.

Pyruvat

- Firma: Roth
- Artikel-Nr.: 8793.2
- Reinheit: $\geq 99\%$
- EG-Nr.: 2040244

Reagenz A

- Firma: Bio Rad Laboratories
- Name: Reagent A
- Typ: DCTM Protein Assay
- Katalog-Nr.: 500-0113

Reagenz B

- Firma: Bio Rad Laboratories
- Name: Reagent B
- Typ: DCTM Protein Assay
- Katalog-Nr.: 500-0114

Reaktionspuffer

- Firma: Thermo Scientific
- Katalog-Nr.: AB1219B
- Polymerase: Taq-Polymerase
- Farbstoff: SYBR Green I
- Volumen: 1,25 ml

Reverse Transkriptase

- Firma: Qiagen
- Katalog-Nr.: 205313
- Produkt-Paket: QuantiTect Reverse Transcription Kit
- Volumen: 50 μ l

Reverse Transkriptase Puffer

- Firma: Qiagen
- Katalog-Nr.: 205313
- Produkt-Paket: QuantiTect Reverse Transcription Kit
- Volumen: 50 µl

Rhodamin 123

- Firma: Sigma Aldrich-Life Science
- Katalog-Nr.: R8004-5MG
- CAS: 62669-70-9
- Herstellung: Mit DMSO
- Konzentration: 100 µmol/l

RNase-Inhibitor 1

- Firma: Molecular Bio Products
- Name: RNase Away
- Katalog-Nr.: 7002
- Volumen: 475 ml

RNase-Inhibitor 2

- Firma: Promega
- Name: RNasin®
- Katalog-Nr.: N2511
- Menge: 2500 U

RNS-Primer

- Firma: Qiagen
- Katalog-Nr.: 205313
- Produkt-Paket: QuantiTect Reverse Transcription Kit
- Volumen: 50 µl

RNS - Wasser

- Firma: Qiagen
- Katalog-Nr.: 205313
- Produkt - Paket: QuantiTect Reverse Transcription Kit
- Eigenschaft: RNase - frei
- Volumen: 1,9ml

Rotenon

- Firma: Sigma Aldrich - Life Science
- Katalog-Nr.: R8875 - 1G
- CAS: 83 - 79 - 4
- Konzentration: 500 µmol/l
- Herstellung: Mit Ethanol (100 %)

SDS/Reagenz S

- Firma: Bio Rad Laboratories
- Name: Reagent S
- Typ: DC™ Protein Assay
- Katalog-Nr.: 500-0115

SDS (10 %)

- Firma: Roth
- Artikel-Nr.: CN30.3
- Reinheit: ≥99 %
- EG-Nr.: 2057881
- Menge: 1 kg
- Herstellung: Mit Aqua dest.

Stickstoff (N₂)

- Firma: Linde

Succinat

- Firma: Sigma Aldrich
- Katalog-Nr.: S3674-100G
- Reinheit: $\geq 99\%$
- CAS: 110-15-6

TAE - Puffer

- TRIS: 40 mmol/l
- EDTA: 1 mmol/l
- Acetat: 20 mmol/l
- Herstellung: Mit Aqua dest.
- pH- Wert: 8,0

TE - Puffer

- TRIS: 10 mmol/l
- EDTA: 1 mmol/l
- Herstellung: Mit Aqua dest.
- pH- Wert: 8,0

Tetramethylphenylendiamin (TMPD)

- Firma: Sigma Aldrich - Life Science
- Katalog-Nr.: T7394-5G
- Reinheit: 99%
- CAS: 100-22-1
- Herstellung: Mit DMSO
- Konzentration: 150 mmol/l

TRIS

- Firma: Roth
- Typ: Pufferan
- Artikel-Nr.: 4855.2
- Reinheit: $\geq 99\%$ p.a.
- EG-Nr.: 2010644

TRIzol

- Firma: Invitrogen
- Katalog-Nr.: 15596026
- Volumen: 100 ml

Wipeout - Puffer

- Firma: Qiagen
- Katalog-Nr.: 205313
- Produkt-Paket: QuantiTect Reverse Transcription Kit
- Volumen: 100 µl

Geräte-/Werkzeug-/Softwareverzeichnis

Abzug 1

- Firma: Köttermann
- Typ: 2 - 453 - DAHD
- Baujahr: 2003.19.09
- Positionsnummer: 578027900610

Abzug 2

- Firma: infralab
- Format: Tischabzug
- Zertifikat: DIN EN 14175

Abzug 3

- Firma: infralab
- Format: Laborschrank
- Typ: 18 S16/18 S17/18 H18

Ballon:

- Firma: Hugo Sachs Elektronik
- Bestell-Nr.: 73 - 3480
- Material: Latex
- Größe: 5
- Volumen: 0,1 ml

BestKeeper

- Grundprogramm: Excel
- Spezifikationen: siehe Excel
- Version: 1
- Herausgeber: Michael W. Pfaffl
- Publikation: (Pfaffl, et al., 2004)

Computer A

- Firma: ASUS
- Windows - Version: XP Professional 2002
- Update: Service Pack 3
- Prozessor: Genuine Intel® CPU 2160
- CPU - Taktung: 1,8 GHz
- RAM: 1,98 GB

Computer B

- Firma: Acer
- Windows - Version: 7 Professional
- Modell: Veriton M290
- Update: Service Pack 1
- Prozessor: Intel® Core(TM) i3 - 2100 CPU
- CPU - Taktung: 3,1 GHz
- RAM: 4 GB
- Systemtyp: 64 Bit

Computer C

- Firma: HP
- Windows - Version: 7 Professional
- Modell: HP Z220 SFF Workstation
- Update: Service Pack 1
- Prozessor: Intel® Xenon® CPU E3 - 1225 V2
- CPU - Taktung: 3,2 GHz
- RAM: 4 GB
- Systemtyp: 32 Bit

Computer D

- Windows - Version: XP Professional
- Update: Service Pack 3
- Prozessor: Intel® Core™ Duo CPU E6550
- CPU - Taktung: 2,33 GHz
- RAM: 0,98 GB

Computer E

- Firma: LG
- Windows - Version: 2000 Professional
- Windows - Spezifikation: Microsoft Windows NT 5.0 (Build 2195)
- Modell: x86 Family 6 Model 8 Stepping 10, GenuineIntel
- Update: Service Pack 4
- Prozessor: Pentium Prozessor
- CPU - Taktung: 434 MHz
- RAM: 800 MB

Computer F

- Firma: ASUS
- Windows - Version: XP Professional 2002
- Prozessor: Intel® Pentium® Dual CPU E2160
- CPU - Taktung: 1,8 GHz
- RAM: 1,97 GB
- Systemtyp: 32 Bit

Computer G

- Firma: LG
- Windows - Version: XP Professional 2002
- Prozessor: Intel® Core™ Duo CPU E8400
- Update: Service Pack 3
- CPU - Taktung: 3 GHz
- RAM: 1,97 GB

Computer H

- Firma: HP
- Windows - Version: XP Professional
- Modell: HP Compaq 6000 ProMT
- Update: Service Pack 3
- Prozessor: Pentium® Dual - Core CPU E5300
- CPU - Taktung: 2,6 GHz
- RAM: 1,93 GB

Computer I

- Firma: Fujitsu
- Windows - Version: 10
- Prozessor: Intel® Core(TM) i3 - 7100 CPU
- CPU - Taktung: 3,91 GHz
- RAM: 8 GB
- Systemtyp: 64 Bit

Computer J

- Firma: Lenovo
- Windows - Version: XP Professional 2002
- Update: Service Pack 3
- Prozessor: Intel(R) Core(TM) 2 CPU 6320
- CPU - Taktung: 1,86 GHz
- RAM: 0,97 GB

DATAANALYZER

- Grundprogramm: Excel
- Spezifikationen: siehe Excel
- Herausgeber: Raymond Hermens
- Zusatz: Mit freundlicher Genehmigung des Herausgebers

Destillieranlage für Aqua bidest.

- Firma: GFL
- Typ: 2108
- Nummer: 10362916J

Eiswürfelmaschine

- Firma: Scotsman®
- Typ: MF26AS 230/50/1

Eppendorfgesäß

- Firma: Eppendorf
- Typ: Safe-Lock Tubes
- Cetrifugation up to: 25000 G
- Order-Nr.: 0030 120.094

Erlenmeyerkolben

Gelelektrophorese:

- Firma: Fischerbrand
- Artikel-Nr.: 15429103
- Material: Borosilikatglas
- Volumen: 250 ml

Langendorff-Messung:

- Firma: Fischerbrand
- Artikel-Nr.: 10582763
- Material: Borosilicate Glass 3.3
- Volumen: 1000 ml

Excel

- Firma: Microsoft Corporation
- Grundprogramm: Microsoft Office
- Ausführung: Professional Plus
- Version: 18.2110.13110.0
- Datei - Typ: Microsoft Excel - Arbeitsblatt
- Jahr: 2016

Excel - Tabelle 1

- Firma: Microsoft®
- Programm: Office Excel®
- Jahr: 2007
- Version: 12.0.6787.5000
- Update: SP3 MSO 12.0.6785.5000

Excel - Tabelle 2

- Firma: Microsoft®
- Programm: Office Excel
- Jahr: 2003
- Version: 11.8404.8405
- Update: SP3

Excel - Tabelle 3

- Firma: Microsoft
- Programm: Excel
- Jahr: 2000
- Version: 9.0.2812

Gefrierröhrchen

- Firma: Sarstedt
- Name: CryoPure Röhre
- Bestell-Nr.: 72.379.992
- Material: High Density Polyethylen
- Volumen: 2 ml

Gelelektrophorese - Apparatur

- Firma: Hoefer Scientific Instruments
- Modell: SE250
- Serien-Nr.: 95 - 2896

Glasbehälter

- Firma: DWK Life Sciences
- Name: Exsikkator
- Katalog-Nr.: 467 - 1135
- Nenngröße: 200 DN
- Material: DURAN®

Glasflasche

- Firma: WEPA
- Name: aponorm® Medizin-Flasche
- Bestell-Nr.: 32321
- Pharmazentralnummer: 00537585
- Volumen: 100 ml
- Farbe: braun

Glasplatten

- Firma: Hoefer Scientific Instruments
- Modell: SE202GN-5
- Artikel-Nr.: 10473162

Glaspotter

- Firma: Sartorius S
- Volumen: 15 ml

Hamilton - Spritze

- Firma: Hamilton
- Name: Microliter
- Katalog-Nr.: 705
- Volumen: 0,05 ml

Heizblock 1

- Firma: Techne
- Name: Dri-Block® DB2D
- Modell: FDB02DD
- Serien-Nr.: 122643-21

Heizblock 2

- Firma: neoLab®
- Name: neoBlock 1
- Bestell-Nr.: 2-2503
- Serien-Nr.: 00206

Homogenisator

- Firma: Bertin Technologies
- Name: Precellys 24
- Bestell-Nr.: 03119-200-RD010
- Serien-Nr.: 010-0026

Keramikgefäß

- Firma: Roth
- Name: Rotilabo - PTFE - Becher mit Ausguss
- Katalog-Nr.: T647.1
- Volumen: 25 ml

Klemme

- Firma: SKS Kontakttechnik GmbH
- Produkt: AGF 20
- Artikel-Nr.: 930120000
- Länge: 49 mm
- Klemmbereich: 10 mm

Küvette

- Firma: Hellma Analytics
- Typ: Präzisions-Küvette aus Quarzglas
- Maße: 10 mm x 10 mm
- Typ-Nr.: 101-QS

Langendorff-Messkammer

- Hersteller: Physiologisches Institut, Gießen
- Typ: Eigenentwicklung
- Zusatz: Mit freundlicher Genehmigung des Herstellers

Langherz

- Hersteller: Physiologisches Institut, Gießen
- Typ: Eigenentwicklung
- Bezeichnung: Phylab
- Zusatz: Mit freundlicher Genehmigung des Herstellers

Messschieber

- Firma: Mauser
- Typ: INOX
- Skala: 0 - 20 cm

Mikro - Schraubröhre

- Firma: Sarstedt AG & Co
- Referenz - Nr.: 72.609.001
- Volumen: 2 ml

Mikrowelle

- Firma: Moulimex®
- Name: Micro - Chef MO35
- Typ: 003

Papierhandtuch

- Firma: Brod
- Name: brozell
- Artikel - Nr.: 90663
- Maße: 21 cm x 21 cm
- Lagen: 2

PCR - Reaktionsgefäß

- Firma: Sarstedt AG & Co
- Name: PCR - 8er - Kette Multiply® - µStrip
- Referenz - Nr.: 72.985.002
- Volumen: 0,2 ml

PCR - Reaktionsgefäß - Deckel

- Firma: Sarstedt AG & Co
- Name: PCR - Deckelkette
- Referenz - Nr.: 65.989.002

Pinzette 1

- Firma: Eickemeyer
- Eigenschaft: Stainless

Pinzette 2

- Firma: F.S.T.
- Eigenschaft: Germany Stainless
- Modell - Nr.: 91100 - 16

Pipette A

- Firma: Eppendorf Research plus
- Volumen: 5 ml, 1 ml, 100 µl, 10 µl
- Eigenschaft: ADJ PhysioCare Concept

Pipette B

- Firma: Eppendorf Reference
- Volumen: 1 ml, 100 µl, 10 µl
- Eigenschaft: PhysioCare Concept, Autoclavable

Pipette C

- Firma: VWR
- Volumen: 1 ml, 100 µl, 10 µl
- Eigenschaft: Ergonomic High - Performance

Pipette D

- Firma: BRAND
- Name: Transferpette S
- Volumen: 1 ml, 100 µl, 10 µl, 1 µl

Pipette E

- Firma: Eppendorf Reference
- Volumen: 1 ml, 100 µl, 10 µl
- Eigenschaft: PhysioCare Concept

Pipette F

- Firma: Eppendorf Reference
- Volumen: 1 ml, 100 µl, 10 µl

Pipette G

- Firma: Brand
- Name: Transferpette® - 12
- Volumen: 30 - 300 µl

Plastikbox

- Firma: neoLab®
- Artikel - Nr.: 1 - 6031

Plattenphotometer A

- Firma: TECAN.
- Typ: Infinite M200
- Version: 1.7.1.12
- Seriennummer: 710000334
- Firmware: V_2.02_11/06_InfiniTe (Dec 13, 2006/16.18.16)
MAI, V_2.02_11/06_InfiniTe
(Dec 13, 2006/16.18.16)

Plattenphotometer B

- Firma: Agilent Technologies/Varian
- Typ: Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer
- Name: 4 - fach - Küvettenwechsler
Peltier - Multicell Holder
- Produkt - Nr.: 00 - 100755 - 00

Plattenphotometer C

- Firma: Agilent Technologies
- Typ: Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer
- Name: Mikro - Plate Reader ACCY
- Produkt - Nr.: 00 - 100754 - 00

Programm X

- Firma: Cary Eclipse
- Typ: Kinetics Application
- Version: 1.2 (146)
- Scan type: fluorescence time scan
- Emission: 535,07 nm
- Excitation: 505 nm
- Excitation Slit Width: 2,5 nm
- Emission Slit Width: 2,5 nm
- Excitation Filter: open
- Emission Filter: open
- Emission PMT (V): 800
- Block Temperature: 25 °C

Programm X2

- Firma: Varian
- Typ: Cary Eclipse Kinetics Application
- Version: 1.1 (133)
- Copyrights: © 1999 - 2002 Varian Australia Pty Ltd.
© 1995 Sax Software Corp.
© 1999 Galactic Industries Corp.

Allgemeine Einstellungen:

- Scan type: fluorescence time scan
- Emission: 581,02 nm
- Excitation: 565,07 nm
- Excitation Slit Width: 5 nm
- Emission Slit Width: 5 nm
- Excitation Filter: auto
- Emission Filter: open

Membranpotential/ Autofluoreszenz - Einstellungen:

- Emission PMT (V): 600
- Block Temperature: 25 °C

ROS - Einstellungen:

- Emission PMT (V): 400
- WP Plate formate name: 96 wells

Programm X3

- Firma: Vilber Lourmat
- Name: Chemi - Capt 5000
- Version: 15.01a

Programm X4

- Firma: Bio Rad
- Name: CFX Maestro 2.0
- Version: 5.0.021.0616

Programm X5

- Firma: National Instruments Corporation
- Name: ND - 1000
- Version: 3.5.1
- Einstellungen: Nucleinsäuren

Puffer - Tubes

- Name: Vellstar Tubes
- Katalog-Nr.: 227 261
- Volumen: 50ml
- Eigenschaft: graduated, conical bottom, blue screw cap, sterile

Reaktionsgefäß 1

- Firma: Sarstedt
- Referenz-Nr.: 72.690.001
- Volumen: 1,5 ml

Reaktionsgefäß 2

- Firma: Sarstedt
- Referenz-Nr.: 72.706.400
- Eigenschaft: SafeSeal
- Volumen: 1,5 ml

Rundbodenröhrchen

- Firma: Becton Dickinson
- Typ: FALCON®
- Katalog-Nr.: 35 2051
- Volumen: 14ml
- Maße: 17 mm x 100 mm
- Material: Polystyrol
- Boden: Round - Bottom - Tube
- Eigenschaft: Nonpyrogenic

Schere 1

- Firma: F.S.T.
- Eigenschaft: Germany Stainless
- Modell-Nr.: 14101 - 14

Schere 2

- Firma: F.S.T.
- Eigenschaft: Germany Stainless
- Modell -Nr.: 14059-09 und 14088-10

Schere 3

- Firma: Aesculap
- Referenz -Nr.: BC772R
- Eigenschaft: Stainless

Schlauchpumpe

- Firma: Ismatec®
- Typ: REGLO DIG MS-4/89 V1.13 C
- Bestell -Nr.: ISM834-0120

Schüttler 1

- Firma: IKA®
- Name: Vortex Genius 3
- Typ: VG3
- Identifikation -Nr.: 0003340000

Schüttler 2

- Firma: IKA®
- Name: MS1 Minishaker
- Typ: M81
- Identifikation -Nr.: 03.072486

Schüttler 3

- Firma: IKA®
- Name: MS3 basic
- Identifikation -Nr.: 03.354232

Skalpell

- Firma: Feather
- Referenz - Nr.: 02.001.30.021
- Größe: 21

Spektralphotometer

- Firma: NanoDrop®
- Typ: ND - 1000
- Serien - Nr.: B952

SPSS

- Produkt - Name: IBM SPSS Statistics
- Firma: IBM Corporation
- Version: 26.0
- Jahr: 2021
- Systemtyp: 32 Bit

Sterilfilter

- Firma: Sartorius
- Name: Minisart Syringe Filter
- Typ: GF + CA 0.2, 17823 - K
- Referenz - Nr.: 17823 - K
- Eigenschaft: Hydrophil

Strathkelvin - Messapparatur

- Firma: Strathkelvin Instruments
- Typ: Mitocell MT200
- Oxygen Meter: Model 782

Strathkelvin - Messprogramm

- Firma: Strathkelvin Instruments
- Typ: Strathkelvin 782 System
- Version: 4.1 HID
- Temperatur: 25 °C

Stromerzeuger

- Firma: Biometra
- Modell: Standard Power Pack P25
- Bestell-Nr.: 040-800
- Leistung: 300 W

Stoppuhr 1

- Firma: Kienzle
- Typ: 1822

Stoppuhr 2

- Firma: Roth
- Modell-Nr.: TR118

Taschenkamm

- Firma: Hoefler Scientific Instruments
- Modell: SE211A-10-1.5
- Artikel-Nr.: 10209834
- Dicke: 1,5 mm
- Anzahl Taschen: 10

Tecan Dummy

- Grundprogramm: Excel
- Spezifikationen: siehe Excel-Tabelle 2
- Herausgeber: Physiologisches Institut, Gießen
- Zusatz: Mit freundlicher Genehmigung des Herausgebers

Tecan i-Control

- Firma: TECAN.
- Version: 1.7.1.12 (Common)
2.0.0.0 (Version)

Einstellungen:

- Label: Lowry
- Mode: Absorbance
- Wavelength: 650 nm
- Bandwidth: 9 nm
- Number of Flashes: 25
- Settle Time: 0 ms
- Temperature: 26.6 °C
- Plate: Nunclon 96 Flat Bottom Transparent Polystyrol

Teflonpistill

- Firma: Sartorius
- Name: Teflon-Kolben für Potter S
- Typ: Für 15 ml
- Material-Nr.: BBI-8542805/82380-000-6

Temperatur- und Druck-Messapparatur

- Firma: Transonic Systems Inc.
- Typ: T402 A60552
- Flowmeter: TS410
- Eigenschaft: Team21 compatible

Thermocycler 1

- Firma: Bio Rad
- Typ: Real Time System
- Modell: CFX Connect™
- Serien-Nr.: BR001842 (Thermal Cycler)
788BR01858 (Optics Module)

Thermocycler 2

- Firma: Techne
- Name: Cyclogene Thermal Cycler
- Modell: FPHC3HD
- Serien-Nr.: 56273-17

UV-Lampe

- Firma: peqlab Biotechnologie GmbH
- Serien-Nr.: 08 201299

UV-Strahler

- Firma: Stratagene
- Modell: Stratalinker® 2400
- Katalog-Nr.: 400076-05

Vortexer

- Firma: Scientific Industries, Inc.
- Name: Vortex-Genie® 1
- Modell: SI-0156
- Serien-Nr.: 15-1914

Waage 1

- Firma: Soehnle
- Max: 2000 g
- d: 2 g (bis 640 g)
5 g (640-2000 g)

Waage 2

- Firma: Kern & Sohn GmbH
- Modell-Name: ABS120-4
- Modell-Nr.: WB1100372
- Max: 120 g
- d: 0,1 mg

Waage 3

- Firma: Kern & Sohn GmbH
- Modell: KERN ABS
- Max: 120 g
- d: 0,1 mg

Wärmepumpe A

- Firma: LAUDA
- Typ: CS 6-D
- Nummer: P28005
- Klasse: 2
- DIN: 12879

Wärmepumpe B

- Firma: Colora Messtechnik GmbH
- Typ: WK 3DS
- Temperatur: 25 °C

Well-Platte A

- Firma: Greiner Bio-One
- Referenz-Nr.: 650101
- Wells - Anzahl: 96
- Material: Polystyrol
- Form: u-förmig

Well-Platte B

- Firma: Nunc™
- Name: Nunclon™ Delta Surface
- Katalog-Nr.: 136102

Zentrifuge A

- Firma: Eppendorf
- Typ: Centrifuge 5702R A-4-38
- Max: 4400 rpm
4-mal 400 g
- Arbeitsdruck: PS= 18 bar
- Kältemittel: R134a, CF₃CH₂F
- Füllmenge: 0,132 kg
- Kinetische Energie: 2280 Nm
- Max. Dichte des Füllgases: 1,2 kg/dm³

Zentrifuge B

- Firma: Thermo Scientific
- Typ: Heraeus Fresco 17 Centrifuge
- Max: 24 - mal 4 g
14800 G
13300 rpm
- Ch.: 500026PP
- US - Patent Nr.: 6,286,838/75003424
- Kinetische Energie: 1,9 kNm
- Kältemittel: R134a
- Füllmenge: 0,26 kg
- Arbeitsdruck: 21 bar

Zentrifuge C

- Firma: Sigma
- Modell: 1 - 16K
- Referenz - Nr.: 10046
- Max: 20627 G
15000 rpm
- Kältemittel: R134a
- Füllmenge: 0,136 kg
- Kinetische Energie: 5,176 kNm
- Max. Dichte des Füllgases: 1,2 kg / dm³

Zentrifuge D

- Firma: Beckman Coulter™
- Name: Microfuge® 18
- Katalog - Nr.: 367161
- Serien - Nr.: MFD03B040

Zirkonia - Kügelchen

- Firma: Roth
- Artikel - Nr.: N038.1
- Durchmesser: 1 mm

Zwirn

- Firma: Gruschwitz GmbH
- Material: Leinen
- Et. -Nr.: 40
- Artikel -Nr.: 0710-308681
- Menge: 50 g

2 ml-Spritze

- Firma: Braun
- Artikel -Nr.: 4606701V
- Nadel: 100 mm, stumpf

20 ml-Spritze

- Firma: Braun
- Name: Injekt Luer Solo 20 ml
- Referenz -Nr.: 46 06205
- Eigenschaft: Nonpyrogenic, nontoxic

Literaturverzeichnis

Abd-Efattah, Anwar Saad, Guo, Jain-Hua und Gao, Shin-Ping. 2011. Failing Hearts are Preconditioned against Myocardial Infarction and Exhausted their Ischemic Preconditioning Reserve. *Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2011, Bd. 25, S. 1033.23-1033.23.

Abete, P, et al. 2010. Ischemic preconditioning in the aging heart: from bench to bedside. *Ageing Research Reviews*. 2010, Bd. 9, S. 153-162.

Adlam, VJ, et al. 2005. Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury. *Federation of American Societies For Experimental Biology Journal*. 2005, Bd. 19, S. 1088-1095.

Aguayo-Ortiz, Rodrigo und Espinoza-Fonseca, L. Michel. 2020. Linking Biochemical and Structural States of SERCA: Achievements, Challenges, and New Opportunities. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, Bd. 21, 4146.

Alam, Muhammad Rizwan, Baetz, Delphine und Ovize, Michel. 2015. Cyclophilin D and myocardial ischemia–reperfusion injury: A fresh perspective. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2015, Bd. 78, S. 80-89.

Alberts, Bruce, et al. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. New York : Garland Science, 2002. 0-8153-3218-1, 0-8153-4072-9.

Al-Nasser, I und Crompton, M. 1986. The reversible Ca²⁺-induced permeabilization of rat liver mitochondria. *Biochemical Journal*. 1986, Bd. 239, S. 19-29.

Andres, Allen M., et al. 2015. A time to reap, a time to sow: Mitophagy and biogenesis in cardiac pathophysiology. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2015, Bd. 78, S. 62-72.

Argaud, L, et al. 2005. Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation*. 2005, Bd. 111, S. 194-197.

Awais, M., Latawiec, D. und Sutton, R. 2017. BMG Labtech. [Online] Dezember 2017. [Zitat vom: 7. Dezember 2021.] <https://www.bmglabtech.com/calcium-retention-capacity-assay-evaluates-inhibition-of-mitochondrial-permeability-transition-pore/>.

Baba, A, Yoshikawa, T und Ogawa, S. 2002. Autoantibodies produced against sarcolemmal Na-K-ATPase: possible upstream targets of arrhythmias and sudden death in patients with dilated cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*. 2002, Bd. 40, S. 1153-1159.

- Baines, CP, et al. 2007.** Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nature Cell Biology*. 2007, Bd. 9, S. 550-555.
- Ball, JB und Morrison, WL. 1997.** Cardiac tamponade. *Postgraduate Medical Journal*. 1997, Bd. 73, S. 141-145.
- Ballinger, SW, et al. 2000.** Hydrogen peroxide- and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circulation Research*. 2000, Bd. 86, S. 960-966.
- Baracca, Alessandra, et al. 2003.** Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F₀ during ATP synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2003, Bd. 1606, S. 137-146.
- Basso, E, et al. 2005.** Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *Journal of Biological Chemistry*. 2005, Bd. 280, S. 18558-18561.
- Beg, AA, et al. 1993.** Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I kappa B alpha: a mechanism for NF-kappa B activation. *Molecular and Cellular Biology*. 1993, Bd. 13, S. 3301–3310.
- Belzacq, AS, et al. 2003.** Bcl-2 and Bax modulate adenine nucleotide translocase activity. *Cancer Research*. 2003, Bd. 63, S. 541-546.
- Bernardi, P, et al. 1992.** Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. *Journal of Biological Chemistry*. 1992, Bd. 267, S. 2934-2939.
- Bernardi, P., et al. 2023.** Identity, structure, and function of the mitochondrial permeability transition pore: controversies, consensus, recent advances, and future directions. *Cell Death & Differentiation*. 2023, Bd. 30, S. 1869–1885.
- Bernardi, Paolo und Di Lisa, Fabio. 2015.** The mitochondrial permeability transition pore: Molecular nature and role as a target in cardioprotection. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2015, Bd. 78, S. 100-106.
- Besthorn, Kurt, et al. 2024.** *Deutscher Herzbericht - Update 2024*. Stuttgart : Thieme, 2024. S. 13, 16, 17.
- Boengler, Kerstin, et al. 2010.** Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion. *Basic Research in Cardiology*. 2010, Bd. 105, S. 771-785.

- Borutaité, V, et al. 1993.** The function of ATP/ADP translocator in the regulation of mitochondrial respiration during development of heart ischemic injury. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1993, Bd. 1142, S. 175-180.
- Boyman, L, et al. 2014.** Calcium movement in cardiac mitochondria. *Biophysical Journal*. 2014, Bd. 107, S. 1289-1301.
- Boyman, L, et al. 2013.** NCLX: the mitochondrial sodium calcium exchanger. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2013, Bd. 59, S. 205-213.
- Brand, Martin D. 2010.** The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Experimental Gerontology*. 2010, Bd. 45, S. 466–472.
- Brand, MD, et al. 2005.** The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content. *Biochemical Journal*. 2005, Bd. 392, S. 353-362.
- Broekemeier, KM und Pfeiffer, DR. 1989.** Cyclosporin A-sensitive and insensitive mechanisms produce the permeability transition in mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1989, Bd. 163, S. 561-566.
- Bround, M.J., et al. 2023.** ANT-dependent MPTP underlies necrotic myofiber death in muscular dystrophy. *Science Advances*. 2023, Bd. 9, S. 1-12.
- Brown, G. C. 1992.** Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells. *Biochemical Journal*. 1992, Bd. 284, S. 1-13.
- Byrne, Robert und Ibanez, Borja. 2023.** *Akutes Koronarsyndrom - Leitlinien für das Management des akuten Koronarsyndroms*. Grünwald : Börm Bruckmeier Verlag GmbH, 2023. S. 22, 23. 978-3-89862-347-6.
- Calmettes, Guillaume, et al. 2015.** Hexokinases and Cardioprotection. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2015, Bd. 78, S. 107-115.
- Carreira, RS, et al. 2007.** Ischemic preconditioning enhances fatty acid-dependent mitochondrial uncoupling. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2007, Bd. 39, S. 313-320.
- Chakrabarti, AK, et al. 2013.** Rationale and design of the EMBRACE STEMI study: a phase 2a, randomized, double-blind, placebo-controlled trial to evaluate the safety, tolerability and efficacy of intravenous Bendavia on reperfusion injury in patients treated with standard therapy inclu. *American Heart Journal*. 2013, Bd. 165, S. 509-514.
- Chen, Juan Juan, Bertrand, Helen und Yu, Byung Pal. 1995.** Inhibition of adenine nucleotide translocator by lipid peroxidation products. *Free Radical Biology and Medicine*. 1995, Bd. 19, S. 583-590.

- Chen, Q, et al. 2003.** Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *Journal of Biological Chemistry*. 2003, Bd. 278, S. 36027-36031.
- Chen, Y., et al. 2023.** Adenine nucleotide translocase: Current knowledge in post-translational modifications, regulations and pathological implications for human diseases. *Federation of American Societies For Experimental Biology Journal*. 2023, Bd. 37, S. 1-22.
- Chen, Yixiong, et al. 2015.** Uncoupling protein 3 mediates H₂O₂ preconditioning-afforded cardioprotection through the inhibition of MPTP opening. *Cardiovascular Research*. 2015, Bd. 105, S. 192–202.
- Chouchani, ET, et al. 2014.** Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature*. 2014, Bd. 515, S. 431-435.
- Ciapaite, J, et al. 2006.** Metabolic control of mitochondrial properties by adenine nucleotide translocator determines palmitoyl-CoA effects. Implications for a mechanism linking obesity and type 2 diabetes. *FEBS Journal*. 2006, Bd. 273, S. 5288-5302.
- Clarke, SJ, et al. 2008.** Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening by ischemic preconditioning is probably mediated by reduction of oxidative stress rather than mitochondrial protein phosphorylation. *Circulation Research*. 2008, Bd. 102, S. 1082-1090.
- Clemençon, Benjamin, Babot, Marion und Trézéguet, Véronique. 2013.** The mitochondrial ADP/ATP carrier (SLC25 family): Pathological implications of its dysfunction. *Molecular Aspects of Medicine*. 2013, Bd. 34, S. 485-493.
- Cohen, MV, Yang, XM und Downey, JM. 2007.** The pH hypothesis of postconditioning: staccato reperfusion reintroduces oxygen and perpetuates myocardial acidosis. *Circulation*. 2007, Bd. 115, S. 1895-1903.
- Connern, CP und Halestrap, AP. 1992.** Purification and N-terminal sequencing of peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase from rat liver mitochondrial matrix reveals the existence of a distinct mitochondrial cyclophilin. *Biochemical Journal*. 1992, Bd. 284, S. 381-385.
- Costa, R. A. P., Romagna, C. D. und Pereira, J. L. & Souza-Pinto, N. C. 2011.** The role of mitochondrial DNA damage in the cytotoxicity of reactive oxygen species. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2011, Bd. 43, S. 25-29.
- Crompton, M und Costi, A. 1988.** Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca²⁺, inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for

mitochondrial dysfunction during cellular Ca²⁺ overload. *European Journal of Biochemistry*. 1988, Bd. 178, S. 489-501.

Crompton, M, Costi, A und Hayat, L. 1987. Evidence for the presence of a reversible Ca²⁺-dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. *Biochemical Journal*. 1987, Bd. 245, S. 915-918.

Dambrova, Maija, et al. 2021. Energy substrate metabolism and mitochondrial oxidative stress in cardiac ischemia/reperfusion injury. *Free Radical Biology and Medicine*. 2021, Bd. 165, S. 24-37.

Davies, P.F. 1995. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiological Reviews*. 1995, Bd. 75, S. 519-560.

De Villiers, C. und Riley, P.R. 2020. Mouse models of myocardial infarction: comparing permanent ligation and ischaemia-reperfusion. *Disease Models & Mechanisms*. 2020, Bd. 13, S. 1-5.

DeWood, Marcus A., et al. 1980. Prevalence of Total Coronary Occlusion during the Early Hours of Transmural Myocardial Infarction. *The New England Journal of Medicine*. 1980, Bd. 303, S. 897-902.

Dolce, V, et al. 2005. A fourth ADP/ATP carrier isoform in man: identification, bacterial expression, functional characterization and tissue distribution. *Federation of European Biochemical Societies - Letters*. 2005, Bd. 579, S. 633-637.

Dorn II, Gerald W, Song, Moshi und Walsh, Kenneth. 2015. Functional implications of mitofusin 2-mediated mitochondrial-SR tethering. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2015, Bd. 78, S. 123-128.

Dörner, A, et al. 1997. Adenine nucleotide translocator in dilated cardiomyopathy: pathophysiological alterations in expression and function. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 1997, Bd. 174, S. 261-269.

Dörner, A, et al. 2000. The shift in the myocardial adenine nucleotide translocator isoform expression pattern is associated with an enteroviral infection in the absence of an active T-cell dependent immune response in human inflammatory heart disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2000, Bd. 35, S. 1778-1784.

Dörner, A, et al. 1997. Tissue-specific transcription pattern of the adenine nucleotide translocase isoforms in humans. *FEBS Letters*. 1997, Bd. 414, S. 258-262.

Dörner, Andrea und Schultheiss, Heinz-Peter. 2007. Adenine Nucleotide Translocase in the Focus of Cardiovascular Diseases. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2007, Bd. 17, S. 284-290.

- Dörner, Andrea, et al. 2021.** Mitochondria Isolated from Hearts Subjected to Ischemia/Reperfusion Benefit from Adenine Nucleotide Translocase 1 Overexpression. *Membranes*. 2021, Bd. 11.
- Duan, C., et al. 2021.** Mitochondrial Drp1 recognizes and induces excessive mPTP opening after hypoxia through BAX-PiC and LRRK2-HK2. *Cell Death and Disease*. 2021, Bd. 12, S. 1-10.
- Duan, Jianmin und Karmazyn, Morris. 1989.** Relationship between oxidative phosphorylation and adenine nucleotide translocase activity of two populations of cardiac mitochondria and mechanical recovery of ischemic hearts following reperfusion. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 1989, Bd. 67, S. 704-709.
- Ellison, JW, et al. 1996.** Rapid evolution of human pseudoautosomal genes and their mouse homologs. *Mammalian Genome*. 1996, Bd. 7, S. 25-30.
- Endlicher, R, et al. 2023.** The Mitochondrial Permeability Transition Pore-Current Knowledge of Its Structure, Function, and Regulation, and Optimized Methods for Evaluating Its Functional State. *Cells*. 2023, Bd. 12, S. 1-17.
- Endspurt-Team. 2015.** *Endspurt Vorklinik: Biochemie 3: Die Skripten fürs Physikum*. s.l. : Thieme, 2015. 3131534338.
- Esposito, LA, et al. 1999.** Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999, Bd. 96, S. 4820–4825.
- Feng, J, et al. 2008.** Phosphoproteome analysis of isoflurane-protected heart mitochondria: phosphorylation of adenine nucleotide translocator-1 on Tyr194 regulates mitochondrial function. *Cardiovascular Research*. 2008, Bd. 80, S. 20-29.
- Ferdinandy, P, et al. 2023.** Interaction of Cardiovascular Nonmodifiable Risk Factors, Comorbidities and Comedications With Ischemia/Reperfusion Injury and Cardioprotection by Pharmacological Treatments and Ischemic Conditioning. *Pharmacological Reviews*. 2023, Bd. 75, S. 159-216.
- Foskett, J. Kevin und Philipson, Benjamin. 2015.** The Mitochondrial Ca²⁺ Uniporter Complex. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2015, Bd. 78, S. 3-8.
- Fuhrmann, Dominik C. und Brüne, Bernhard. 2017.** Mitochondrial composition and function under the control of hypoxia. *Redox Biology*. 2017, Bd. 12, S. 208-215.
- Fujita, M, et al. 2007.** Prolonged transient acidosis during early reperfusion contributes to the cardioprotective effects of postconditioning. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2007, Bd. 292, S. H2004-8.

García-Dorado, D, Rodríguez-Sinovas, A und Ruiz-Meana, M. 2004. Gap junction-mediated spread of cell injury and death during myocardial ischemia-reperfusion. *Cardiovascular Research*. 2004, Bd. 61, S. 386-401.

Georgakopoulos, N.D., Wells, G. und Campanella, M. 2017. The pharmacological regulation of cellular mitophagy. *Nature Chemical Biology*. 2017, Bd. 13, S. 136-146.

Glancy, B, et al. 2013. Effect of calcium on the oxidative phosphorylation cascade in skeletal muscle mitochondria. *Biochemistry*. 2013, Bd. 52, S. 2793-2809.

Gottlieb, RA, et al. 1994. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *Journal of Clinical Investigation*. 1994, Bd. 94, S. 1621-1628.

Graham, BH, et al. 1997. A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. *Nature Genetics*. 1997, Bd. 16, S. 226-234.

Griffiths, EJ und Halestrap, AP. 1995. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochemical Journal*. 1995, Bd. 307, S. 93-98.

Halestrap, Andrew P. und Richardson, Andrew P. 2015. The mitochondrial permeability transition: A current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2015, Bd. 78, S. 129-141.

Halestrap, AP und Brenner, C. 2003. The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Current Medicinal Chemistry*. 2003, Bd. 10, S. 1507-1525.

Halestrap, AP und Davidson, AM. 1990. Inhibition of Ca²⁺(+)-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nuc. *Biochemical Journal*. 1990, Bd. 268, S. 153-160.

Halestrap, AP, Woodfield, KY und Connern, CP. 1997. Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997, Bd. 272, S. 3346-3354.

Harrington, Josephine L. und Murphy, Elizabeth. 2015. The Mitochondrial Calcium Uniporter: Mice can live and die without it. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2015, Bd. 78, S. 46-53.

- Heger, J, et al. 2012.** Transgenic overexpression of the adenine nucleotide translocase 1 protects cardiomyocytes against TGF β 1-induced apoptosis by stabilization of the mitochondrial permeability transition pore. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2012, Bd. 53, S. 73-81.
- Herold, Gerd. 2015.** *Innere Medizin*. Köln : Herold, Gerd, 2015. S. 237, 239, 302. 978-3-9814660-4-1.
- Herz-Kreislauf-Forschung, Deutsche Zentrum für. 2022.** Bundesministerium für Bildung und Forschung. [Online] 18. Mai 2022. [Zitat vom: 18. Juni 2022.] <https://www.gesundheitsforschung-bmbf.de/de/das-deutsche-zentrum-fur-herz-kreislauf-forschung-5788.php>.
- Hoffman, DL und Brookes, PS. 2009.** Oxygen sensitivity of mitochondrial reactive oxygen species generation depends on metabolic conditions. *The Journal of Biological Chemistry*. 2009, Bd. 284, S. 16236-16245.
- Hollander, John M. und Thapa, Dharendra and Shepherd, Danielle L. 2014.** Physiological and structural differences in spatially distinct subpopulations of cardiac mitochondria: influence of cardiac pathologies. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 2014, Bd. 307, S. H1–H14.
- Holmuhamedov, Ekhsan L., et al. 2012.** Cardiac Subsarcolemmal and Interfibrillar Mitochondria display Distinct Responsiveness to Protection by Diazoxide. *PLOS ONE*. 2012, Bd. 7.
- Hoppel, Charles L., Tandler, Bernard und Fujioka, Hisashi and Riva, Alessandro. 2009.** Dynamic organization of mitochondria in human heart and in myocardial disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2009, Bd. 41, S. 1949–1956.
- Hüser, J, Rechenmacher, CE und Blatter, LA. 1998.** Imaging the permeability pore transition in single mitochondria. *Biophysical Journal*. 1998, Bd. 74, S. 2129-2137.
- Ikeda, Yoshiyuki, et al. 2015.** Molecular Mechanisms Mediating Mitochondrial Dynamics and Mitophagy and Their Functional Roles in the Cardiovascular System. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2015, Bd. 78, S. 116-122.
- Iliodromitis, EK, Lazou, A und Kremastinos, DT. 2007.** Ischemic preconditioning: protection against myocardial necrosis and apoptosis. *Vascular Health and Risk Management*. 2007, Bd. 3, S. 629-637.
- Jacobshagen, C. 2013.** Später Natriumstrom und Kalzium-Overload: Ursachen verstehen und adäquat behandeln. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 2013, Bd. 138, S. 842-847.

- Jordens, EZ, et al. 2002.** Adenine nucleotide translocator 1 deficiency associated with Sengers syndrome. *Annals of Neurology*. 2002, Bd. 52, S. 95-99.
- Kadenbach, B. 2020.** Complex IV - The regulatory center of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Mitochondrion*. 2020, Bd. 58, S. 296-302.
- Karch, J., et al. 2019.** Inhibition of mitochondrial permeability transition by deletion of the ANT family and CypD. *Science Advances*. 2019, Bd. 5, S. 1-7.
- Khaliulin, I, et al. 2007.** Temperature preconditioning of isolated rat hearts--a potent cardioprotective mechanism involving a reduction in oxidative stress and inhibition of the mitochondrial permeability transition pore. *The Journal of Physiology*. 2007, Bd. 581, S. 1147-1161.
- Kim, Eun Young, et al. 2015.** SENP5, a SUMO isopeptidase, induces apoptosis and cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2015, Bd. 78, S. 154-164.
- Kinnally, KW, et al. 2011.** Is mPTP the gatekeeper for necrosis, apoptosis, or both? *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011, Bd. 1813, S. 616-622.
- Klingenberg, M und Pfaff, E. 1966.** Regulation of metabolic processes in mitochondria. [Buchverf.] JM, et al. Tager. *Symposium on the Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria*. Amsterdam : Elsevier, 1966, S. 180.
- Klingenberg, M. 1980.** The ADP-ATP Translocation in Mitochondria, a Membrane Potential Controlled Transport. *The Journal of Membrane Biology*. 1980, Bd. 56, S. 97-105.
- Klumpe, I., et al. 2016.** Transgenic overexpression of adenine nucleotide translocase 1 protects ischemic hearts against oxidative stress. *Journal of Molecular Medicine*. 2016, Bd. 94, S. 645-653.
- Knutson, AK, et al. 2021.** HIF in the heart: development, metabolism, ischemia, and atherosclerosis. *The Journal of Clinical Investigation*. 2021, Bd. 131, S. 1-12.
- Kobayashi, A, Masumura, Y und Yamazaki, N. 1992.** L-carnitine treatment for congestive heart failure--experimental and clinical study. *Japanese Circulation Journal*. 1992, Bd. 56, S. 86-94.
- Kokoszka, JE, et al. 2004.** The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature*. 2004, Bd. 427, S. 461-465.
- Krebs, M. und Roden, M. 2005.** Molecular mechanisms of lipid-induced insulin resistance in muscle, liver and vasculature. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2005, Bd. 7, S. 621-632.

- Kudin, AP, et al. 2004.** Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 2004, Bd. 279, S. 4127-4135.
- Laclau, MN, et al. 2001.** Cardioprotection by ischemic preconditioning preserves mitochondrial function and functional coupling between adenine nucleotide translocase and creatine kinase. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2001, Bd. 33, S. 947-956.
- Leist, M, et al. 1997.** Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Journal of Experimental Medicine*. 1997, Bd. 185, S. 1481-1486.
- Leonard, KC, et al. 2021.** Anatomical and ontogenetic influences on muscle density. *Scientific Reports*. 2021, Bd. 11, S. 1-11.
- Lesnefsky, EJ, et al. 2001.** Ischemic injury to mitochondrial electron transport in the aging heart: damage to the iron-sulfur protein subunit of electron transport complex III. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2001, Bd. 385, S. 117-128.
- Liepinsh, E, et al. 2016.** Long-chain acylcarnitines determine ischaemia/reperfusion-induced damage in heart mitochondria. *Biochemical Journal*. 2016, Bd. 473, S. 1191-1202.
- Lindsey, ML, et al. 2018.** Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction. *The American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2018, Bd. 314, S. H812-H838.
- Liu, Yaxin und Chen, Xin Jie. 2013.** Adenine Nucleotide Translocase, Mitochondrial Stress, and Degenerative Cell Death. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2013, Bd. 2013, S. 1-10.
- Livia, C, et al. 2024.** Infliximab Limits Injury in Myocardial Infarction. *Journal of the American Heart Association*. 2024, Bd. 7, S. 1-17.
- Lorentz, F.H. 1931.** *Sporthygiene*. Berlin, Heidelberg : Springer, 1931. S. 9. 978-3-642-99246-9.
- Mahtta, D, et al. 2020.** Targeting Inflammation After Myocardial Infarction. *Current Cardiology Reports*. 2020, Bd. 22, S. 1-18.
- Maulik, N, et al. 1999.** Ischemic preconditioning reduces apoptosis by upregulating anti-death gene Bcl-2. *Circulation*. 1999, Bd. 100, S. 369-375.
- McStay, GP, Clarke, SJ und Halestrap, AP. 2002.** Role of critical thiol groups on the matrix surface of the adenine nucleotide translocase in the mechanism of the

mitochondrial permeability transition pore. *Biochemical Journal*. 2002, Bd. 367, S. 541-548.

MITOCARE, Study Group. 2012. Rationale and design of the 'MITOCARE' Study: a phase II, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study to assess the safety and efficacy of TRO40303 for the reduction of reperfusion injury in patients undergoing percutaneous coronary in. *Cardiology*. 2012, Bd. 123, S. 201-207.

Miura, Tetsuji und Miki, Takayuki. 2009. GSK-3 β , a Therapeutic Target for Cardiomyocyte Protection. *Circulation Journal*. 2009, Bd. 73, S. 1184 – 1192.

Mochizuki, Seibu, et al. 1998. *The Ischemic Heart*. Boston : Springer Science & Business Media, 1998. 9780792381051.

Mohanty, J.G., et al. 1997. A highly sensitive fluorescent micro-assay of H₂O₂ release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative. *Journal of Immunological Methods*. 1997, Bd. 202, S. 133–141.

Morciano, G, et al. 2021. The mitochondrial permeability transition pore: an evolving concept critical for cell life and death. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 2021, Bd. 96, S. 2489-2521.

Morciano, G. und Pinton, P. 2025. Modulation of mitochondrial permeability transition pores in reperfusion injury: Mechanisms and therapeutic approaches. *European Journal of Clinical Investigation*. 2025, Bd. 55, S. 1-11.

Morciano, Giampaolo, et al. 2015. Molecular identity of the mitochondrial permeability transition pore and its role in ischemia-reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2015, Bd. 78, S. 142-153.

Morgan, HE, et al. 1961. Regulation of glucose uptake in muscle. I. The effects of insulin and anoxia on glucose transport and phosphorylation in the isolated, perfused heart of normal rats. *Journal of Biological Chemistry*. 1961, Bd. 236, S. 253-261.

Müller, W. 1976. Subsarcolemmal mitochondria and capillarization of soleus muscle fibers in young rats subjected to an endurance training. A morphometric study of semithin sections. *Cell and Tissue Research*. 1976, Bd. 174, S. 367-89.

Murphy, E. und Eisner, D.A. 2025. How does mitochondrial Ca²⁺ change during ischemia and reperfusion? Implications for activation of the permeability transition pore. *Journal of General Physiology*. 2025, Bd. 157, S. 1-9.

Murry, CE, Jennings, RB und Reimer, KA. 1986. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986, Bd. 74, S. 1124-1136.

- Nakagawa, T, et al. 2005.** Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature*. 2005, Bd. 434, S. 652-658.
- Nakagawa, Y. 2004.** Initiation of apoptotic signal by the peroxidation of cardiolipin of mitochondria. [Buchverf.] Hong Kyu Lee, et al. *Mitochondrial Pathogenesis: From Genes and Apoptosis to Aging and Disease*. Berlin Heidelberg : Springer-Verlag, 2004, S. 177-184.
- Nguyen, TT, et al. 2011.** Cysteine 203 of cyclophilin D is critical for cyclophilin D activation of the mitochondrial permeability transition pore. *Journal of Biological Chemistry*. 2011, Bd. 286, S. 40184-40192.
- Ni, R, et al. 2016.** Mitochondrial Calpain-1 Disrupts ATP Synthase and Induces Superoxide Generation in Type 1 Diabetic Hearts: A Novel Mechanism Contributing to Diabetic Cardiomyopathy. *Diabetes*. 2016, Bd. 65, S. 255-268.
- Nicholls, David G. und Chalmers, Susan. 2004.** The Integration of Mitochondrial Calcium Transport and Storage. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2004, Bd. 36, S. 277–281.
- Nielsen, Joachim, et al. 2016.** Plasticity in mitochondrial cristae density allows metabolic capacity modulation in human skeletal muscle. *The Journal of Physiology*. 2016, Bd. 595, S. 2839–2847.
- Ning, XH, et al. 1998.** Hypothermia preserves function and signaling for mitochondrial biogenesis during subsequent ischemia. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1998, Bd. 274, S. H786-H793.
- Nishida, Kazuhiko, Taneike, Manabu und Otsu, Kinya. 2015.** The role of autophagic degradation in the heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2015, Bd. 78, S. 73-79.
- Nolfi-Donagan, D, Braganza, A und Shiva, S. 2020.** Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biology*. 2020, Bd. 37, S. 1-9.
- Nury, H, et al. 2005.** Structural basis for lipid-mediated interactions between mitochondrial ADP/ATP carrier monomers. *Federation of European Biochemical Societies - Letters*. 2005, Bd. 579, S. 6031-6036.
- Ong, Sang-Bing, et al. 2015.** The mitochondrial permeability transition pore and its role in myocardial ischemia reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2015, Bd. 78, S. 23-34.

- Ottani, F, et al. 2016.** Cyclosporine A in Reperfused Myocardial Infarction: The Multicenter, Controlled, Open-Label CYCLE Trial. *Journal of the American College of Cardiology*. 2016, Bd. 67, S. 365-374.
- Pan, X, et al. 2013.** The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter. *Nature Cell Biology*. 2013, Bd. 15, S. 1464-1472.
- Pape, Hans-Christian, Kurtz, Armin und Silbernagl, Stefan. 2019.** *Physiologie*. Stuttgart : Thieme, 2019. S. 48, 61, 69, 138, 145, 146, 161, 169, 187, 191, 336. 978-3-13-242391-6.
- Paradies, G, et al. 1999.** Lipid peroxidation and alterations to oxidative metabolism in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion. *Free Radical Biology & Medicine*. 1999, Bd. 27, S. 42-50.
- Pasdois, P, Parker, JE und Halestrap, AP. 2012.** Extent of mitochondrial hexokinase II dissociation during ischemia correlates with mitochondrial cytochrome c release, reactive oxygen species production, and infarct size on reperfusion. *Journal of the American Heart Association*. 2012, Bd. 2, S. 1-20.
- Patel, P., et al. 2024.** The adenine nucleotide translocase family underlies cardiac ischemia-reperfusion injury through the mitochondrial permeability pore independently of cyclophilin D. *Science Advances*. 2024, Bd. 10, S. 1-10.
- Pei, H, et al. 2015.** TNF- α inhibitor protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via Notch1-mediated suppression of oxidative/nitrative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. 2015, Bd. 82, S. 114-121.
- Pfaff, E und Klingenberg, M. 1968.** Adenine nucleotide translocation of mitochondria. 1. Specificity and control. *European Journal of Biochemistry*. 1968, Bd. 6, S. 66-79.
- Pfaffl, MW, et al. 2004.** Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pairwise correlations. *Biotechnology Letters*. 2004, Bd. 26, S. 509-515.
- Porter, George A. und Beutner, Gisela. 2018.** Cyclophilin D, Somehow a Master Regulator of Mitochondrial Function. *Biomolecules*. 2018, Bd. 8, 176.
- Povlsen, J.A., et al. 2014.** Frequent biomarker analysis in the isolated perfused heart reveals two distinct phases of reperfusion injury. *International Journal of Cardiology*. 2014, Bd. 171, S. 9-14.
- Rittger, Harald, et al. 2022.** Cholesterinsenkende Therapie bei älteren Patienten. *Die Kardiologie*. 2022, Bd. 6, S. 456-465.

Robichaux, D.J., et al. 2022. Mitochondrial permeability transition pore-dependent necrosis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2022, Bd. 174, S. 47–55.

Rodrigues, JV und Gomes, CM. 2012. Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide generation by human electron-transfer flavoprotein and pathological variants. *Free Radical Biology and Medicine*. 2012, Bd. 53, S. 12-19.

Roe, AT, Frisk, M und Louch, WE. 2015. Targeting cardiomyocyte Ca²⁺ homeostasis in heart failure. *Current Pharmaceutical Design*. 2015, Bd. 21, S. 431–448.

Rossello, X., et al. 2016. Characterization of the Langendorff Perfused Isolated Mouse Heart Model of Global Ischemia-Reperfusion Injury: Impact of Ischemia and Reperfusion Length on Infarct Size and LDH Release. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. 2016, Bd. 21, S. 286-295.

Rouslin, W, Broge, CW und Grupp, IL. 1990. ATP depletion and mitochondrial functional loss during ischemia in slow and fast heart-rate hearts. *American Journal of Physiology*. 1990, Bd. 259, S. H1759-1766.

Rovetto, MJ, Lamberton, WF und Neely, JR. 1975. Mechanisms of glycolytic inhibition in ischemic rat hearts. *Circulation Research*. 1975, Bd. 37, S. 742-751.

Ruiz-Meana, M, et al. 2006. Mitochondrial Ca²⁺ uptake during simulated ischemia does not affect permeability transition pore opening upon simulated reperfusion. *Cardiovascular Research*. 2006, Bd. 71, S. 715-724.

Ruiz-Meana, M, et al. 2009. Role of sarcoplasmic reticulum in mitochondrial permeability transition and cardiomyocyte death during reperfusion. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2009, Bd. 297, S. H1281-H1289.

Saeidnia, S, Manayi, A und Abdollahi, M. 2015. From in vitro Experiments to in vivo and Clinical Studies; Pros and Cons. *Current Drug Discovery Technologies*. 2015, Bd. 12, S. 218-224.

Sambuceti, G, et al. 1997. Coronary vasoconstriction during myocardial ischemia induced by rises in metabolic demand in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 1997, Bd. 95, S. 2652-2659.

Schartl, M., Gessler, M. und von Eckardstein, A. 2009. *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen*. München : Elsevier, 2009. S. 164; 183-192; 198-201; 214; 219; 267, 676. 978-3-437-43690-1.

Schönfeld, P und Wojtczak, L. 2007. Fatty acids decrease mitochondrial generation of reactive oxygen species at the reverse electron transport but increase it at the forward transport. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007, Bd. 1767, S. 1032-1040.

- Schramm, W., et al. 1998.** *Laser in der Medizin Laser/ in Medicine*. Berlin, Heidelberg : Springer, 1998. S. 228-232. 978-3-540-63733-2.
- Schreiber, SN, et al. 2004.** The estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) functions in PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha)-induced mitochondrial biogenesis. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004, Bd. 101, S. 6472-6477.
- Schultheiss, HP. 1989.** The significance of autoantibodies against the ADP/ATP carrier for the pathogenesis of myocarditis and dilated cardiomyopathy--clinical and experimental data. *Seminars in Immunopathology*. 1989, Bd. 11, S. 15-30.
- Schultheiss, HP, et al. 1995.** Antibody-mediated imbalance of myocardial energy metabolism. A causal factor of cardiac failure? *Circulation Research*. 1995, Bd. 76, S. 64-72.
- Sciarretta, S, et al. 2013.** Activation of NADPH oxidase 4 in the endoplasmic reticulum promotes cardiomyocyte autophagy and survival during energy stress through the protein kinase RNA-activated-like endoplasmic reticulum kinase/eukaryotic initiation factor 2 α /activating transcripti. *Circulation Research*. 2013, Bd. 113, S. 1253-1264.
- Shen, X, et al. 2004.** Cardiac mitochondrial damage and biogenesis in a chronic model of type 1 diabetes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2004, Bd. 287, S. E896-E905.
- Shoshan-Barmatz, Varda, et al. 2010.** VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Molecular Aspects of Medicine*. 2010, Bd. 31, S. 227-285.
- Shug, AL, et al. 1975.** Acyl-CoA inhibition of adenine nucleotide translocation in ischemic myocardium. *American Journal of Physiology-1898-1976*. 1975, Bd. 228, S. 689-692.
- Sileikyte J, Petronilli, V, et al. 2011.** Regulation of the inner membrane mitochondrial permeability transition by the outer membrane translocator protein (peripheral benzodiazepine receptor). *Journal of Biological Chemistry*. 2011, Bd. 286, S. 1046-1053.
- Sluijter, Joost P. G., et al. 2014.** Novel therapeutic strategies for cardioprotection. *Pharmacology & Therapeutics*. 2014, Bd. 144, S. 60-70.
- Solhjoo, Soroosh und O'Rourke, Brian. 2015.** Mitochondrial Instability during Regional Ischemia-Reperfusion Underlies Arrhythmias in Monolayers of Cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2015, Bd. 78, S. 90-99.

- Song, M, et al. 2014.** Super-suppression of mitochondrial reactive oxygen species signaling impairs compensatory autophagy in primary mitophagic cardiomyopathy. *Circulation Research*. 2014, Bd. 115, S. 348-353.
- Sparks, LM, et al. 2016.** ANT1-mediated fatty acid-induced uncoupling as a target for improving myocellular insulin sensitivity. *Diabetologia*. 2016, Bd. 59, S. 1030-1039.
- Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. 2001.** Lexikon der Ernährung. [Online] 2001. [Zitat vom: 17. Juli 2021.] <https://www.spektrum.de/lexikon/ernaehrung/atmungskette/797>.
- Stahlhofen, Sabine. 2010.** Lokalisierung, Orientierung und Funktion von Connexin 43 in Kardiomyozyten-Mitochondrien. Universität Duisburg-Essen : s.n., 2010. Monografie, Humanmedizin.
- Sun, HY, et al. 2005.** Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca²⁺ overload. *American Journal of Physiology*. 2005, Bd. 288, S. H1900-1908.
- Sutherland, FJ und Hearse, DJ. 2000.** The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. *Pharmacological Research*. 2000, Bd. 41, S. 613-627.
- Sverdlov, Aaron L., et al. 2015.** High fat, high sucrose diet causes cardiac mitochondrial dysfunction due in part to oxidative post-translational modification of mitochondrial complex II. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2015, Bd. 78, S. 165-173.
- Tiemann, K, et al. 2003.** Increasing myocardial contraction and blood pressure in C57BL/6 mice during early postnatal development. *American Journal of Physiology*. 2003, Bd. 284, S. H464-474.
- Tsang, A, Hausenloy, DJ und Yellon, DM. 2005.** Myocardial postconditioning: reperfusion injury revisited. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2005, Bd. 289.
- Vaseva, AV, et al. 2012.** p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell*. 2012, Bd. 149, S. 1536-1548.
- Walther, Thomas, et al. 2007.** Accelerated mitochondrial adenosine diphosphate/adenosine triphosphate transport improves hypertension-induced heart disease. *Circulation*. 2007, Bd. 115, S. 333-344.
- Wang, Yong, et al. 2009.** Myocardial overexpression of adenine nucleotidetranslocase 1 ameliorates diabetic cardiomyopathy in mice. *Experimental Physiology*. 2009, Bd. 94, S. 220-270.

- Williams, B. 2001.** Angiotensin II and the pathophysiology of cardiovascular remodeling. *The American Journal of Cardiology*. 2001, Bd. 87, S. 10C-17C.
- Williams, George S. B., Boyman, Liron und Lederer, W. Jonathan. 2015.** Mitochondrial calcium and the regulation of metabolism in the heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2015, Bd. 78, S. 35-45.
- Winter, J, et al. 2016.** Adenine nucleotide translocase 1 overexpression protects cardiomyocytes against hypoxia via increased ERK1/2 and AKT activation. *Cellular Signalling*. 2016, Bd. 28, S. 152-159.
- Woldegiorgis, G, et al. 1981.** Fatty acyl coenzyme A-sensitive adenine nucleotide transport in a reconstituted liposome system. *Journal of Biological Chemistry*. 1981, Bd. 256, S. 12297-12300.
- Yabe, K, et al. 1997.** Preconditioning preserves mitochondrial function and glycolytic flux during an early period of reperfusion in perfused rat hearts. *Cardiovascular Research*. 1997, Bd. 33, S. 677-685.
- Yang, Kai-Chien, Kyle, John W. und Makielski, Jonathan C. and Dudley Jr., Samuel C. 2015.** Mechanisms of Sudden Cardiac Death: Oxidants and Metabolism. *Circulation Research*. 2015, Bd. 116, S. 1937–1955.
- Yellon, DM, Beikoghli, Kalkhoran S und Davidson, SM. 2023.** The RISK pathway leading to mitochondria and cardioprotection: how everything started. *Basic Research in Cardiology*. 2023, Bd. 118, S. 1-9.
- Yergöz, F, et al. 2021.** Adenine Nucleotide Translocase 1 Expression Modulates the Immune Response in Ischemic Hearts. *Cells*. 2021, Bd. 10, S. 1-16.
- Yu, X, et al. 1993.** H⁺ countertransport and electrogenicity of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump in reconstituted proteoliposomes. *Biophysical Journal*. 1993, Bd. 64, S. 1232-1242.
- Zhang, C, et al. 2017.** Transcription factor NF-kappa B represses ANT1 transcription and leads to mitochondrial dysfunctions. *Scientific Reports*. 2017, Bd. 7, S. 1,13.
- Zhang, J, et al. 2018.** Accumulation of Succinate in Cardiac Ischemia Primarily Occurs via Canonical Krebs Cycle Activity. *Cell Reports*. 2018, Bd. 23, S. 2617-2628.
- Zhao, ZQ, et al. 2003.** Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2003, Bd. 285, S. H579-588.

Nutzungsgenehmigungen

Abbildung 1 (Seite 3): Die Abbildung fällt unter die Bestimmungen des § 60c UrhG.

Abbildung 2 (Seite 5): Das Review, welches die Abbildung enthält, fällt unter die
CC-BY-NC-ND non-commercial open access license.

Abbildung 3 (Seite 17): Das Review, welches die Abbildung enthält, fällt unter die
open access Creative Common CC BY license.

Abbildung 6 (Seite 33): Die Dissertation, welche die Abbildung enthält, fällt unter die
Creative Commons-Lizenzen CC BY bzw. CC BY-SA.

Erklärung zur Dissertation

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Gießen, 14.07.2025

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagungen

Mein großer Dank gilt Frau PD Dr. Heger, allen Mitarbeitenden ihrer Arbeitsgruppe, Herrn Prof. Dr. Schlüter sowie allen Mitarbeitenden seiner Arbeitsgruppe am Physiologischen Institut des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen für ihre Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Folgende Mitarbeiter haben mich bei den angewandten Methoden unterstützt:

- Frau Böhme, Sabrina bei der Rattensektion und der Calcium-Retention-Capacity
- Frau Störr, Birgit bei den molekularbiologischen Analysen
- Frau Ungefug, Elvira bei der Mitochondrienisolation, Proteinbestimmung und den Messungen der Autofluoreszenz, des Membranpotentials und der ROS
- Herr Volk, Peter (†) bei der Rattensektion und Langendorff-Messung