

Die Rolle des mitochondrialen Benzodiazepinrezeptors beim akuten myokardialen Reperfusionsschaden

Victoria Louise Gertraude Johnson



Inauguraldissertation

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



edition scientia
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Die Rolle des mitochondrialen Benzodiazepinrezeptors
beim akuten myokardialen Reperfusionsschaden**

INAUGURALDISSERTATION

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

vorgelegt von

Victoria Louise Gertraude Johnson

aus Stuttgart

Gießen 2014

Aus der Medizinischen Klinik I
der Uniklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Gießen

Direktor der Abteilung: Prof. Dr. med. C. W. Hamm

Betreuer: PD Dr. Yaser Abdallah

Gutachter: Prof. Dr. Klaus T. Preissner

Tag der Disputation: 06. November 2014

Für meinen Großvater

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Myokardialer Reperfusionsschaden	1
1.2	Der mitochondriale Benzodiazepinrezeptor	8
1.3	Ziele der Arbeit	11
2	MATERIAL	12
2.1	Chemikalien	12
2.2	Häufig verwendete Medien und Puffer	14
2.3	Geräte und Laborbedarf	16
3	METHODEN	18
3.1	Anoxie- und Reoxygenationsexperimente an isolierten Kardiomyozyten	18
3.2	Statistik	27
4	ERGEBNISSE	28
4.1	Simulierte Ischämie und Reperfusion an isolierten Kardiomyozyten	28
4.2	Die Rolle des mitochondrialen Benzodiazepinrezeptors bei der Entstehung der reperfusionsbedingten Hyperkontraktur und Nekrose der Kardiomyozyten	31
4.3	Auswirkungen des mitochondrialen Benzodiazepinrezeptors auf die zytosolische Calcium-Kinetik nach simulierter Ischämie und Reperfusion	35
4.4	Einfluss des mitochondrialen Benzodiazepinrezeptors auf die mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-pore	37
4.5	Einfluss des mitochondrialen Benzodiazepinrezeptors auf das Ausmaß der mitochondrialen reaktiven Sauerstoffspezies	40
4.6	Einfluss des mitochondrialen Benzodiazepinrezeptors auf das mitochondriale Calcium	41

5	DISKUSSION	42
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	42
5.2	Der myokardiale Reperfusionsschaden unter Ischämie und Reperfusion	43
5.3	Die Protektion vor dem myokardialen Reperfusionsschaden durch den mitochondrialen Benzodiazepinrezeptor	45
5.4	Klinische Relevanz der Protektion durch den mitochondrialen Benzodiazepinrezeptor	52
6	ZUSAMMENFASSUNG	54
7	SUMMARY	55
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	56
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	57
10	LITERATURVERZEICHNIS	60
11	PUBLIKATIONEN	65
12	ERKLÄRUNG	67
13	DANKSAGUNG	68

1 EINLEITUNG

1.1 Myokardialer Reperfusionsschaden

1.1.1 Ischämie und Reperfusionsschaden

Die koronare Herzerkrankung (KHK) und deren unmittelbare Folgen sind die Haupttodesursache in der westlichen Welt. Atherosklerotische Veränderungen der Gefäßwände können sowohl zu einer Lumeneinengung bis hin zu einem kompletten Verschluss eines Herzkranzgefäßes führen. Kommt es zu einem kompletten Verschluss eines Herzkranzgefäßes durch thrombotisches Material spricht man von einem akuten Myokardinfarkt (MI). Beim Myokardinfarkt kann der myokardiale Sauerstoffbedarf nicht mehr durch die oxidative Phosphorylierung gedeckt werden und es kommt zu einem Missverhältnis von Sauerstoffbedarf- und angebot im Herzmuskel. Dieses Ungleichgewicht wird als Ischämie bezeichnet.

Im weiteren Verlauf kommt es zu einem stetigen Untergang des kontraktiven Gewebes und so zu einem akuten Pumpversagen des Herzens. Zusätzlich kann es zu lebensbedrohlichen ventrikulären Arrhythmien kommen. Der Goldstandard in der Therapie des myokardialen Infarktes besteht in der schnellstmöglichen Wiedereröffnung des verschlossenen Gefäßes mittels Katheter-Intervention oder Lyse-Therapie. Dies ist die einzige Möglichkeit das Myokard vor weiteren Schäden durch Sauerstoff- und Substratmangel zu bewahren. Nach erfolgreicher Reperfusion des Myokards hängt die langfristige Prognose nicht nur vom ischämischen Schaden ab und der daraus resultierenden Infarktgröße, sondern auch von der Entstehung des Reperfusionsschadens⁴⁷. Es konnte gezeigt werden, dass alle Manöver, die prognostisch die Infarktgröße reduzieren, das Ausmaß des Reperfusionsschadens verringern können²⁸.

Als Reperfusionsschaden beschreibt man einen Komplex aus vielfältigen Veränderungen, unter anderem der zellulären Ionenhomöostase, der nach dem ischämischen Schaden zu Beginn des Reperfusionsvorganges entsteht.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Manöver, die zu Beginn der Reperfusion durchgeführt werden, das Ausmaß des Reperfusionsschadens und damit die Infarktgröße vermindern können. Thibault et al. konnten nachweisen, dass ein

Postconditioning-Protokoll zu Beginn der Reperfusionstherapie sowohl die einzelnen Herzmuskelzellen als auch das ganze Herz vor Reperfusionsschaden schützen können und es damit zu einer Abnahme der Infarktgröße kommt^{55,56}.

Auf zellulärer Ebene kommt es während der Reperfusion zu vielfältigen Veränderungen des Ionen-Gleichgewichts. So spielen Natrium, Kalium und insbesondere Calcium eine entscheidende Rolle. Grundlage für die Entstehung von relevanten ventrikulären Arrhythmien ist eine Fehlregulierung der Ionenhomöostase und des Zusammenspiels der einzelnen Zellorganellen während der Ischämie und zu Beginn der Reperfusion. Neben der Infarktgröße und der Entstehung von lebensgefährlichen Arrhythmien spielt auch das Entstehen von „Stunning“ eine wichtige Determinante. „Stunning“ beschreibt ein durchblutetes, aber noch nicht funktionsfähiges myokardiales Gewebe. Prinzipiell ist dieses von „Stunning“ betroffene Gewebe in der Lage, sich komplett zu erholen und seine Funktion wieder aufzunehmen, im Gegensatz zu nekrotischem Gewebe. Während der Ischämie und der Reperfusion kommt es zu einem Untergang der funktionellen Herzmuskelzellen, also zu Zelltod. Mikroskopisch lassen sich in reperfundierten infarzierten Arealen die sogenannten Kontraktionsbandnekrosen nachweisen¹⁶. Diese bestehen aus hyperkontrahierten Myofibrillen und zerrissenem Sarkolemm. Überträgt man das Entstehen dieser Kontraktionsbandnekrosen auf ein Modell isolierter, ischämisch reperfundierter Kardiomyozyten, so beobachtet man eine exzessive Kontraktur der einzelnen Zellen, die zur Nekrose führt.

Trotz der verbesserten Therapiemöglichkeiten des akuten Myokardinfarktes in den letzten Jahren, versterben immer noch 12% der behandelten Patienten innerhalb von sechs Monaten nach ihrem Herzinfarkt, bei Hochrisiko-Patienten sogar mit einer erhöhten Mortalitätsrate¹⁵. Zusätzlich kommt es im Rahmen der koronaren Herzerkrankung und des Herzinfarktes auch zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz. So leiden in den Industrienationen 1-2% der Bevölkerung an Herzinsuffizienz, bei den über 70-jährigen sind es sogar mehr als 10%, Tendenz steigend³⁵. Diese Zahlen machen deutlich, wie wichtig es ist, neue Therapiestrategien zu finden, die das Herz vor der Ischämie und dem Reperfusionsschaden schützen, die Infarktgröße zu verringern und den Beginn der Herzinsuffizienz hinauszuzögern um die kardiale Mortalität zu verringern.²⁵

Während der Reperfusion kommt es zu einer Vielzahl an zellulären Vorgängen, die zu einem reperfusion-induzierten Schaden, dem Reperfusionsschaden führen^{20,44}. Es konnte bereits vor längerem gezeigt werden, dass die Infarktgrößenentwicklung in der frühen Reperfusionphase durch Verhinderung des Reperfusionsschadens positiv beeinflusst werden kann. Dies wurde sowohl am Tiermodell^{46,18,27,60}, als auch am menschlichen Herzen gezeigt^{42,55,56}.

1.1.2 Kardiomyozyten unter Ischämie und Reperfusion

Eine Ischämie des Myokards ist dadurch charakterisiert, dass ein Missverhältnis aus Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot des kontraktilen Gewebes entsteht. Der häufigste Auslöser hierfür ist ein subtotaler oder totaler Verschluss eines Herzkranzgefäßes, mit der Folge eines verminderten Sauerstoffangebotes im myokardialen Gewebe. Es entsteht ein manifestes Energiedefizit auf Grund von biochemischen und funktionellen zellulären Veränderungen. Die anaerobe Energiegewinnung der Zelle über die Atmungskette der Mitochondrien fällt aus und der Energiebedarf wird anaerob, durch Glykolyse, kaum gedeckt. In der Folge führt dies zu einer vermehrten Entstehung von Laktat, die mit dem Zusammenbruch der Atmungskette zu einer konsekutiven Anreicherung von Protonen, zu einer Azidifizierung, des myokardialen Gewebes führt. Dieser so entstandene pH-Abfall wirkt sich depressiv auf die Kontraktilität aus und verlangsamt so, durch einen verminderten Energiebedarf der Zelle, einen weiteren Zusammenbruch der ATP-Synthese. Wird nun im Rahmen von Ischämie und Reperfusion der koronare Blutfluss wieder vollständig hergestellt, birgt dies die Gefahr eines raschen Efflux' der Protonen aus der Zelle ins Interstitium im Austausch für Natrium-Ionen, mit einem daraus entstehenden sekundären Influx von Calcium-Ionen über den $3 \text{ Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, mit der Gefahr der sekundären, zytosolischen Calcium-Überladung^{13,38}.

Diese Störung der zytosolischen Calcium-Homöostase^{46,54}, zusammen mit der Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-poren (MPTP) trägt wesentlich zur Entstehung des myokardialen Reperfusionsschadens bei. Es kommt zu Hyperkontraktur der Kardiomyozyten und Zellnekrose³.

Zu Beginn der Reperfusion kommt es zur zytosolischen Ca^{2+} -Überladung. Diese entsteht dadurch, dass es durch die Wiederherstellung des myokardialen Blutflusses und die daraus resultierende Re-energetisierung des Myokards zu einer Aktivierung der Ca^{2+} -abhängigen ATPase des Sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA) kommt. Dadurch werden die Ca^{2+} -Ionen vom Zytosol ins Sarkoplasmatische Retikulum (SR) gepumpt. Da das SR nur eine begrenzte Speicherkapazität für Ca^{2+} -Ionen hat, kommt es bei einer Ca^{2+} -Überladung des SR zu einer Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen über den Ryanodin-Rezeptor ins Zytosol. Durch Repetition dieses Vorganges kommt es zu messbaren Ca^{2+} -Oszillationen zu Beginn der Reperfusion. Diese hochfrequenten Ca^{2+} -

Oszillationen führen zusammen mit der Anwesenheit von ATP und vermehrten Aktivierung der SERCA und steigendem pH-Wert zur Auslösung der Hyperkontraktur.
1,2,31,46,47,52

Die Abbildung 1.1 zeigt schematisch die Vorgänge, die im Kardiomyozyten zu Beginn der Reperfusion ablaufen.

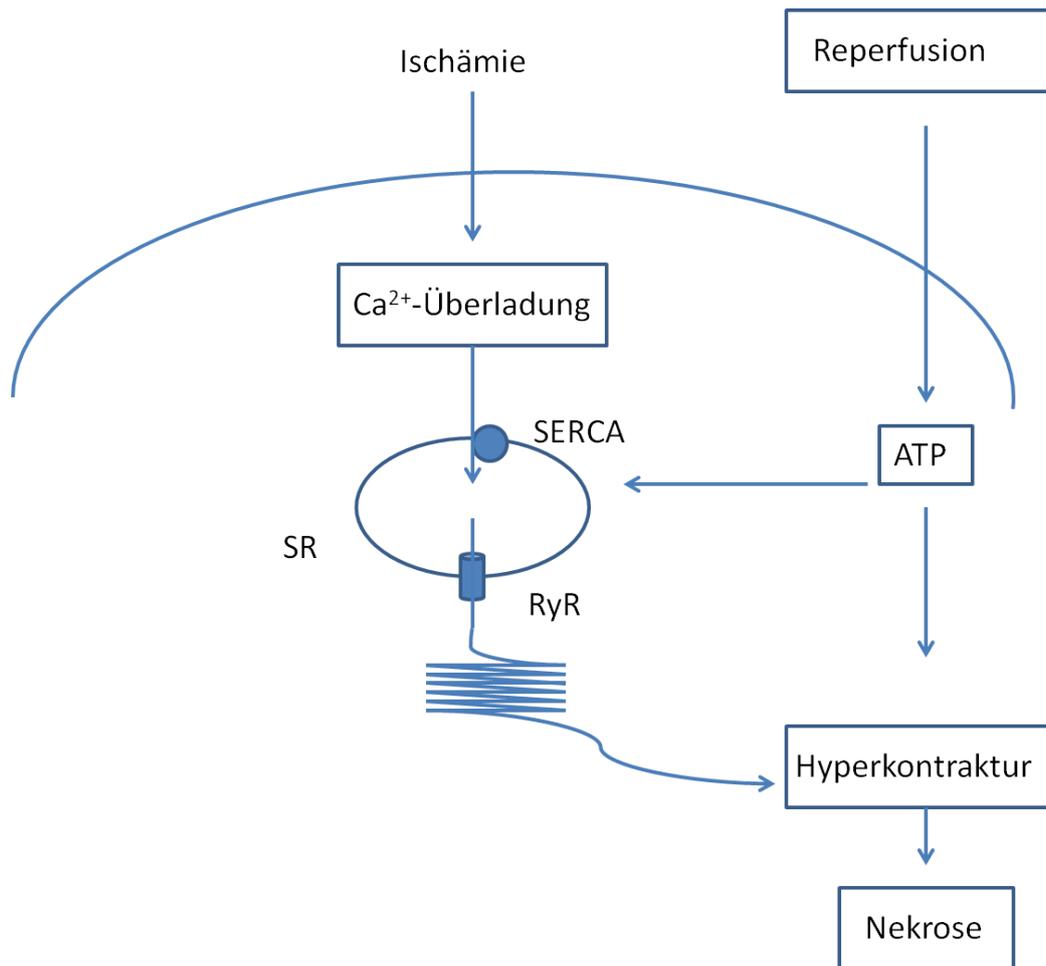


Abbildung 1.1a: Schematische Darstellung der Vorgänge während der Reperfusion.

Modifiziert nach Abdallah et al.³

ATP: Adenosin Tri-Phosphat, Ca²⁺: Calcium-Ionen, SERCA: Sarkoplasmatische Ca²⁺-ATPase
SR: sarkoplasmatisches Retikulum, RyR: Ryanodin-Rezeptor

Neben den zytosolischen Ca²⁺-Oszillationen, die durch die Interaktion des SR mit dem Zytosol entstehen, spielen noch weitere Zellorganellen eine Rolle bei der Entstehung des Reperfusionsschaden. Das Mitochondrium als Energieträger der Zelle trägt entscheidend zur Entstehung des Reperfusionsschadens bei. Mitochondrien beherbergen nicht nur die Atmungskette, die über die oxidative Phosphorylierung den Energiehaushalt der Zelle steuern, sondern auch eine Vielzahl an Poren und Kanälen die

für den Ionenhaushalt der Zelle eine große Rolle spielen. Eine wichtige Pore bei der Entstehung von Ischämie –und Reperfusionsschaden ist die mitochondriale Permeabilitätspore. Die mitochondriale Permeabilitäts Transitions Pore (MPTP), 1976 das erste Mal durch Hunter beschrieben, erstreckt sich über die innere mitochondriale Membran (IMM) und die äußere mitochondriale Membran (OMM). Sie bildet Kanäle aus, die eine direkte Verbindung des Zytosols mit der mitochondrialen Matrix ermöglicht. Diese entstehenden Poren sind für Moleküle bis zu einer Größe von 15kDa passierbar. Durch die zytosolische Ca^{2+} -Überladung, bedingt durch die Ca^{2+} -Oszillationen, kommt es über den mitochondrialen Calcium-Uniporter (MCU) zu einer Aufnahme von Calcium ins Mitochondrium. Dieser Ca^{2+} -Einstrom führt zur Öffnung der MPTP^{3,23}. Auch dieser Vorgang findet schon in den ersten Minuten der Reperfusion statt. Die Öffnung der MPTP verhindert nicht nur die Wiederherstellung des aeroben Stoffwechsels durch die oxidative Phosphorylierung, sondern kann sogar die Ca^{2+} -Oszillationen verstärken³. Außerdem kommt es zu einem vollständigen Kollaps des mitochondrialen Membranpotenziales $\Delta\Psi_m$ und dadurch zu einem erneuten Energiemangel des Kardiomyozyten in der Reperfusion^{1,43}.

Die genaue Ultrastruktur der MPTP ist bis heute nicht genau bekannt und es kann nur spekuliert werden, welche Strukturen dazu gehören. Cyclophilin D, in der mitochondrialen Matrix lokalisiert, besitzt MPTP modulierende Eigenschaften. So konnte gezeigt werden, dass eine selektive Inhibition von Cyclophilin D durch Cyclosporin A (CspA) die Öffnung der MPTP verhindern kann und es dadurch zu einer Abnahme des Reperfusionsschadens kommt^{14,21,24,26}.

Es konnten schon vielfältige Mechanismen gezeigt werden, die zu einer Abnahme der zytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen führen und damit den Kardiomyozyten vor dem Reperfusionsschaden schützen. So führt die selektive Hemmung des Ryanodinrezeptors mit Ryanodin zu einer Abnahme der zytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen und der Hyperkontraktur^{43,47}. Ein weiteres Beispiel ist die Hemmung der SERCA, selektiv mit Thapsigargin, die auch zu einer Reduktion der Ca^{2+} -Oszillationen führen kann^{1,48}. Auch führt die Hemmung des kontraktile Apparates mit BDM zu einer Verminderung der Hyperkontraktur und damit zu einer Reduktion der Nekrose⁵².

Die nachfolgende Abbildung zeigt eine Übersicht über eine Auswahl der bisher untersuchten protektiven Mechanismen.

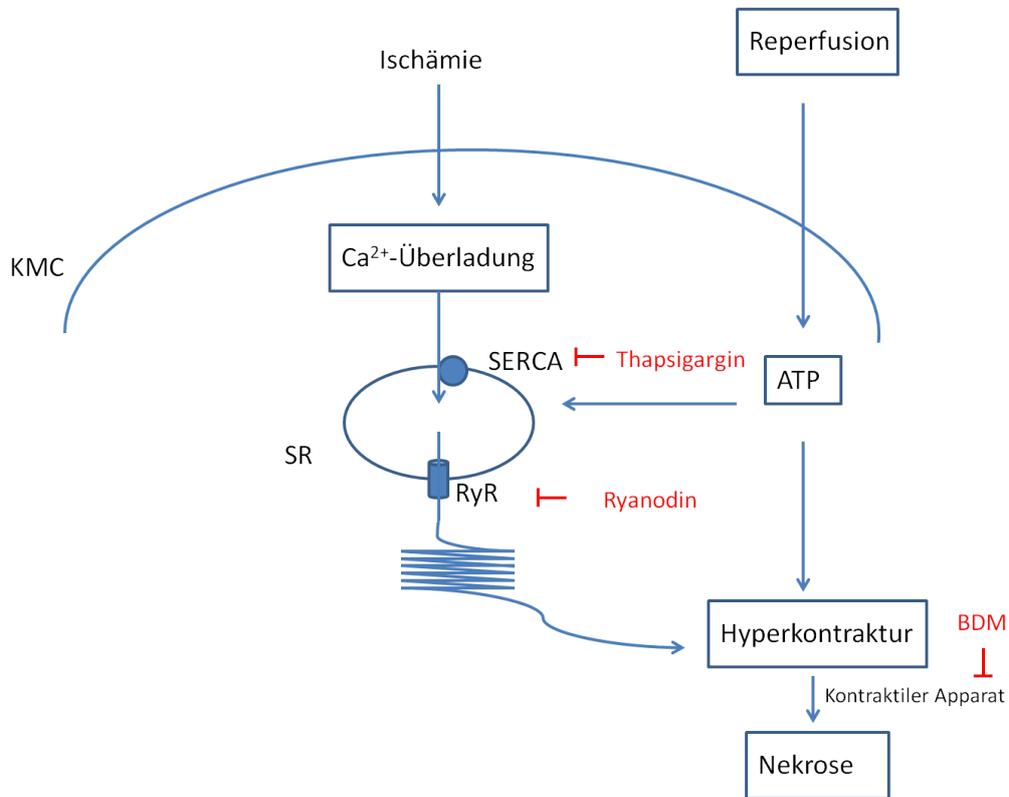


Abbildung 1.1.b.: Zelluläre Vorgänge zu Beginn der Reperfusion, die zu Hyperkontraktur und Nekrose führen; ebenfalls zeigt diese Abbildung einen Ausschnitt der bekannten protektiven Mechanismen. ATP: Adenosin Tri-Phosphat, BDM: 2,3-Butanedione monoxime, KMC: Kardiomyozyt, RyR: Ryanodin Rezeptor, SR: Sarkoplasmatisches Retikulum,

1.2 Der mitochondriale Benzodiazepinrezeptor

Wie bereits beschrieben, hat eine Änderung des mitochondrialen Membranpotenziales Auswirkungen auf das mitochondriale Kationen-Gleichgewicht, das wiederum für die Entstehung des Reperfusionsschadens verantwortlich ist. Insbesondere Ca^{2+} ist entscheidend für das Zusammenspiel zwischen sarkoplasmatischem Retikulum und dem Mitochondrium. Es konnte bereits gezeigt werden, dass ein weiterer, im Mitochondrium gelegener Ionenkanal, der mitochondriale Benzodiazepinrezeptor (mBzR) eine wichtige Rolle bei der Entstehung reperfusionsbedingter ventrikulärer Arrhythmien spielt⁴.

Der mitochondriale Benzodiazepinrezeptor gehört zur Familie der peripheren Benzodiazepinrezeptoren. Diese Gruppe der Benzodiazepinrezeptoren wurde in den 1970er Jahren entdeckt und ist dadurch charakterisiert, dass sie sich nicht im zentralen Nervensystem sondern in peripherem Gewebe befindet⁸. Der mBzR wird in steroidproduzierendem Gewebe exprimiert, aber auch in Kardiomyozyten, glatten Gefäßmuskelzellen, roten und weißen Blutkörperchen und Thrombozyten; er ist ubiquitär vorhanden⁶¹. Die Funktion des mBzR ist noch nicht ausreichend erforscht, aber es gibt Anhaltspunkte, dass er unter anderem eine Rolle bei der Synthese von Steroiden, bei Zellwachstum und Differenzierung, bei Apoptose, bei der Regulation des mitochondrialen Membranpotenziales und der Atmungskette spielt und bei der Modulation von spannungs-abhängigen Ca^{2+} -Kanälen beteiligt ist⁵⁸. Zusätzlich verfügt der mBzR auch über eine Transportfunktion, so kann er Cholesterol- und Porphyrin-Moleküle binden und diese ins Mitochondrium transportieren. Auf Grund dieser beschriebenen Transportfunktion wurde auch die neue Nomenklatur „ Translocator Protein (18kDa) “ eingeführt³⁹.

Die genaue Ultrastruktur des mBzR ist noch nicht eindeutig geklärt. Bisher bekannte Strukturen sind: ein heterotrimerer Proteinkomplex aus einem isoquinolin binding protein (IBP; 18kDa), ein voltage-dependent anion channel (VDAC; 32kDa) und ein adenine-nucleotide transporter (ANT; 30kDa)⁵⁸. Dieser Komplex befindet sich an den Kontaktstellen zwischen innerer und äußerer mitochondrialer Membran. Der größte Teil des Komplexes befindet sich jedoch in der äußeren mitochondrialen Membran. Er ist auch in anderen subzellularen Kompartimenten zu finden³⁹.

Die Abbildung 1.2 zeigt einen stark vereinfachten Aufbau des mBzR und seine bisher bekannten, endogenen Liganden.

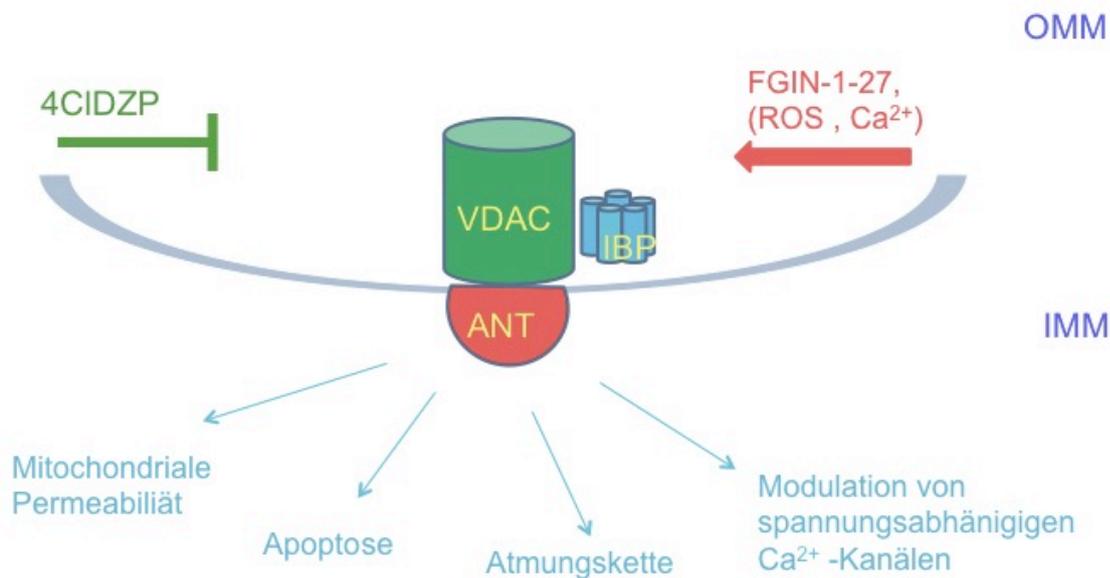


Abbildung 1.2: Aufbau des mBzR, modifiziert nach Veenman L et al.⁵⁸
 ANT: adenine, nucleotide transporter, IBP: isoquinoline binding proteine, IMM: innere mitochondriale Membran, OMM: äußere mitochondriale Membran, VDAC: voltage-dependent anion channel

Ein exogener Ligand ist Ro 5-4864, auch als 4'Chlorodiazepam (4CIDZP) bekannt. Dieser bindet selektiv an den mBzR und inhibiert dessen Wirkung^{58,61,4}. Ein weiterer exogener Ligand, der den mBzR in seiner Wirkung verstärkt, ist FGIN-1-27(N,N-di-n-hexyl-2-(4-fluorophenyl)indole-3-acetamide)³⁴.

Liganden des mBzR sind in der Lage, mindestens zwei verschiedene Klassen von Ionen-Kanälen in der inneren mitochondrialen Membran zu inhibieren. Zum einen den sogenannten mitochondrialen Mega-channel, der makroskopische Ähnlichkeit mit der durch CspA-inhibierbaren MPTP besitzt und den CspA-insensitiven inner mitochondrial anion channel (IMAC). Diesen Liganden wird außerdem die Fähigkeit zugeschrieben, das mitochondriale Membranpotenzial in KMC zu stabilisieren, die oxidativem Stress ausgesetzt waren⁹.

Von 4CIDZP, einem exogenen Liganden des mBzR, ist bekannt, dass es einen kardioprotektiven Effekt besitzt. Im Tiermodell führte die intravenöse Applikation von 4CIDZP in isolierten Kaninchenherzen zu einer Abnahme der ventrikulären Arrhythmien nach Ischämie und Reperfusion. Zusätzlich konnte eine Verbesserung der kardialen Funktion im Tiermodell beschrieben werden⁹.

Der myokardiale Reperfusionsschaden führt nicht nur zu einer vorübergehenden Funktionseinschränkung des Myokards trotz ausreichender Perfusion („Stunning“), oder

aber zu letalem Reperfusionsschaden, sondern auch zum Auftreten reperfusions-induzierter ventrikulärer Arrhythmien^{44,20}. Pathognomonisch ist nicht nur die reine Kationenhomöostase von Bedeutung, ein weiterer wichtiger Baustein in der Entstehung des Reperfusionsschadens und der Rolle der Mitochondrien ist die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. Ausgelöst durch die Ischämie und die folgende Reperfusion kommt es zu oxidativem Stress, ausgelöst durch Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in den Kardiomyozyten. Die ROS führen zu Oszillationen des mitochondrialen Membranpotenziales $\Delta\Psi_m$ und darüberhinaus kommt es zu einer Aktivierung der ATP-sensitiven K^+ -Kanäle im SR.

In Zusammenschau führen diese Mechanismen zu periodischen Oszillationen der Aktionspotenzialdauer der Kardiomyozyten. Die dadurch entstandene Labilität der AP-Dauer zusammen mit den Oszillationen des mitochondrialen Membranpotenzials $\Delta\Psi_m$ führen im intakten Herzmuskelgewebe zu Arrhythmien^{4,6,9}.

Akar et al. zeigten in Ihrer Studie, dass die Hemmung des mitochondrialen Benzodiazepinrezeptors durch 4CIDZP die untersuchten Kaninchenherzen vor postischämischen Arrhythmien schützen konnte⁴. Die Arbeitsgruppe um Brown konnte zeigen, dass die Anwesenheit von 4CIDZP während der Reperfusion das Myokard vor Ischämie-Reperfusion-induzierten Arrhythmien schützen kann und die postischämische kontraktile Funktion des Myokards im Tiermodell verbessert war⁹. Obame et al. konnten zeigen, dass die Anwesenheit von 4-CIDZP während Ischämie und Reperfusion die Infarktgröße im Tiermodell signifikant reduzieren konnte³⁷.

Diese Tatsachen wurden zum Anlass genommen die Rolle des mBzR auf in Zusammenhang mit der Entstehung von Reperfusionsschaden an einem *in vitro* Modell zu untersuchen. Zusätzlich sollen Rückschlüsse auf den zu Grunde liegenden Mechanismus der Protektion auf zellulärer Ebene gezogen werden können.

1.3 Ziele der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist herauszufinden, ob die Applikation von 4'Chlorodiazepam, einem Inhibitor des mitochondrialen Benzodiazepinrezeptors, während der Reperfusion den myokardialen Reperfusionsschaden reduzieren kann und welche zellulären Mechanismen für diesen protektive Effekt verantwortlich sind.

Die Untersuchungen hierzu wurden an einem Modell mit isolierten Kardiomyozyten durchgeführt und folgende Fragestellungen sollten beantwortet werden:

- 1.) Schützt die Inhibierung des mBzR während der Reperfusion Kardiomyozyten vor dem Reperfusionsschaden und vor der Entstehung von Nekrose
- 2.) Wie verändert die Inhibierung des mBzR die zelluläre Ca^{2+} -Homöostase
- 3.) Verhindert die Inhibierung des mBzR das Öffnen der MPTP
- 4.) Welchen Einfluss hat die Inhibierung des mBzR auf die mitochondriale Ca^{2+} -Homöostase und die Entwicklung von ROS während der Reperfusion

2. MATERIAL

2.1 Chemikalien

Albumin (aus Rinderserum)	Roche Applied Science, Mannheim
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glukose	Merck, Darmstadt
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumcyanid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka, Schweiz
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt
Kollagenase, Typ CLS II, (322U/mg)	Biochrom KG, Berlin
Laminin	Roche Applied Science, Mannheim
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Medium 199	Biochrom, Berlin
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Gibco BRL, Eggenstein

Perfusionsexperimente

4'-Chlorodiazepam	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Calcein-AM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Cyclosporin A	Merck, Darmstadt
FGIN-1-27	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fura-2-AM	Invitrogen, Karlsruhe
JC-1	Invitrogen, Karlsruhe
MitoSOX	Invitrogen
N ₂	Linde, München
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rhodamin-2, AM	Molecular Probes, Leiden

Die übrigen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Calbiochem, Sigma, Roche Applied Science, Invitrogen (Eggenstein) und VWR (Darmstadt) in der höchsten erhältlichen Qualität bezogen.

Alle verwendeten Chemikalien wurden nach Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt.

2.2 Häufig verwendete Medien und Puffer

2.2.1 Zellkulturmedien

CCT-Medium:	Medium 199	9,8g/l
	HEPES	36g/l
	Kreatin	5mM
	Karnitin	2mM
	Taurin	5mM

Das CCT-Medium wurde mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 titriert.

Vorplattiermedium:

CCT-Medium	
Laminin	0,5 µg/ml
Penicillin	5 IU/ml
Streptomycin	5 µg/ml

Ausplattiermedium:

CCT-Medium	
Penicillin	5 IU/ml
Streptomycin	5 µg/ml

Alle Medien wurden sterilisiert und bei 4°C aufbewahrt.

2.2.2 Perfusionsmedien

Die unterschiedlichen Perfusionsmedien, die für die Experimente benötigt wurden, werden im Folgenden beschrieben.

Normoxische HEPES-gepufferte Tyrode-Lösung:

Zusammensetzung (in mM): NaCl (125,0), KCL (2,6), KH₂PO₄ (1,2), MgSO₄ (1,2), CaCl₂ (1,0), HEPES (25) und Glukose (2,5). pH-Wert 7,4 bei 37°C, titriert mit NaOH.

Anoxische HEPES-gepufferte Tyrode-Lösung:

Zusammensetzung (in mM): NaCl (125,0), KCL (2,6), KH₂PO₄ (1,2), MgSO₄ (1,2), CaCl₂ (1,0) und HEPES (25,0). pH-Wert 6,4 bei 37°C, titriert mit NaOH.

Das Anoxiemedium wurde nach der von Allshire et al. beschriebenen Methode autoklaviert⁵. Dazu wurde es in dampfdruckfesten Gefäßen für 60 Minuten, bei 2 bar und 120°C autoklaviert.

2.3 Geräte und Laborbedarf

Zellkultur und Herzmuskelzellisolierung:

Brutschrank	Kendro, Hanau
Deckgläser	Menzel, Braunschweig
Gewebehacker	Harvard Apparatus über Hugo Sachs Elektronik, March- Hugstetten
Langendorff-Apparatur	Eigenbau, Werkstatt des Physiologischen Institutes, Gießen
Mikroskop	TMS-F, Nikon, Japan
Nylonnetz (200µm)	NeoLab, Heidelberg
Präparationsbesteck	Aeskulap, Heidelberg / Eickenmyeyer, Tuttlingen
Sterilbank	Kendro, Hanau

Fluoreszenzmessungen:

CCD-Kamera	TILL-Photonics, Gräfeling
Computer-Software	TILL-Photonics, Gräfeling
Dichroid-Spiegel	Olympus, Hamburg
Emissionsfilter	Olympus, Hamburg
Inverses Mikroskop IX 50	Olympus, Hamburg
Monochromator	TILL-Photonics, Gräfeling
Xenon-Lampe	TILL-Photonics, Gräfeling

Anoxie-Reoxygenationsexperimente:

Dampfdruckkochtopf	All American, Canada
Druckstabile Gefäße mit verschließbarem Deckel	Bormioli Rocco, Italien
Edelstahlkapillaren	Alltech, Unterhaching
Gasdichte Schläuche	Kahlensee, Gießen
Gasventile	Kahlensee, Gießen

Peristaltikpumpe
Perfusionskammer

Gilson-Abimed, Langenfeld
Eigenbau, Werkstatt des
Physiologischen Institutes, Gießen

Sonstige Geräte:

Feuchteammer
Glasgeräte
Hamiltonspritze (100µl)
Inkubator
Magnet-Heizrührer
Perfusionsheizung

Memmert, Schwabach
Schott, Mainz
Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Kendro, Hanau
Jahnke & Kunkel, Staufen
Eigenbau, Werkstatt des
Physiologischen Institutes, Gießen

Pipetten

Eppendorf-Netheler-Hinz,
Hamburg

pH-Meter

WTW, Weinheim

Vortexer

IKA-Werke, Staufen

Wasserbad

Julabo, Seelbach

Wasserdemineralisierungsanlage

Millipore, Eschborn

Zentrifugen

Haraeus, Hanau

Verbrauchsmaterialien:

Deckgläser (25mm Durchmesser)

Menzler Gläser, Schwerte

Kulturschalen, Typ Falcon 3001

Becton Dickinson, Heidelberg

Pippetenspitzen

Eppendorf-Netheler-Hinz,
Hamburg

3. METHODEN

3.1 Anoxie- und Reoxygenationsexperimente an isolierten Kardiomyozyten

3.1.1 Versuchstiere

Für die Anoxie und Reoxygenationsversuche wurden ventrikuläre Kardiomyozyten der adulten Ratte verwendet. Die 200-300g schweren männlichen Wistar-Ratten wurden im Tierstall des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen gezüchtet oder es wurden 200-300g schwere adulte männliche Wistar-Ratten aus Frankreich, Bretagne gekauft und im Tierstall des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen gehalten. Die Tiere hatten freien Zugang zu Nahrung und Wasser (Standardfutter Altromin).

3.1.2 Präparation der Kardiomyozyten

Die Isolation der ventrikulären Kardiomyozyten erfolgte durch retrograde Perfusion mit Kollagenase-Lösung nach der von Piper et al. beschriebenen Methode ⁴⁵.

Folgende Lösungen wurden verwendet:

Ca²⁺-Stammlösung: CaCl₂ (100,0 mM)

Powell-Medium: NaCl (110,9 mM), NaHCO₃ (25,0 mM), KCl (2,6 mM), KH₂PO₄ (1,2 mM), MgSO₄ (1,2 mM), Glukose (11,0 mM).

Kollagenase-Puffer: Powell-Medium (50ml), Kollagenase (20mg), Ca²⁺-Stammlösung (12,5µl).

Die Tiere wurden unter 4%iger Isofluran-Narkose durch Genickbruch getötet. Daraufhin wurde der Brustraum der Ratte eröffnet, das Perikard entfernt, Herz und Lunge angehoben und mit einem Scherenschnitt vom Körper getrennt. Das Herz-Lungen-Paket wurde sofort in eiskalte, isotonische NaCl-Lösung gelegt und in dieser Lösung wurde das Herz von Lunge, Trachea, Ösophagus und Geweberesten freipräpariert.

Anschließend wurde das Herz über die Aorta ascendens an der Langendorff-Apparatur mit einem Bindfaden befestigt. Zunächst wurde das Herz retrograd mit Powell-Medium perfundiert, um das verbliebene Blut aus den Koronarien zu entfernen. Anschließend erfolgte eine rezirkulierende Perfusion mit dem Kollagenasepuffer (2-3 ml/min), bei einer Mediumtemperatur von 37°C für 25 Minuten. Nach Beendigung der Rezirkulationsphase wurde das Herz unterhalb der Vorhöfe von der Langendorff-Apparatur abgeschnitten und mechanisch mit einem Gewebehacker (Schnittstärke 700 µm) zerkleinert.

Anschließend wurde das zerkleinerte Gewebe für weitere 5 Minuten in Kollagenasepuffer bei 37°C inkubiert und die Isolierung der Kardiomyozyten wurde durch vorsichtiges Auf- und Absaugen mit einer 5ml Pipette unterstützt. Um größere Zellreste zu entfernen, wurde die Zellsuspension durch ein Nylon-Netz (Porengröße 200µm) filtriert.

Das Filtrat wurde bei 25 x g für 3 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit Powell-Medium und 200µM CaCl₂ aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation bei 25 x g für 2 Minuten und Verwerfen des Überstandes, erfolgte die Resuspension mit Powell-Medium und diesmal 400µM CaCl₂. Anschließend Verteilung der Zellsuspension, entsprechend der Anzahl der präparieren Herzen, auf Reagenzgläser, die mit 10 ml Powell-Medium gefüllt waren. Danach erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 25 x g für 1 Minute. Die daraus resultierende Zellpopulation bestand zu 70-80% aus stäbchenförmigen Kardiomyozyten.⁴⁵

3.1.3 Zellkultur

Um das Anheften der Kardiomyozyten auf den Deckgläsern zu gewährleisten, wurden diese über Nacht in Kulturschalen mit Vorplattiermedium (s. Kapitel 2.2.1) im Brutschrank inkubiert. Dieses Medium wurde kurz vor dem Ausplattieren der isolierten Kardiomyozyten abgesaugt.

Das nach dem letzten Zentrifugieren gewonnene Pellet wurde vorsichtig mit etwa 25ml Ausplattiermedium (s. Kapitel 2.2.1) aufgenommen und gleichmäßig auf die, sich in Kulturschalen befindenden, Deckgläser verteilt. Nach einer zweistündigen Anheftungsphase bei 37°C wurde das Ausplattiermedium gewechselt, hierbei wurden abgerundete, nicht-haftende Kardiomyozyten entfernt. So bestand die Kultur letztendlich zu 90% aus stäbchenförmigen Kardiomyozyten.

3.1.4 Apparative Voraussetzungen

Anoxie-Reoxygenationsversuche

Es wurden Anoxie-Reoxygenationsversuche durchgeführt, die Ischämie und Reperusionsbedingungen simulierten.

Bei der Durchführung der Anoxie-Reoxygenationsversuche war es wichtig, dass das Perfusionssystem gasdicht verschlossen war. Dazu wurde das Deckglas mit den anhaftenden Kardiomyozyten fest in die Perfusionskammer eingebaut, die daraufhin gasdicht verschlossen wurde. Die autoklavierten Medien gelangten durch mit der Perfusionskammer fest verbundenen gasdichten Edelstahlkapillaren in die Perfusionskammer. Durch Anschluss einer Peristaltikpumpe konnte das Medium mit einer Geschwindigkeit von 0,5ml/min durch das Perfusionssystem gepumpt werden. Das normoxische Medium wurde vor und während der Versuche mit Raumluft, das anoxische Medium mit 100% N₂ begast. Während des gesamten Experiments herrschte in der Perfusionskammer eine kontinuierlich kontrollierte Temperatur von 37°C, gewährleistet durch eine unter der Perfusionskammer angebrachten Heizplatte.

Fluoreszenzmikroskopie

Die verschiedenen intrazellulären Parameter wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop gemessen. Zur Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes wurde UV-Licht verwendet, die entsprechenden Wellenlängen wurden mithilfe eines Monochromators selektiert. Über einen Dichroid-Spiegel wurde der Lichtstrahl auf den Objektträger gelenkt und das emittierte Licht gelangte über denselben Spiegel und eine CCD-Kamera zum Computersystem. Hier wurde das Signal digitalisiert und mit dem dazugehörigen Software Programm (TillVision[®]) ausgewertet.

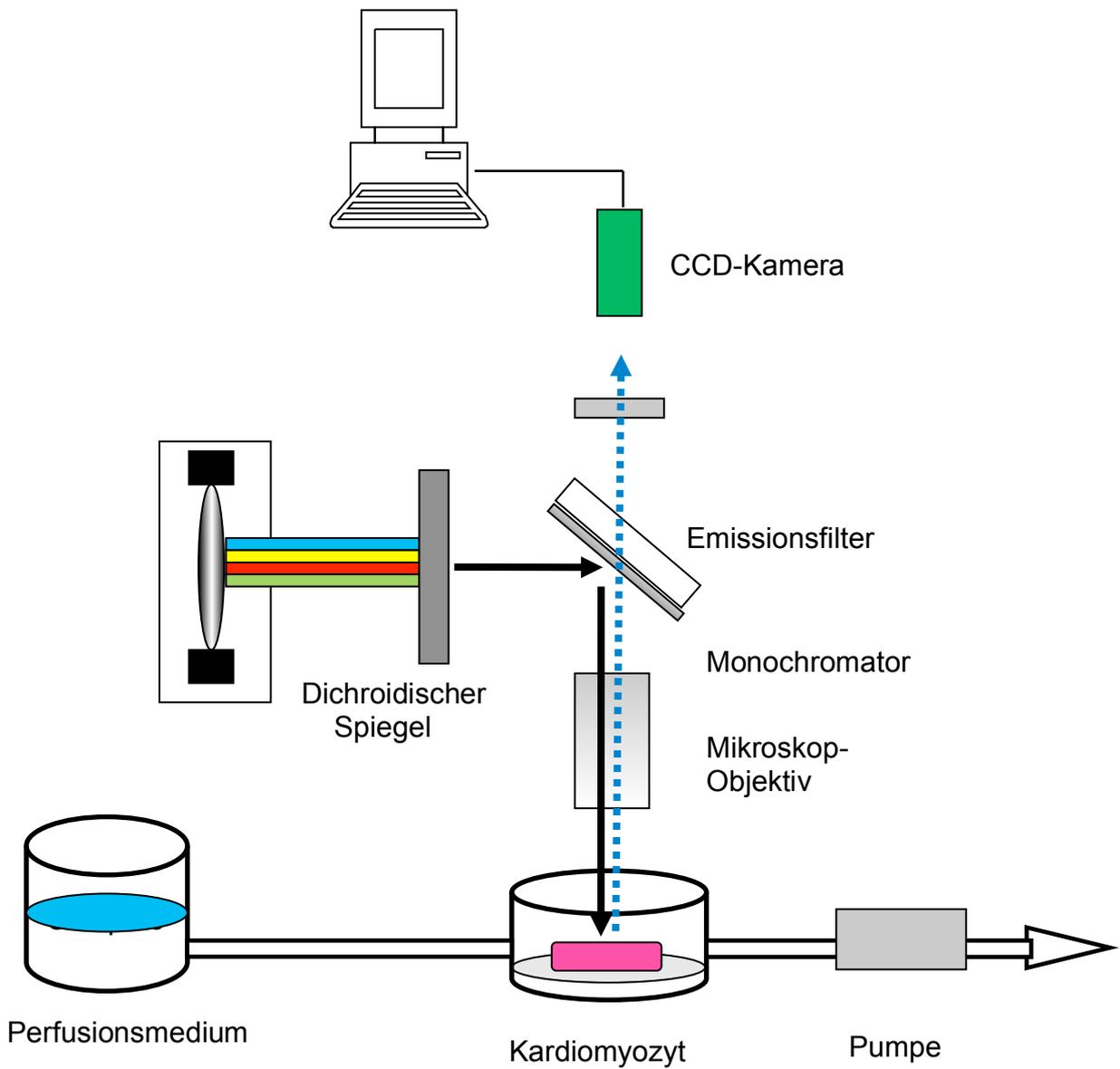


Abb. 3.1. Vereinfachte schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Der Strahlengang des Anregungslichtes ist als durchgezogene, der Strahlengang des Fluoreszenzlichtes als gestrichelte Linie dargestellt.

3.1.5 Experimentelles Protokoll

Um Ischämie und Reperfusion zu simulieren, wurden die Kardiomyozyten für 60 Minuten mit einer anoxischen Hepes gepufferten Tyrode-Lösung mit einem pH-Wert von 6,4 perfundiert. Anschließend erfolgte die Reperfusion mit einer normoxischen Hepes gepufferten Tyrode-Lösung mit einem pH-Wert von 7,4. Sowohl während der Anoxie als auch der Reoxygenation herrschte in der Perfusionskammer eine Temperatur von 37°C. Während des ganzen Experimentes wurde das anoxische Medium mit 100% N₂, das normoxische Medium mit Raumluft begast.

Fünf Minuten vor Beginn der Reoxygenation wurden verschiedene Wirkstoffe dem Medium hinzugefügt. Die nachfolgende Tabelle gibt einen kurzen Überblick über die verwendeten Substanzen und die jeweilige Konzentration. Die jeweilige Konzentration der Wirkstoffe erfolgte an Hand von Werten aus der Literatur ^{4,9}. Auch führten wir einige Vorversuche mit verschiedenen Konzentrationen von 4CIDZP durch, dort zeigte sich eine Konzentration von 10µM am wirkungsvollsten, so dass alle Versuche der vorliegenden Arbeit mit einer Konzentration von 10 µM durchgeführt wurden.

Wirkstoff	[C]	Lösungsmittel	Eigenschaften
4'Chlorodiazepam	10 µM	DMSO	Rezeptorantagonist des mitochondrialen Benzodiazepinrezeptor (mBzR)
FGIN-1-27	4,6 µM	DMSO	Rezeptoragonist des mitochondrialen Benzodiazepinrezeptor (mBzR)
Cyclosporin A	0,5 µM	DMSO	hemmt das Zustandekommen der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions Pore durch Binden an die Untereinheit Cyclophilin D

3.1.6 Messparameter

Die nachfolgende Tabelle gibt einen zusammenfassenden Überblick über die gemessenen Parameter.

Parameter	Einheit	Methode
Diastolischer bzw. systolischer Ca²⁺-Wert (zytosolisch)	Minimum bzw. Maximum einer Oszillation; angegeben in relativen Einheiten (r.E.) des Fura-Quotienten	Fura-2-AM
Zytosolische Ca²⁺-Oszillationen	Frequenz (Anzahl der Oszillationen pro Minute)	Fura-2-AM
Reoxygenationsbedingte Zellverkürzung (Hyperkontraktur)	Zelllänge in % bezogen auf die endanoxische Ausgangslänge	Zelllängenmessung
Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore	Calceinfluoreszenz in % des endanoxischen Ausgangswertes	Calcein-Cobalt
Verhalten der Reaktiven Sauerstoffspezies	MitoSOX-Fluoreszenz in % des endanoxischen Wertes	MitoSOX
Mitochondrialer Ca²⁺-Gehalt	Rhodamin-Fluoreszenz in % des endanoxischen Wertes	Rhodamine-2-AM
Nekrosedetektion	% zur Gesamtzellzahl	Propidiumiodid

Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration

Um die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration zu messen, wurden die Zellen für 30 Minuten bei 37°C mit Fura-2-AM ($2,5\mu\text{M}$) in CCT-Medium beladen. Anschließend wurden die Kardiomyozyten gewaschen und für 15 Minuten bei 37°C mit CCT-Medium nachinkubiert.

Fura-2-AM ist ein fluoreszierender, chemischer Calcium-Indikator, der aus einem Chelatbildner und einem Fluorophor besteht ²². Dieser gelangt als Acetomethylester in die Zellen, dort wird er von intrazellulären Esterasen gespalten und ist danach als geladenes Molekül nicht mehr in der Lage, die Zellmembran des Kardiomyozyten zu überqueren und damit die Zelle zu verlassen.

Die Anregung von Fura-2-AM erfolgte 6-mal in der Sekunde mit den Wellenlängen 340nm und 380nm, das Emissionsmaximum lag bei 510nm. Die Auswertung der Fura-2-Messungen wurde als Quotient der Emissionsintensitäten bei Anregung mit 340nm und bei Anregung mit 380nm ($340\text{nm} / 380\text{nm}$) angegeben.

Detektion der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Poren Öffnung

Die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein-AM detektiert. Calcein ist ein Acetomethylester, der in die Kardiomyozyten eindringt und sich vor Allem in den Mitochondrien anlagert. Intrazellulär wird Calcein-AM durch Esterasen gespalten. Durch diesen Vorgang kann Calcein weder die Membran der Mitochondrien, noch die Zellmembran überqueren und diese verlassen.

Die Kardiomyozyten wurden 30 Minuten bei 37°C mit Calcein-AM ($2,5\mu\text{M}$) in CCT-Medium beladen. Um das verbleibende zytosolische Calcein-Signal zu löschen, wurden die Zellen 15 Minuten mit CoCl_2 ($200\mu\text{M}$) nachinkubiert. Cobalt ist nicht in der Lage in die Mitochondrien einzudringen und lagert sich im Zytosol der Kardiomyozyten an und löscht so das zytosolische Calcein-Signal. Durch diesen Vorgang wurde gewährleistet, dass sich Calcein ausschließlich in den Mitochondrien der Kardiomyozyten anreichert. Die Anregung von Calcein-AM erfolgte 6-mal pro Sekunde mit einer Wellenlänge von 480nm, das Emissionsmaximum lag bei 530nm. Öffnete sich im Verlauf der Anoxie- und Reoxygenationsexperimente die mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore, so konnte das 1,2 kDa große Calcein-Molekül das Mitochondrium verlassen und gelangte

ins Zytosol. Durch das hier vorhandene CoCl_2 wurde das Calcein-Signal gelöscht. Die Auswertung der Calcein-AM Messungen erfolgte in Prozent (%) des endanoxischen Ausgangswertes. Dabei entspricht der Verlust der Calcein-AM Fluoreszenz dem Öffnen der MPTP ⁴¹.

Messung der Reaktiven Sauerstoffspezies

Mitochondriale reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen als Nebenprodukt der ATP-Synthese aus der oxidativen Phosphorylierung, vor allem durch Monoaminoxidasen und an Komplex I und III der Atmungskette. Um diese in isolierten, lebenden Kardiomyozyten zu detektieren, benutzten wir den Fluoreszenzindikator MitoSOX Red. MitoSOX ist ein hochselektiver, sich in den Mitochondrien anreicherender Fluoreszenzfarbstoff. Sobald dieser ins Mitochondrium diffundiert ist, wird er durch die gebildeten Superoxide oxidiert und emittiert eine rote Fluoreszenz. MitoSOX Red kann nur spezifisch von Superoxiden oxidiert werden und nicht von anderen ROS-generierenden Systemen³⁶.

Die isolierten Kardiomyozyten wurden 30 Minuten mit MitoSOX ($5\mu\text{M}$) in CCT-Medium inkubiert, anschließend gewaschen und 15 Minuten mit CCT-Medium nachinkubiert. Die Anregung von MitoSOX Red erfolgte 6-mal pro Sekunde mit einer Wellenlänge von 510nm und das Emissionsmaximum lag bei 580nm. Die ausgewerteten Daten wurden als ROS-Fluoreszenz in Prozent (%) des endanoxischen Ausgangswertes angegeben.

Messung der mitochondrialen Calcium-Konzentration

Um die mitochondriale Calcium-Konzentration zu bestimmen, wurden Versuche mit dem Calcium-bindenden Fluoreszenz-Farbstoff Rhod-2-AM durchgeführt. Dieses kationische Rhodamin-Derivat, gebunden an ein Acetomethylester, lagert sich aufgrund seiner positiven Ladung spezifisch in den negativ geladenen Mitochondrien an und durch Spaltung des Acetomethylesters durch spezifische Esterasen kann Rhod-2 das Mitochondrium nicht mehr verlassen. ¹²

Die isolierten Kardiomyozyten wurden für 15 Minuten bei 37°C mit Rhod-2-AM ($5\mu\text{M}$) in CCT-Medium beladen, anschließend gewaschen und für 15 Minuten mit CCT-

Medium bei 37°C nachinkubiert. Rhod-2-AM wurde alle sechs Sekunden mit einer Wellenlänge von 550nm angeregt und das Emissionsmaximum lag bei 580nm. Die ausgewerteten Daten wurden in Prozent (%) des endaxonischen Ausgangswertes der Rhod-2-AM Fluoreszenz angegeben.

Nekrosedektion der Kardiomyozyten

Die Detektion nekrotischer Kardiomyozyten erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid.

Am Ende der Anoxie-Reoxygenationsversuche wurden die Kardiomyozyten mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (37,5µM) und Hoe (2µM) 15 Minuten lang gefärbt.

Die Zellmembran lebender Zellen ist für Propidiumiodid nicht permeabel und somit werden ausschließlich nekrotische Zellen und deren Zellkerne angefärbt.

Angeregt wurde Propidiumiodid mit einer Wellenlänge von 530nm. Die nekrotischen Zellen fluoreszierten dunkelrot, lebendige Zellen wurden dagegen nicht angefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnten so die nekrotischen Zellen anhand der unterschiedlichen Färbung ausgezählt werden.

Hoechst 3342 bindet dagegen an die DNA der Zellen und färbt somit Zellkerne aller Zellen an.

Die ausgewerteten Daten wurden als Nekrose in Prozent (%) zur Gesamtzellzahl angegeben.

3.2 Statistik

Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standard Error of the mean (SEM) von n verschiedenen Experimenten wiedergegeben. Statistische Vergleiche wurden durch eine einfache Varianzanalyse unter Nutzung des Student-Newman-Keuls-Tests für post-hoc-Analysen durchgeführt. ³³Unterschiede mit $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

4. ERGEBNISSE

4.1 Simulierte Ischämie und Reperfusion an isolierten Kardiomyozyten

Zur Simulation von Ischämie und Reperfusion, wurden die isolierten Kardiomyozyten 60 Minuten lang mit anoxischem Medium und anschließend für 30 Minuten mit normoxischem Medium perfundiert. Während des gesamten Experimentes hatte das anoxische Medium einen extrazellulären pH von 6,4 und wurde mit 100% N₂ begast. Das normoxische Medium mit einem extrazellulären pH von 7,4 wurde mit Raumlauft begast. Während des gesamten Experimentes herrschte in der Perfusionskammer eine Temperatur von 37° C.

4.1.1 Auswirkungen von Anoxie und Reoxygenation auf die Zelllänge

Unter simulierter Ischämie verkürzten sich die isolierten Kardiomyozyten auf etwa 70% der Ausgangslänge, die sie zu Beginn der Normoxie hatten (Abbildung 4.1a und b). Dieser Zustand wird auch Rigor-Kontraktur genannt. Während der Reperfusion kam es dann zu einer weiteren Zellverkürzung auf etwa 40% der normoxischen Ausgangslänge. Hierbei handelte es sich um den Vorgang der Hyperkontraktur (Abbildung 4.1c).

Diese Hyperkontraktur entsteht durch den Anstieg der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration und führt letztendlich zur Nekrose der Kardiomyozyten. Ein weiterer Faktor für die Entstehung der Hyperkontraktur ist die ATP-Zunahme in den Kardiomyozyten, die durch die Wiederaufnahme der ATP-Produktion durch die Atmungskette während der Reperfusion stattfindet. Diese Faktoren zusammen bewirken unter Kontrollbedingen diese deutliche Verkürzung der Kardiomyozyten mit dem daraus resultierenden nekrotischen Tod des Kardiomyozyten^{43,47}.

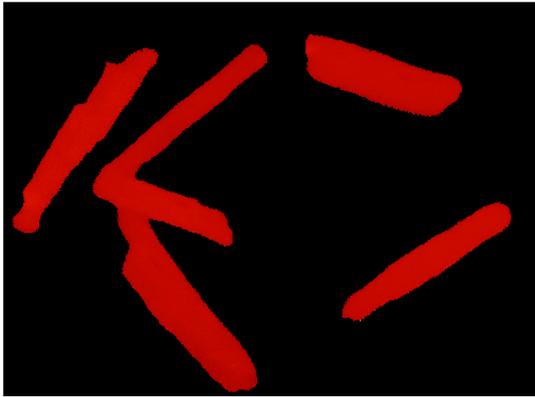


Abbildung 4.1a Kardiomyozyten zu Beginn der Ischämie



Abbildung 4.1b: Kardiomyozyten während der Ischämie. Entstehung der reversiblen Rigor-Kontraktur

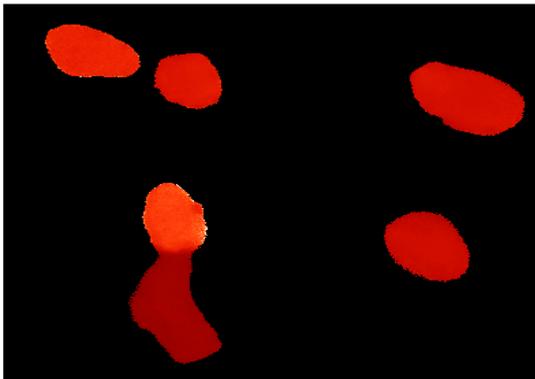


Abbildung 4.1c: Kardiomyozyten während der Reperfusion. Entstehung der irreversiblen Hyperkontraktur.

4.1.2. Auswirkungen von Anoxie und Reoxygenation auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration

Unter simulierter Ischämie, d.h. Perfusion mit anoxischem Medium kommt es zu einem kontinuierlichen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration. Dies ist in Abbildung 4.1d exemplarisch dargestellt. Während der simulierten Reperfusion, d.h. Reoxygenation mit normoxischem Medium, kommt es in einer ersten Phase zu einer Abnahme der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, gefolgt von einer etwa 10-minütigen zweiten Phase, die durch hochfrequente Ca^{2+} -Oszillationen gekennzeichnet ist (siehe Abbildung 4.1.e) Diese zytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen entstehen durch repetitives Ca^{2+} -Kreisen vom Ca^{2+} zwischen Sarkoplasmatischem Retikulum und Zytosol und führen in Folge dessen zu Hyperkontraktur und Zelltod.

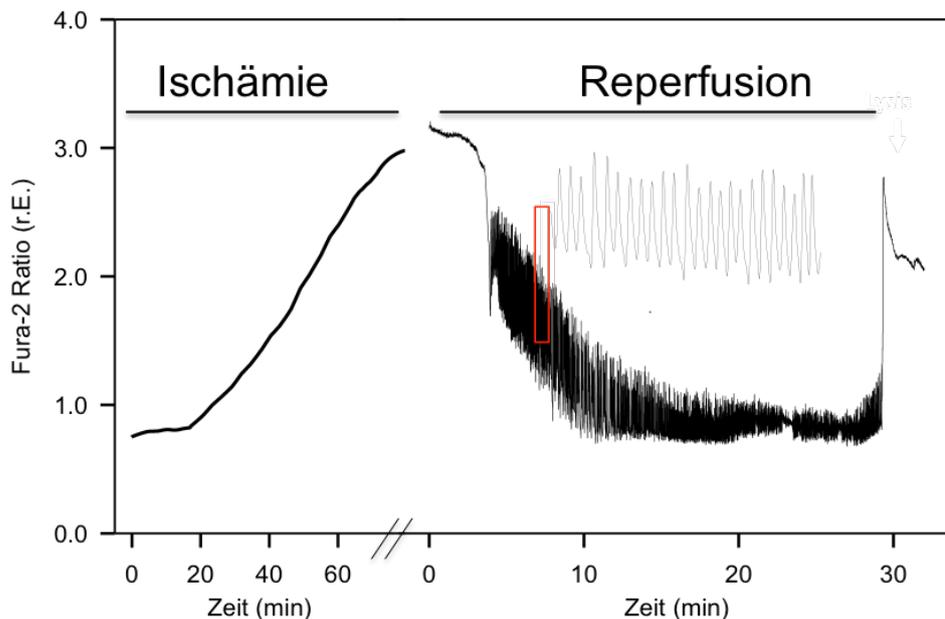


Abbildung 4.1d: Exemplarische Darstellung der zytosolischen Calcium-Konzentration während der 60 Minuten Ischämie und den ersten 30 Minuten der Reperfusion unter Kontrollbedingungen. Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und Abfall und Oszillationen gemessen als Fura-2 Ratio in r.E. Dauer der Ischämie in Minuten (min).

4.2 Die Rolle des mitochondrialen Benzodiazepinrezeptors bei der Entstehung der reperfusionsbedingten Hyperkontraktur und Nekrose der Kardiomyozyten

Durch die Anwesenheit des mBzR- Inhibitors 4CIDZP während der Reperfusion kommt es zu einer deutlichen Abnahme der Hyperkontraktur der Kardiomyozyten. Abbildung 4.2a zeigt dies während der Reperfusion, Abbildung 4.2b zeigt den zeitlichen Verlauf der Hyperkontraktur während der Reperfusion.

Durch die Zugabe eines mBzR Aktivators, FGIN-1-27, während der Reperfusion kommt es hingegen zu einer verstärkten Hyperkontraktur im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 4.2a).

Die Anwesenheit von 4-Chlorodiazepam während der Reperfusion schützt Kardiomyozyten vor der Hyperkontraktur.

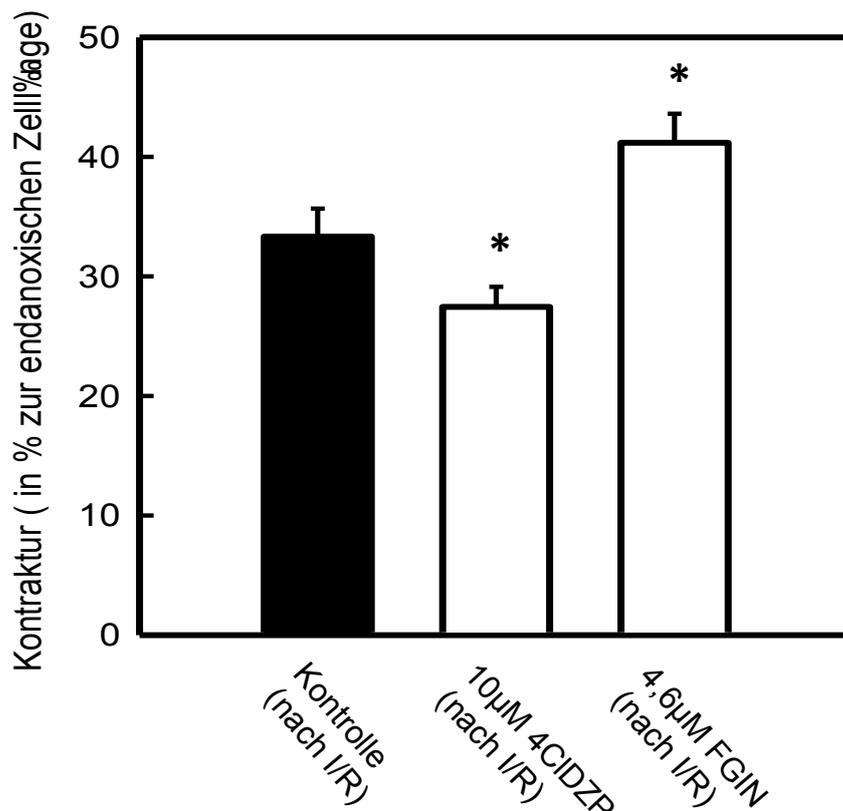


Abb. 4.2a: Kontraktur der Kardiomyozyten nach 10 Minuten Reperfusion. Darstellung der Kontrollbedingung (schwarz) in Anwesenheit von 10 µM 4-Chlorodiazepam und in Anwesenheit von 4,6 µM FGIN-1-27. Dargestellt als Mittelwerte \pm SEM. ($n > 21$; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle).

Die unten stehende Abbildung zeigt exemplarisch den zeitlichen Verlauf der Zelllängenverkürzung während der Reperfusion unter Kontrollbedingungen und unter Inhibierung des mBzR.

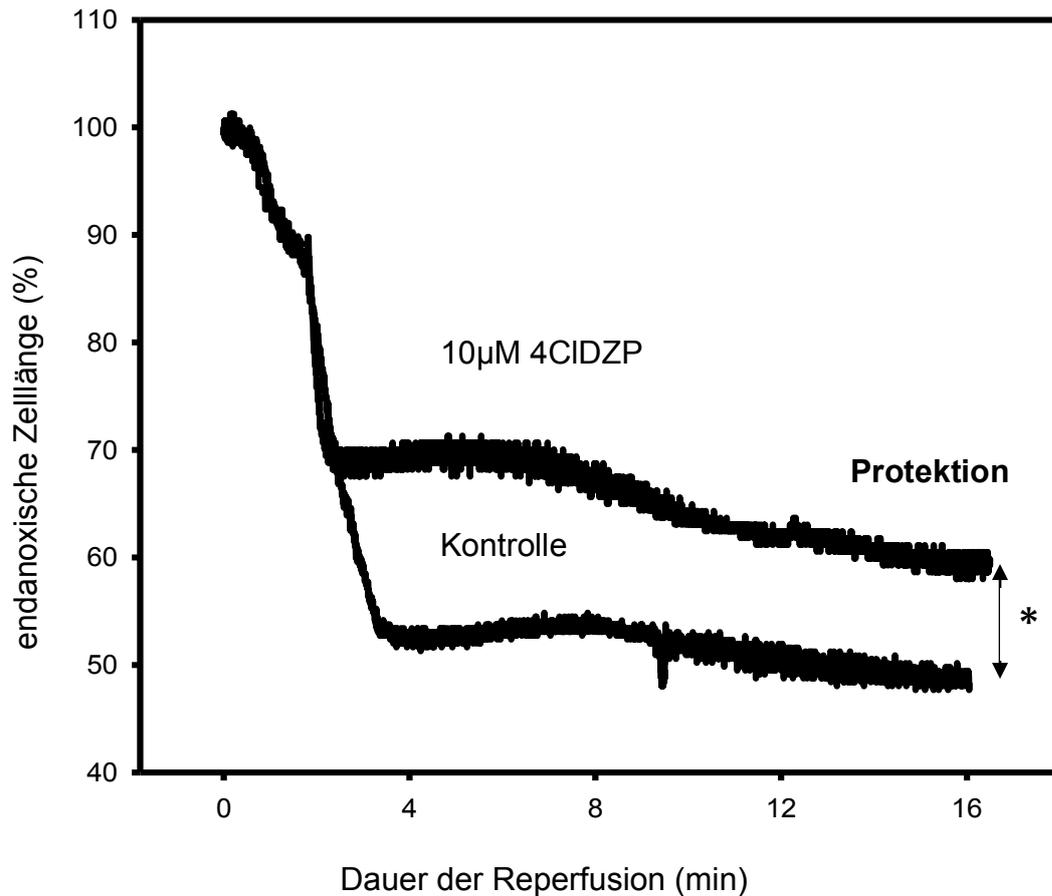


Abb. 4.2b: Schematischer Verlauf der Zelllänge während der Reperfusion unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von 10 µM 4-Chlorodiazepam. Endanoxische Zelllänge auf 100% normiert (* p<0,05 vs. Kontrolle).

Der Zelltod der Kardiomyozyten nach Ischämie und Reperfusion ist die direkte Folge des Reperfusionsschadens und damit eine wichtige Determinante zur Quantifizierung des Schadens auf zellulärer Ebene.

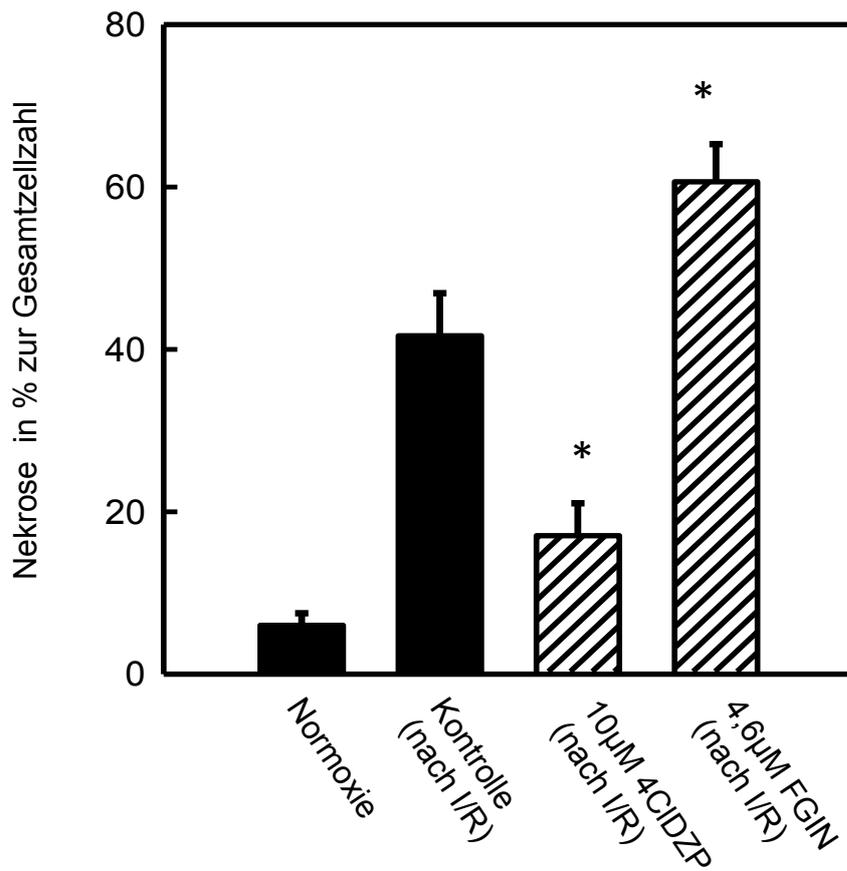


Abb. 4.2c: Darstellung der nekrotischen Zellen nach Ischämie und Reperfusion unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von 10µM 4-Chlorodiazepam und 4,6µM FGIN-1-27. Zusätzlich Abbildung der nekrotischen Zellen nach Normoxie. (Dargestellt als Mittelwerte \pm SEM ($n > 6$; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle)

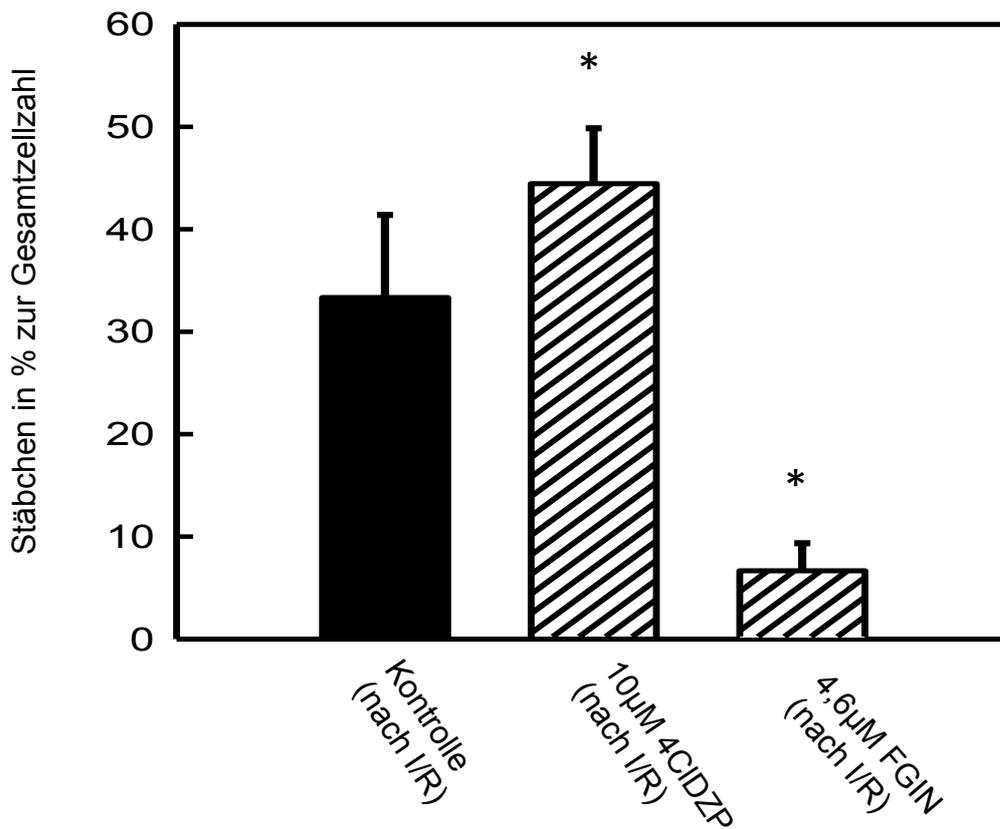


Abb. 4.2.d: Darstellung der vitalen Zellen nach Ischämie und Reperfusion unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von 10 μM 4-Chlorodiazepam und 4,6 μM FGIN-1-27. Dargestellt als Mittelwerte ± SEM (n > 6; * p < 0,05 vs. Kontrolle).

Durch die Inhibierung des mBzR zu Beginn der Reperfusion nach vorausgegangener Ischämie kommt es zu einer deutlichen Abnahme der nekrotischen Zellen in % zur Gesamtzellzahl. Andererseits führt die Aktivierung des mBzR zu einer Zunahme der Nekrose.

4.3 Auswirkungen des mitochondrialen Benzodiazepinrezeptors auf die zytosolische Ca^{2+} -Kinetik nach simulierter Ischämie und Reperfusion

In Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ 4-Chlorodiazepam während der Reperfusion kommt es zu einer signifikanten Abnahme der zytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen. Dabei kann man einen durch 4-Chlorodiazepam verursachten Effekt sowohl auf die Frequenz der Oszillationen beobachten, als auch eine Abnahme der Amplitude der zytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen.

Der Effekt auf die zytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen während der Reperfusion ist in den Abbildungen 4.3a+b dargestellt, der Effekt auf die Ca^{2+} -Amplitude in Abbildung 4.3c

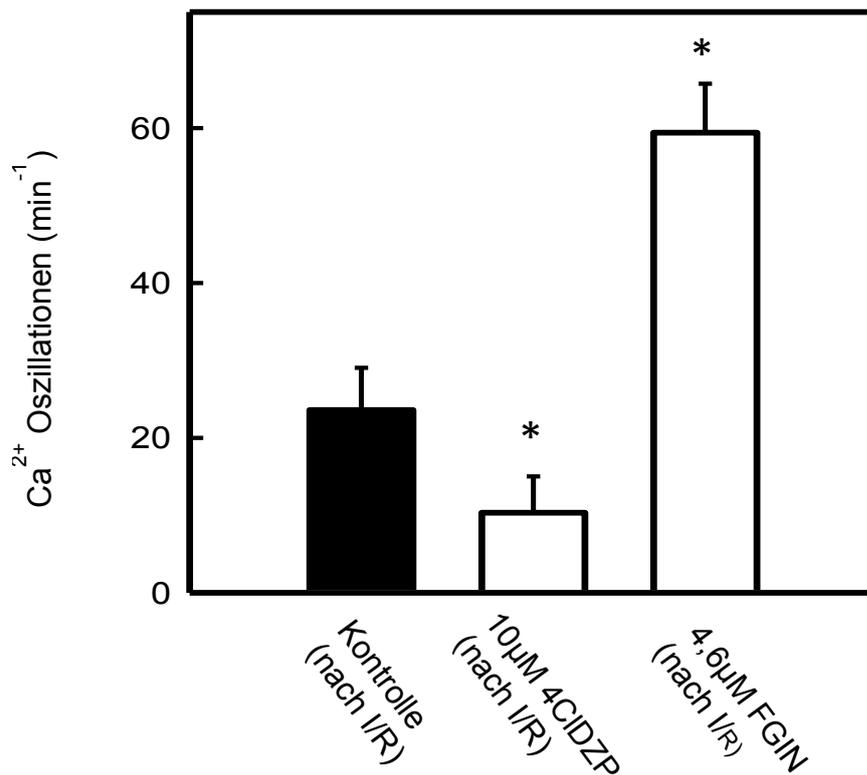


Abb. 4.3a: Zytosolische Ca^{2+} -Oszillationen, angegeben in Oszillationen pro Minute, gemessen mittels Fura-2-Ratio. Dargestellt ist die Frequenz der zytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen in der 5. Minute nach Beginn der Reperfusion unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ 4-Chlorodiazepam und in Anwesenheit von $4,6 \mu\text{M}$ FGIN-1-27. Darstellung der Daten als Mittelwerte \pm SEM ($n > 19$; $p < 0,05$).

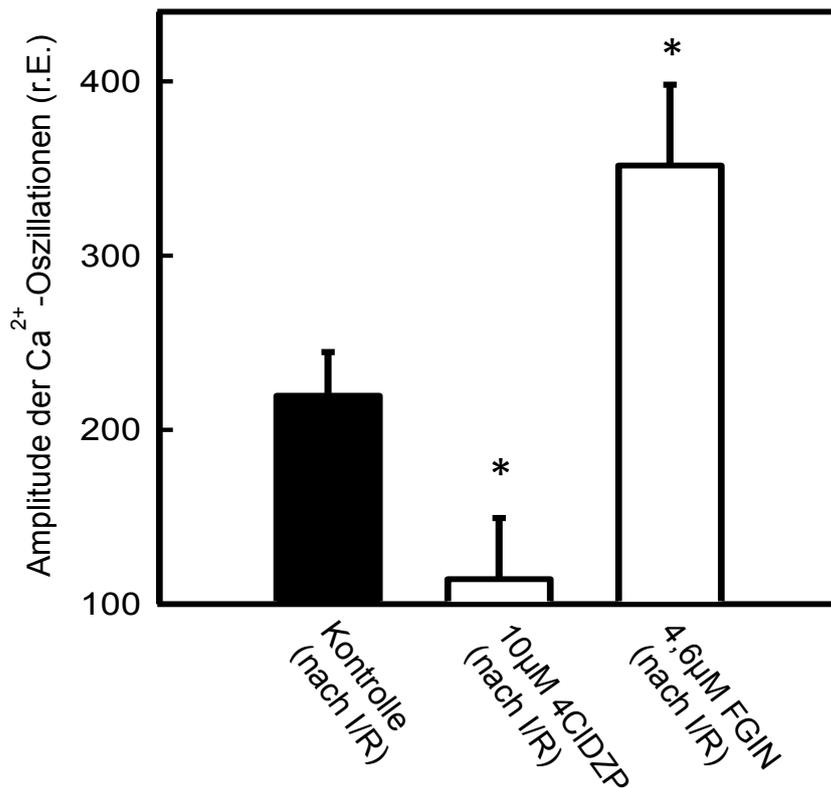


Abbildung 4.3b: Zytosolische Ca²⁺-Amplitude, angegeben als Δ -Fura2-Ratio in relativen Einheiten (r.E.), gemessen als Fura-2-Quotient. Dargestellt sind die Werte der 5. Minute nach Beginn der Reperfusion unter Kontrollbedingungen (schwarz) und in Anwesenheit von 10µM 4-Chlorodiazepam und in Anwesenheit von 4,6µM FGIN-1-27. Darstellung der Daten als Mittelwerte \pm SEM (n > 19; * p < 0,05 vs. Kontrolle).

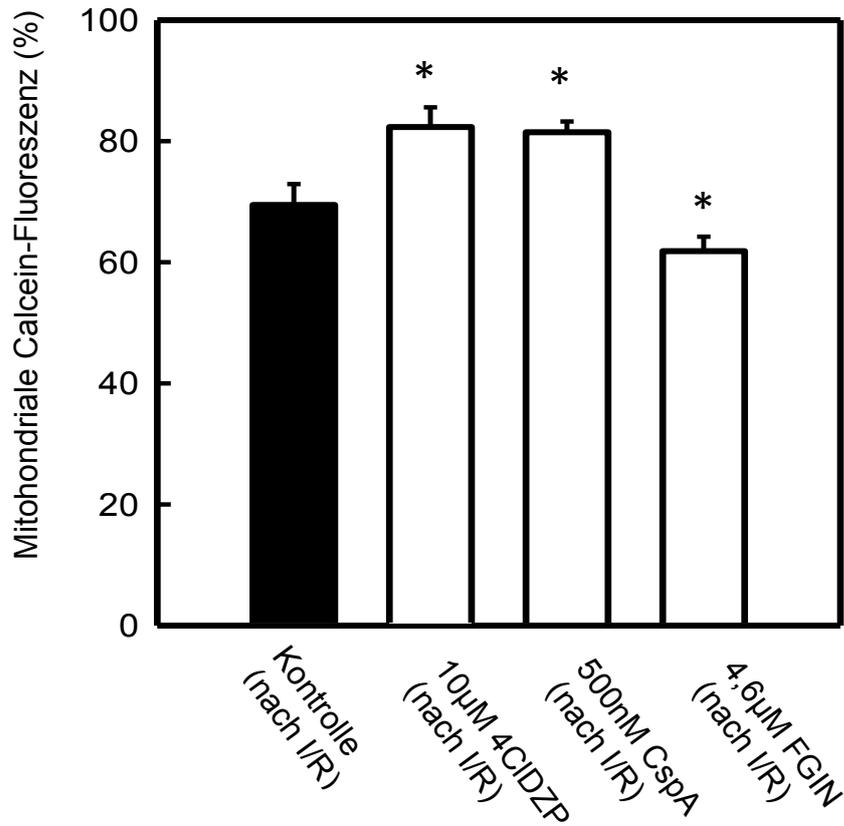
Die Inhibierung des mBzR zu Beginn der Reperfusion mit 4CIDZP führt zu einer deutlichen Abnahme der zytosolischen Calciumkonzentration. Dies zeigt sich zum einen in der deutlichen Abnahme der Frequenz der zytosolischen Ca²⁺-Oszillationen während der Reperfusion, zum anderen in der deutlichen Abnahme der Amplitude der Ca²⁺-Oszillationen.

Die Aktivierung des mBzR führt sowohl zu einer Zunahme der Frequenz als auch der Amplitude der zytosolischen Ca²⁺-Oszillationen.

4.4 Einfluss des mitochondrialen Benzodiazepinrezeptors auf die mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-pore

Die mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-pore (MPTP), Schlüsselfigur in der Entstehung des myokardialen Reperfusionsschadens, bleibt während der Ischämie geschlossen auf Grund des während der Ischämie bestehenden zellulären H^+ , Mg^{2+} , ADP und Phosphat-Haushalt geschlossen und öffnet sich in den ersten Minuten der Reperfusion wenn es zu Änderungen der Ionenzusammensetzung kommt. Durch die Öffnung kommt es zu einem Kollaps des mitochondrialen Membranpotenziales und in Folge dessen zum Tod des Kardiomyozyten. Die Öffnung der MPTP wurde in der vorliegenden Arbeit mit einer Calcein-Cobalt-Fluoreszenz detektiert. Der Fluoreszenzfarbstoff Calcein kann unter physiologischen Bedingungen nicht aus dem Mitochondrium heraus transportiert werden, Calcein gelangt lediglich durch Öffnung der MPTP ins Zytosol. Öffnet sich die MPTP während der Reperfusion kommt es zu einem Verlust des mitochondrialen Calceingehaltes, da Calcein durch die offene MPTP ins Zytosol der Zelle gelangt. Gelangt Calcein ins Zytosol, wird das Fluoreszenzsignal des Calceins durch das sich dort befindliche Cobalt gelöscht und es kommt zu einem Abfall der messbaren Calceinfluoreszenz im Kardiomyozyten. Das Ausmaß des Calceinfluoreszenzsignalsabfalls dient in dieser Arbeit zur Detektion der MPTP-Öffnung.

Unter Zugabe von $10\mu M$ 4'Chlorodiazepam während der Reperfusion kommt es zu einem verminderten Abfall der Calcein-Fluoreszenz im Vergleich zur Kontrolle. Dies spricht für eine verminderte Öffnung der MPTP. Der Effekt von 4CIDZP auf die Öffnung der MPTP ist vergleichbar mit dem Effekt von CspA, einem bekannten Inhibitor der MPTP-Öffnung. Die Zugabe von FGIN-1-27 während der Reperfusion führt jedoch zu einem verstärkten Verlust der mitochondrialen Calcein-Fluoreszenz. Der Verlauf der mitochondrialen Calcein-Fluoreszenz ist in Abbildung 4.2.3a dargestellt.



Abb, 4.4a: Calceinfloureszenz gemessen während der 14. Minute der Reperfusion. Unter Kontrollbedingungen, in Anwesenheit von 10µM 4'Chlorodiazepam, in Anwesenheit von 500nM Csp A und in Anwesenheit von 4,6µM FGIN-1-27. Dargestellt als Mittelwerte ± SEM (n > 20; * p < 0,05 vs. Kontrolle).

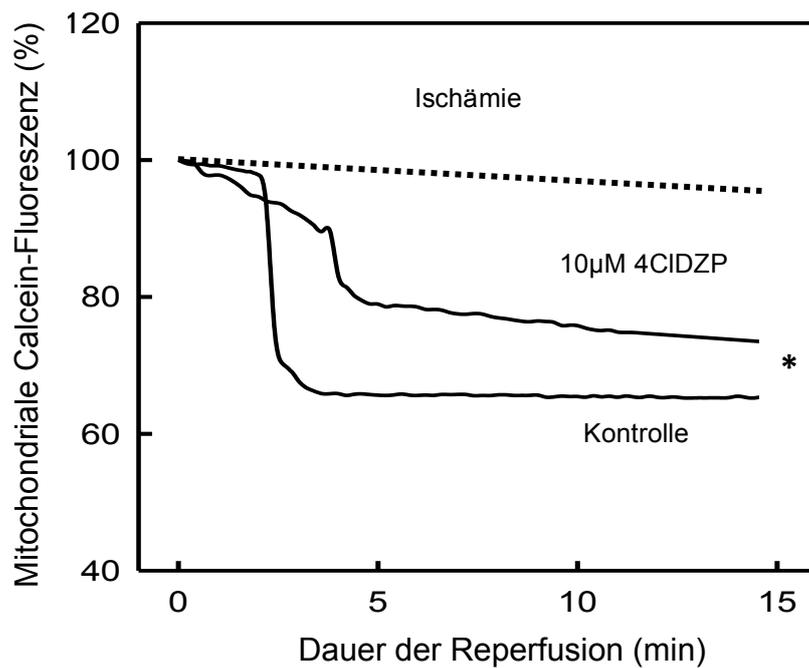


Abb. 4.4b: Verlauf der mitochondrialen Calcein-Fluoreszenz während der Reperfusion. Normierung auf 100% des endanoxischen Ausgangswertes. Unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von 10µM 4-Chlorodiazepam. ($p < 0,05$ vs. Kontrolle).

Die Graphik zeigt den zeitlichen Verlauf der mitochondrialen Calcein-Fluoreszenz während der Reperfusion nach vorausgegangener Ischämie. Die Calcein-Werte wurden auf 100% des endanoxischen Ausgangswertes normiert.

4.5 Einfluss des mitochondrialen Benzodiazepinrezeptors auf das Ausmaß der mitochondrialen reaktiven Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen unter anderem an Komplex I und III der Atmungskette im Rahmen der Oxidativen Phosphorylierung. ROS sind ein bekannter Trigger, die für die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätsporen-Öffnung verantwortlich sind. Durch die Porenöffnung kommt es unter anderem zu einem Zusammenbruch der mitochondrialen Atmungskette und als Folge davon zu einem Untergang der Kardiomyozyten. In der Abbildung 4.5 ist die Menge der reaktiven Sauerstoffspezies nach 13 Minuten Reperfusion gezeigt.

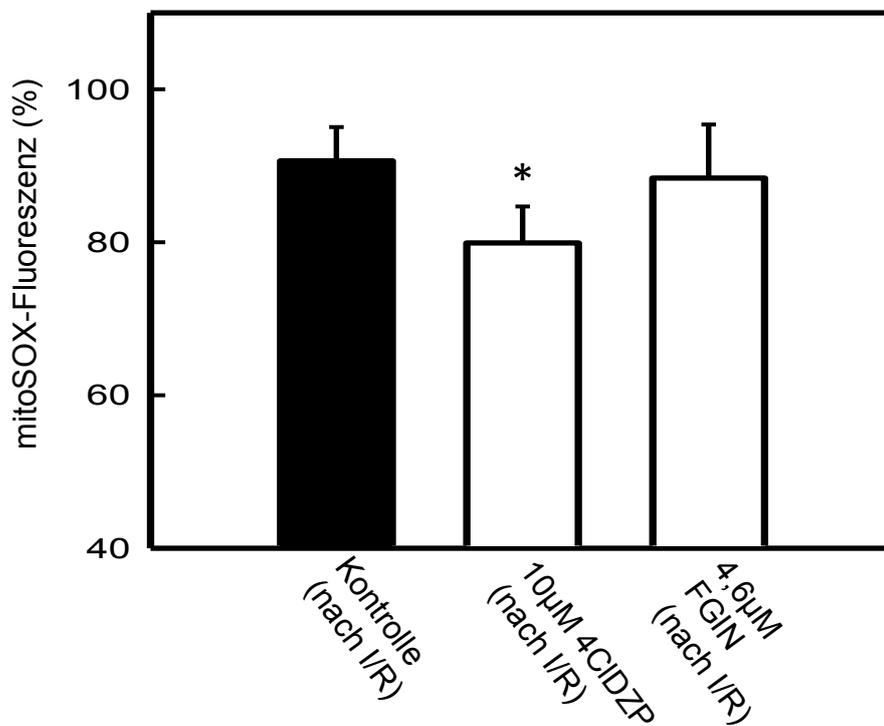


Abb. 4.5: Darstellung der reaktiven Sauerstoffspezies während der Reperfusion. Unter Kontrollbedingungen, in Anwesenheit von 10µM 4-Chlorodiazepam und in Anwesenheit von 4,6µM FGIN-1-27. Darstellung der Daten als Mittelwerte \pm SEM (n > 9; * p < 0,05 vs. Kontrolle). Werte auf 100% des endanoxischen Wertes normiert.

Die Inhibierung des mBzR während der Reperfusion führt es zu einer verminderten Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies. Im Gegensatz dazu führt die Anwesenheit von FGIN-1-27 zu keiner Veränderung der Menge an reaktiven Sauerstoffspezies im Mitochondrium.

4.6 Einfluss des mitochondrialen Benzodiazepinrezeptors auf das mitochondriale Calcium

Während der Ischämie kommt es zu einem Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration. Während der Reperfusion sinkt diese zwar ab, es entstehen aber hochfrequente zytosolische Ca^{2+} -Oszillationen zwischen Sarkoplasmatischem Retikulum und Zytosol. In Folge der daraus resultierenden zytosolischen Ca^{2+} -Überladung kommt es zu einer Ca^{2+} -Aufnahme ins Mitochondrium durch den mitochondrialen Calcium Uniporter (MCU). Unter Kontrollbedingungen kommt es nun durch den mitochondrialen Ca^{2+} -Anstieg zu einem Öffnen der MPTP.

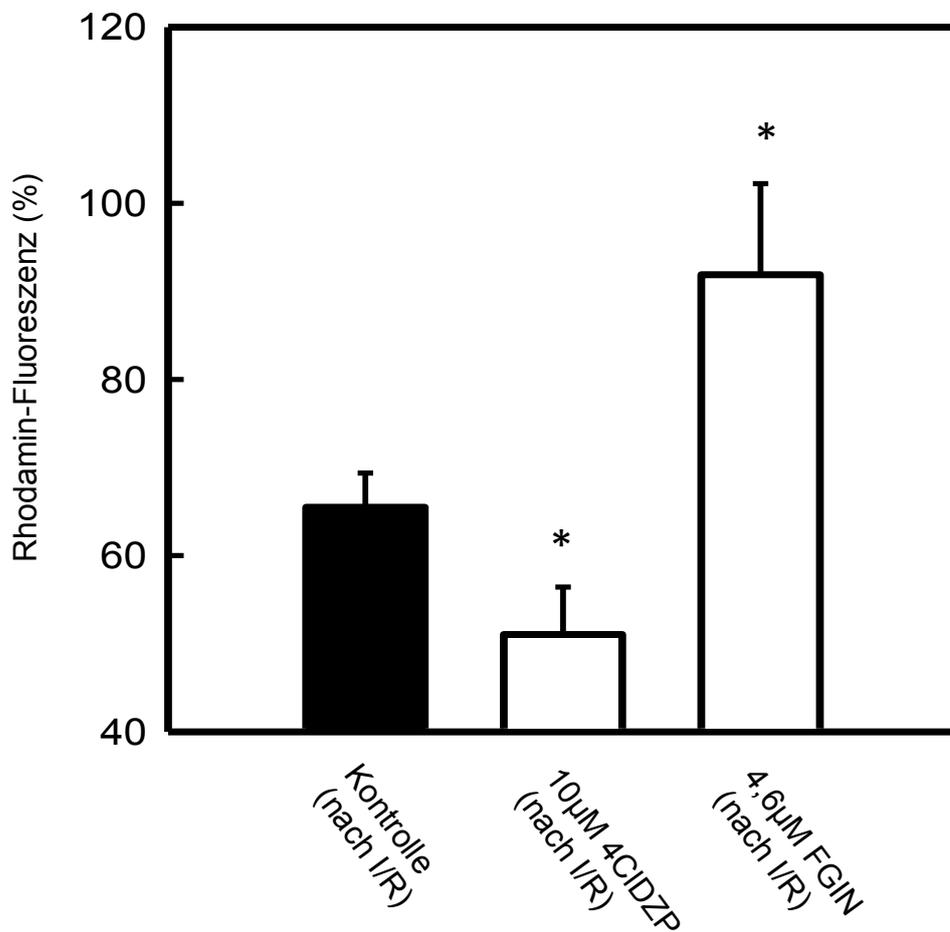


Abbildung 4.6 Darstellung der Menge des mitochondrialen Calciums während der 12. Minute nach Beginn der Reperfusion. Unter Kontrollbedingungen in der Anwesenheit von 10µM 4-Cl-DZP und in Anwesenheit von 4,6µM FGIN-1-2. Darstellung der Daten als Mittelwerte \pm SEM (n > 23; * p < 0,05 vs. Kontrolle). Werte auf 100% des endanoxischen Wertes normiert.

5. Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen,

- 1.) dass die Inhibierung des mBzR während der Reperfusion die Entstehung von Hyperkontraktur nach Ischämie und Reperfusion in isolierten Kardiomyozyten verhindern kann.
- 2.) dass die Inhibierung des mBzR während der Reperfusion die Kardiomyozyten vor Nekrose schützt.
- 3.) dass der mBzR einen günstigen Einfluss auf die zytosolische und mitochondriale Ca^{2+} Homöostase sowie auf die Entstehung von mitochondrialen ROS hat.
- 4.) dass die Protektion vor dem Reperfusionsschaden darauf beruht, dass die Öffnung der MPTP verhindert wird, vermutlich durch eine Interaktion mit dem mitochondrialen Benzodiazepin-Rezeptor.

5.2 Der myokardiale Reperfusionsschaden unter Ischämie und Reperfusion

Die schnelle Entwicklung der Hyperkontraktur während der Reperfusion stellt den wichtigsten Mechanismus bei der Entstehung des akuten myokardialen Reperfusionsschadens dar^{53,54}. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits in vorliegenden Arbeiten zeigen, dass die Entstehung der Hyperkontraktur auf eine unkontrollierte Aktivierung des kontraktilen Apparates zurück zu führen ist, ausgelöst durch die Re-energetisierung der Kardiomyozyten zu Beginn der Reperfusion, gepaart mit einem durch die Ischämie entstandenem erhöhten zytosolischen Ca^{2+} -Spiegel^{2,30,50}. Der während der Ischämie entstandene erhöhte zytosolische Ca^{2+} -Spiegel ist auf einen gesteigerten Ca^{2+} -Influx durch den ATP-Mangel während der Ischämie zurück zu führen. Kommt es bei Beginn der Reperfusion zu einer Re-energetisierung des Kardiomyozyten, so kommt es zu vielfältigen zellulären Vorgängen: die sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase nimmt das im Zytosol angefallene Ca^{2+} in das SR auf. Durch diesen Vorgang kommt es zu erhöhten sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Spiegeln. Dies führt zu einer Aktivierung des am sarkoplasmatischen Retikulum gelagerten RyR. Über diesen Rezeptor und den entstehenden Circulus vitiosus kann Ca^{2+} wieder ins Zytosol freigesetzt werden. Dieser Vorgang führt zu repetitiven zyklischen Ca^{2+} -Oszillationen, die die Entstehung der Hyperkontraktur weiter begünstigen und damit den Reperfusionsschaden bedingen^{31,1,2,46,47,52}. Bei der Entstehung des Reperfusionsschadens ist nicht nur die Fehlfunktion des Sarkoplasmatischen Retikulums von großer Bedeutung, sondern auch die Rolle weiterer Zellorganellen, insbesondere die der Mitochondrien. Kommt es nun im Rahmen der SR-Fehlfunktion zu einer zytosolischen Ca^{2+} -Überladung, so kann zytosolisches Ca^{2+} über den mitochondrialen Calcium-Uniporter (MCU) in das Mitochondrium aufgenommen werden. Im Mitochondrium führt das überschüssige Ca^{2+} zusammen mit den dort an der Atmungskette entstehenden ROS zu einer Öffnung der MPTP²³. Durch die Öffnung dieser 15 kDa großen Pore kommt es zu einem Leck in der mitochondrialen Membran, die zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotenziales und in Folge dessen zu einem Zusammenbruch der Atmungskette führt. Weiterhin kommt es zu einem absoluten Energiemangel und zu Nekrose der Kardiomyozyten^{43,3}. Die

Hyperkontraktur, die letztendlich zum Reperfusionsschaden führt, ist nicht nur auf zellulärer Ebene an Hand einer messbaren Veränderung der Ionenhomöostase nachweisbar, sondern auch histologisch, sowohl in vitro, als auch in vivo^{17,19}. Histologisch sieht man an isolierten Kardiomyozyten eine deutliche Verkürzung der Zelllänge. Im ischämisch-reperfundierten Myokard konnten bereits 1983 Kontraktionsbandnekrosen nachgewiesen werden¹⁶. Diese zeigen sich histologisch als hyperkontrahierte Myofibrillen mit sarkolemmalen Brüchen, die zu einer Zerreißung des Sarkomlemms führen und zum Funktionsverlust der Kardiomyozyten und letztendlich zur Nekrose.

5.3 Die Protektion vor dem myokardialen Reperfusionsschaden durch den mitochondrialen Benzodiazepinrezeptor

Die Verhinderung der Hyperkontraktur stellt eine wichtige Determinante bei der Protektion von Kardiomyozten vor dem Reperfusionsschaden dar. Die Entstehung der Hyperkontraktur beruht auf einer Calcium-Überladung im Zytosol des Kardiomyozyten und dem Entstehen von repetitiven, zyklischen Ca^{2+} -Oszillationen.

Diese Arbeiten zeigen, wie effektiv sich eine Reduktion der zytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen auf die Entstehung des Reperfusionsschaden auswirken. Aus diesem Grund haben wir die Rolle des mitochondrialen Benzodiazepinrezeptors bei der Entstehung von zytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen untersucht.

In der vorliegenden Arbeit ist konnte gezeigt werden, dass die selektive Inhibierung des mBzR durch 4CIDZP zu Beginn der Reperfusion zu einer signifikanten Abnahme der Frequenz der zytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen geführt hat. Auch konnte gezeigt werden, dass die Amplitude der Ca^{2+} -Oszillationen im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich reduziert ist. (Abbildungen 4.3a+b).

Andererseits führt die Aktivierung des mBzR zu vermehrten zytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen, dies gilt sowohl für die Frequenz als auch für die Amplitude dieser Oszillationen.

Durch die schnelle Re-energisierung der Kardiomyozyten zu Beginn der Reperfusion, gepaart mit dem Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels kommt es zu vermehrter Kontraktur, also zu einer übermäßigen Verkürzung, der Kardiomyozyten.

Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die Inhibierung des mBzR zu Beginn der Reperfusion durch die Abnahme des zytosolischen Calciums im Vergleich zur Kontrollgruppe zu Reduktion der Hyperkontraktur der Kardiomyozyten führt (siehe Abbildung 4.2a)

Auch zeigten die durchgeführten Experimente, dass es durch die Abnahme der Hyperkontraktur zusammen mit einer Abnahme der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration während der Reperfusion auch zu einer Abnahme des Anteils an nekrotischen Zellen kommt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass es durch die Inhibierung des mBzR während der Reperfusion zu mehr stäbchenförmigen, d.h. überlebenden Kardiomyozyten in Relation zur Gesamtzellzahl kommt (siehe Abbildungen 4.2c+d)

Im Gegensatz dazu führt die Aktivierung des mBzR in der vorliegenden Arbeit mit FGIN-1-27 sowohl zu einer Zunahme der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration als auch zu einer Zunahme der Kontraktur. In Zusammenschau der durchgeführten Experimente führt die Aktivierung des mBzR auch zu einer Zunahme an nekrotischen Kardiomyozyten in Relation zur Gesamtzellzahl nach Ischämie und Reperfusion.

Die folgende Abbildung 5. 3.1 zeigt eine schematische Übersicht über die zellulären Vorgänge zu Beginn der Reperfusion und einige der bisher untersuchten protektiven Mechanismen.

Eine erhöhter zytosolischer Ca^{2+} -Spiegel zu Beginn der Reperfusion führt zu einer vermehrten Aufnahme von Ca^{2+} über den MCU ins Mitochondrium. Der mitochondriale Ca^{2+} -Anstieg ist ein bekannter Auslöser für die Öffnung der MPTP³. Kommt es zu einer Öffnung der MPTP, kommt es zu einem Verlust der mitochondrialen Funktion und damit zu einem Funktionsverlust des Kardiomyozyten. Es konnte bereits in vielen Arbeiten gezeigt werden, dass sich die Hemmung der MPTP-Öffnung protektiv auf Kardiomyozyten und das gesamte Myokard auswirkt. So führt eine pharmakologische Inhibierung der MPTP-Öffnung zu Beginn der Reperfusion zu reduzierter Infarktgröße^{7,55 25}.

Öffnet sich die mitochondriale Permeabilitäts-Transition Pore, kommt es zu einem irreversiblen Verlust der mitochondrialen Funktion, da der Protonengradient zwischen innerer und äußerer mitochondrialer Membran, der Antrieb der Atmungskette, zusammenbricht. Dies führt zu einem Funktionsverlust der Atmungskette. Durch den hieraus entstehenden Energiemangel kommt es zum Zelluntergang und damit zur Nekrose der Kardiomyozyten.

Es sind verschiedene Faktoren bekannt, die zum Öffnen der MPTP führen. Neben bekannten zellulären Regulationsprozessen, Aktivierung der PKC oder der PI3 Kinase⁵⁷, führt auch die Zunahme an Reaktiven Sauerstoffspezies, die an den einzelnen Komplexen der Atmungskette während der Reperfusion entstehen, zu einer Öffnung der MPTP. Weiterhin führt auch ein Anstieg des mitochondrialen Calciums während der Reperfusion zu einer Öffnung der MPTP^{3,14}.

Auf Grund der oben beschriebenen Relevanz der MPTP bei der Protektion vor dem Reperfusionsschaden wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Inhibierung des mBzR das Öffnen der MPTP verhindern kann. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass 4CIDZP die Öffnung der MPTP verhindern kann. Dazu wurde die

Freisetzung von Calcein aus dem Mitochondrium fluoreszenzmikroskopisch gemessen. So kommt es durch die Inhibierung des mBzR während der Reperfusion zu einem weniger starken Abfall des Calcein-Signals im Vergleich zur Kontrollgruppe und somit zu einer verminderten Öffnung der MPTP. Die Vergleichsuntersuchung mit CspA, einem bekanntem, selektiven und potenten Inhibitor der MPTP führt zu einem vergleichbaren Einfluss auf den mitochondrialen Calceingehalt. Die Hemmung der MPTP-Öffnung durch die Inhibition des mBzR ist also vergleichbar mit der inhibitorischen Wirkung durch CspA (Abbildung 4.4a). Durch die verminderte Öffnung der MPTP stabilisiert sich das mitochondriale Membranpotenzial. Hierüber kommt es zu keinem Verlust des Protonengradienten über der mitochondrialen Membran und die Atmungskette ist weiterhin in der Lage, ATP zu generieren und es kommt zu keinem absoluten Energiemangel der Zelle und damit nicht zur Entstehung von Nekrose.

Die Aktivierung des mBzR führt jedoch zu einem deutlich größeren Abfall des Calcein-Signals während der Reperfusion und so kommt es zu vermehrten Öffnung der MPTP. Nachdem nun gezeigt werden konnte, dass es durch die Inhibierung des mBzR zu einer verminderten Öffnung der MPTP kommt, untersuchten wir die Mechanismen die dieser Protektion zu Grunde liegen. Bekannte Mechanismen die zur Öffnung der MPTP zu Beginn der Reperfusion führen sind unter anderem mitochondrial entstehende ROS und ein Anstieg des mitochondrialen Ca^{2+} . Es konnte auch gezeigt werden, dass es durch 4CIDZP zu einem Abfall der ROS während der Reperfusion kommt (siehe Abbildung 4.5). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass es auch zu einem Abfall des mitochondrialen Calciums kommt (siehe Abbildung 4.6). Diese Befunde legen nahe, dass es im Rahmen der protektiven Wirkung von 4CIDZP durch die Inhibition der MPTP-Öffnung und den zu Grunde liegenden Mechanismen über die Reduktion des mitochondrialen Ca^{2+} und der mitochondrialen ROS zu einer Stabilisierung der mitochondrialen Funktion während der Reperfusion kommt.

Die Abbildung 5.3.2 zeigt eine Zusammenfassung der oben beschriebenen Befunde auf Ebene der Mitochondrien.

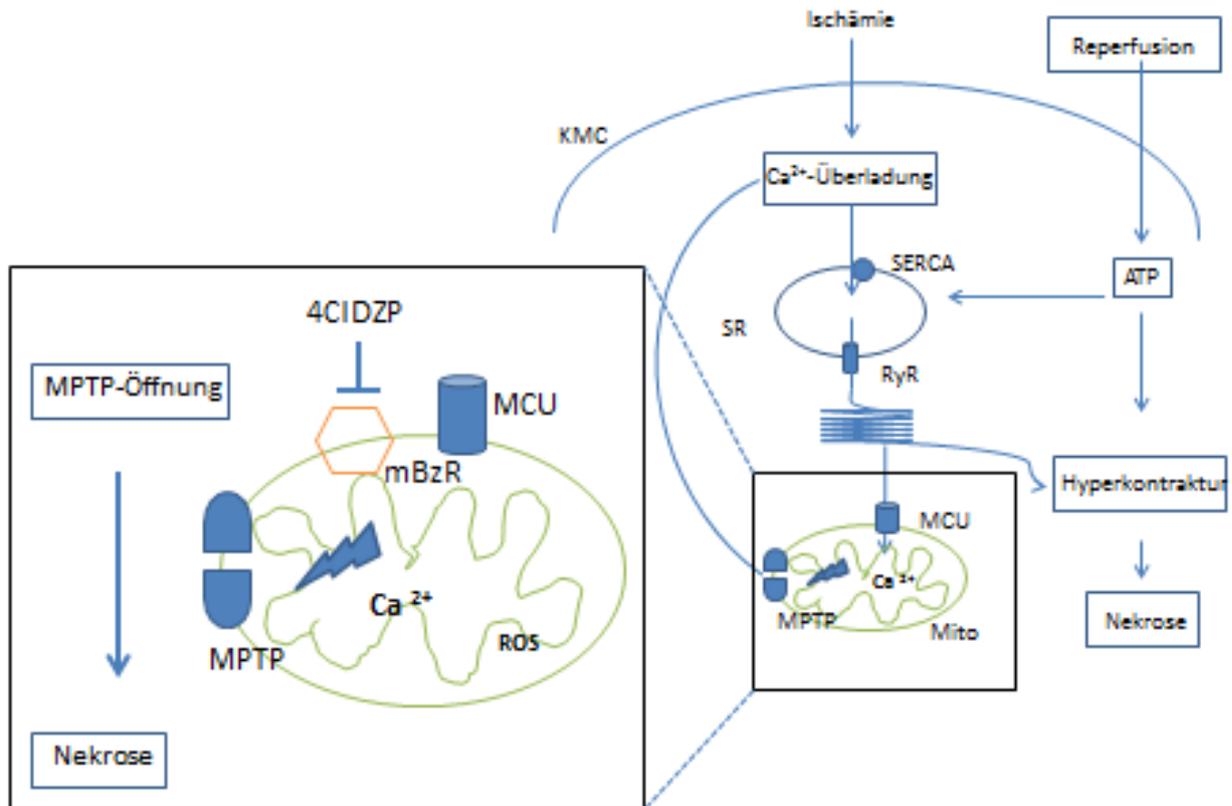


Abbildung 5.3b Zusammenfassung der Prozesse, die am Mitochondrium während der Reperfusion in Anwesenheit von 4CIDZP beobachtet werden können.
 4CLDZP: 4'Clorodiazepam, ATP: Adenosin Tri-Phosphat, BDM: 2,3-Butanedione monoxime, Ca^{2+} : Calciumionen, KMC: Kardiomyozyt, mBzR; mitochondrialer Benzodiazepinrezeptor, MPTP: mitochondriale Permeabilitäts Transitions-pore ROS: Reaktive Sauerstoffspezies, RyR: Ryanodin Rezeptor, SR: Sarkoplasmatisches Retikulum,

Diese verschiedenen, oben beschriebenen Mechanismen tragen dazu bei, dass die Inhibition des mBzR zu einer Abnahme der nekrotischen Zellen nach Ischämie und Reperfusion führt.

Im Gegensatz zu den bisher aufgeführten Ergebnissen führt die Aktivierung des mBzR zu Beginn der Reperfusion zu einer Zunahme der Kontraktur (siehe Abbildung 4.2a) und zu einer Zunahme der zytosolischen Calcium-Oszillationen. Zusätzlich kommt es zu einer vermehrten Öffnung der MPTP (Abbildung 4.4a) Dies lässt sich durch einen Anstieg des mitochondrialen Ca^{2+} während der Reperfusion erklären (Abbildung 4.6) .

Die nachfolgende Abbildung zeigt einen Überblick über die während der Reperfusion stattfindenden Vorgänge auf zellulärer Ebene die durch die Inhibition des mBzR zu einer Protektion des Kardiomyozyten vor dem Reperfusionsschaden beitragen.

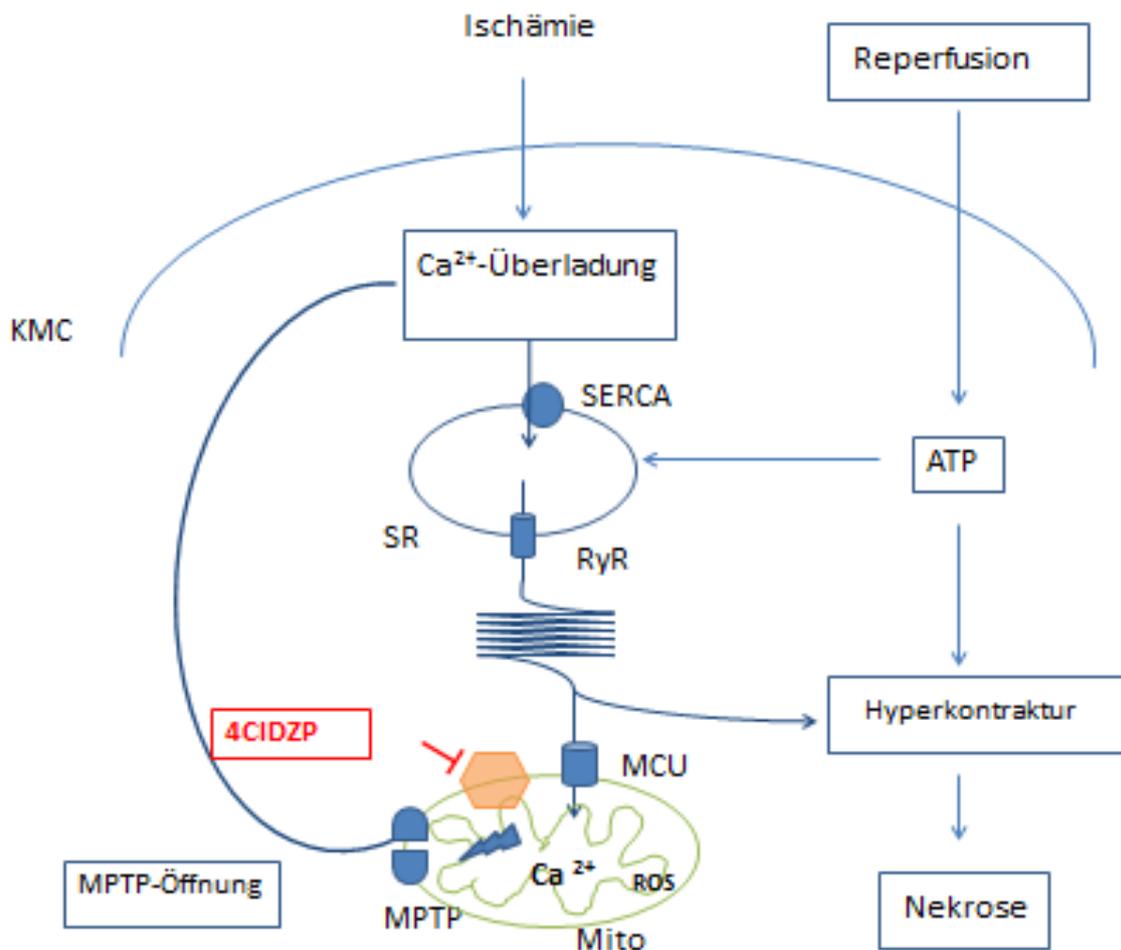


Abbildung 5.3.c Zusammenfassung der Prozesse, die im Kardiomyozyten während der Reperfusion in Anwesenheit von 4CIDZP beobachtet werden können.
 4CIDZP: 4'-Chlorodiazepam, ATP: Adenosin Tri-Phosphat, Ca²⁺: Calciumionen, KMC: Kardiomyozyt, mBzR; mitochondrialer Benzodiazepinrezeptor, MPTP: mitochondriale Permeabilitäts Transitions-pore ROS: Reaktive Sauerstoffspezies, RyR: Ryanodin Rezeptor, SR: Sarkoplasmatisches Retikulum.

Eine mögliche weitere Erklärung für den protektiven Effekt der Inhibition des mBzR liegt im Aufbau des mBzR. Die genaue Ultrastruktur ist aktuell noch nicht bekannt, es besteht jedoch die Vermutung, dass unter anderem ein voltage-dependent-anion-channel (VDAC) beteiligt ist⁵⁸. Dieser ist womöglich in der Lage, vermehrt Ca²⁺-Ionen während der Reperfusion ins Mitochondrium aufzunehmen und dadurch den mitochondrialen Ca²⁺-Spiegel zu erhöhen. Ein erhöhter mitochondrialer Ca²⁺-Spiegel kann die Öffnung

der MPTP beeinflussen und über diesen Mechanismus zum Kollaps des mitochondrialen Membranpotenziales und darüber hinaus zum Verlust der mitochondrialen Funktion kommen. Kommt es zu einem Energiedefizit im Mitochondrium, so kommt es zu Zelluntergang und Nekrose. Für diese These spricht die Tatsache, dass die Inhibierung des mBzR mit 4CIDZP zu einer Abnahme des mitochondrialen Ca^{2+} führt und darüber hinaus zu einer verminderten MPTP Öffnung und über diesen Mechanismus nur vermutet werden kann, dass es auch zu einer Stabilisation des mitochondrialen Membranpotenziales kommt.

Für den mBzR konnten bisher nicht nur direkte zelluläre Effekte in isolierten Kardiomyozyten als auch in anderen Geweben bei Regulationsprozessen beschrieben werden, sondern auch eine entscheidende Rolle bei der Regulation apoptotischer Vorgänge. Der Vorgang der Apoptose beschreibt einen genau geregelten zellulären Prozess, der zum gerichteten Untergang einer Zelle führt. Dieser findet nicht nur im gesunden Gewebe statt sondern ist auch entscheidend in der Entstehung von Neoplasien. Aus diesem Grund gibt es vielfältige endogene und exogene Stimuli, die zur Einleitung der Apoptose führen. Physiologisch ist die Apoptose bei Zellen mit defektem Erbmaterial oder aber auch in der Ontogenese. Auf zellulärer Ebene sind Mitochondrien entscheidend bei Einleitung der Apoptose:

Ein wichtiger Schritt bei der Entstehung der Apoptose ist das Öffnen der MPTP, wodurch es zur Ruptur der mitochondrialen Membran und in der Folge auch zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotenziales $\Delta\Psi_m$ kommt. In der mitochondrialen Matrix, zwischen innerer und äußerer mitochondrialer Membran gelegen, befinden sich verschiedene Caspasen und Cytochrome. Kommt es nun zu der Öffnung der MPTP und zur Ruptur der mitochondrialen Membran, so werden Caspasen und Cytochrome in das Zytosol der jeweiligen Zelle freigesetzt und es kommt zur Initiierung des kontrollierten Zelltod. ³².

Klinisch bedeutsam ist die Regulation der Apoptose besonders bei der Entstehung von Neoplasien, so gibt es bekannte Proto-Onkogene die zu einer veränderten Regulation der Apoptose führen. Eine bekannte Familie an Genen die eine große Rolle spielen ist die B-Cell Lymphome 2 (Bcl-2) Genfamilie. Bekannte Vertreter sind z.B. das Bax-Gen, dass pro-apoptotisch wirkt oder aber das Bcl-2 Gen mit anti-apoptotischer Funktion ¹¹. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Bcl-2 die Öffnung der MPTP hemmen kann. Durch die verminderte Öffnung der MPTP kommt es zu einer Stabilisierung der

mitochondrialen Membran und es können keine Caspasen aus der mitochondrialen Matrix ins Zytosol freigesetzt werden.

Die Arbeitsgruppe um Hirsch et al. konnte zeigen, dass ein prototypischer Ligand des mBzR 1-(2-Chlorophenyl-N-methylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamide (PK11195) in der Lage ist, den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotenziales zu induzieren und dadurch zu einer vermehrten Entstehung von Apoptose zu führen. Auch konnte gezeigt werden, dass PK11195 den anti-apoptotischen Effekt des Bcl-2 aufheben kann, durch den direkten Wirkmechanismus am Mitochondrium²⁹. Auf zellulärer Ebene liegt diesem Regulationsmechanismus die Modulation des Ca^{2+} -Haushaltes zu Grunde. So kommt es in Anwesenheit von PK11195 zu einem Anstieg des Ca^{2+} im endoplasmatischen Retikulum und des mitochondrialen Ca^{2+} ¹⁰. Im Gegensatz dazu ist dieser Effekt mit dem Benzodiazepin Diazepam nicht möglich, so dass davon ausgegangen werden muss, dass es unterschiedliche Bindungsstellen am mBzR gibt²⁹. Diese Ergebnisse machen deutlich, wie wichtig es ist, weitere zelluläre Mechanismen und Wirkungsweisen des mBzR zu untersuchen.

5.4 Klinische Relevanz der Protektion durch den mitochondrialen Benzodiazepinrezeptor

Der mBzR ist im Körper ubiquitär auf verschiedensten Zellen und Geweben vorhandenen und spielt bei vielfältigen Regulationsprozessen eine Rolle⁵⁸. So konnte 2005 von Akar et al. gezeigt werden, dass die Inhibierung des mBzR während der Reperfusion im Tiermodell, an ganzen Kaninchenherzen, vor reperfusions-induzierten Arrhythmien schützt.⁴ Von Brown et al. konnte ebenfalls im Tiermodell, also am ganzen Kaninchenherzen, als auch an isolierten Kardiomyozyten von Kaninchen, zeigen, dass die Inhibierung des mBzR im Ischämie-Reperfusionsmodell vor postinfarkt-bedingten Arrhythmien schützen kann und das mitochondriale Membranpotenzial während der Reperfusion stabilisiert wird⁹. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Anwesenheit von 4CIDZP während der Reperfusion die postischämische, kontraktile Funktion des Myokards an isolierten Kardiomyozyten nach Ischämie und Reperfusion verbessert.⁵⁹

In einem *in vitro* Modell isolierter kardialer Mitochondrien aus adulten Ratten konnte kürzlich gezeigt werden, gezeigt werden, dass ein neuer Ligand des mBzR, TRO40303, auch einen kardioprotektiven Effekt ausüben kann. Dieser Ligand bindet spezifisch an eine Cholesterol-Bindungsstelle und führt zu verminderter Permeabilität der mitochondrialen Membran und ist in der Lage, die mitochondriale Funktion zu stabilisieren.^{40,49}

In der vorliegenden Arbeit haben wir an einem Modell mit isolierten Kardiomyozyten gezeigt, dass eine Hemmung des mBzR vor dem Entstehen des myokardialen Reperfusionsschadens schützen kann. Der protektiven Wirkung liegt die Beeinflussung von Ca^{2+} -Oszillationen, Hyperkontraktur, MPTP-Öffnung und letztendlich die Verhinderung der Nekrose zu Grunde. Diese Ergebnisse tragen zu einem besseren Verständnis der Mechanismen auf zellulärer Ebene bei. Dies ist eine Voraussetzung dafür, die Inhibition des mBzR auch in einem *in vivo* Modell und später in der Klinik anwenden zu können.

Eine Reihe von *in vitro* bereits als erfolgsversprechend klingende pharmakologische oder mechanistische Verfahren wurde bereits in kleineren klinischen Studien erprobt. So konnte für Postconditioning gezeigt werden, dass es sowohl *in vitro*, als auch *in vivo*

zu einer Reduktion des Reperfusionsschadens und der Infarktgröße kommt^{55,56}. Postconditioning beschreibt repetitive Zyklen von Ischämie und Reperfusion zu Beginn des eigentlichen Reperfusionsvorganges. Auf zellulärer Ebene liegt der durch Postconditioning vermittelten Protektion eine Veränderung der Erholung des zytosolischen pH-Wertes zu Grunde, es kommt jedoch ebenfalls zu einer Abnahme der zytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen und zu einer verminderten Öffnung der MPTP.⁵¹

Ein weiterer bisher erfolgreich *in vitro* und *in vivo* erprobter klinischer Ansatz ist die selektive Hemmung der MPTP-Öffnung. Die genaue Ultrastruktur der MPTP ist noch nicht im Detail bekannt, ein wichtiger Bestandteil der MPTP ist das Protein Cyclophilin-D (Cyp D). Es konnte gezeigt werden, dass dessen selektive Hemmung mit Cyclosporin A die Öffnung der MPTP verhindert, sowohl im Tiermodell als auch in einer Pilotstudie in Menschen.^{21 24 26,42}

Die oben beschriebenen und bereits klinisch erfolgreich erprobten Mechanismen sind ein erster Grundstein in der klinischen Therapie des akuten Reperfusionsschadens. Die vorliegenden Daten im Zusammenhang mit der Inhibition des mBzR ermöglichen eine weitere Möglichkeit den akuten Reperfusionsschaden zu verhindern.

6. Zusammenfassung

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Inhibierung des mitochondrialen Benzodiazepinrezeptors (mBzR) isolierte Herzen von Kaninchen nach Ischämie und Reperfusion vor post-reperfusionbedingten Arrhythmien schützen kann. In der vorliegenden Studie haben wir untersucht, ob die Inhibition des mBzR auch isolierte ventrikuläre Kardiomyozyten vor zytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen und vor daraus resultierender Nekrose schützen kann. Des Weiteren wollten wir untersuchen ob eine verminderte Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts Transistionspore (MPTP) diesem protektivem Mechanismus zu Grunde liegt.

Zur Durchführung der Versuche verwendeten wir isolierte ventrikuläre Kardiomyozyten adulter männlicher Wistar-Ratten. Diese wurden für 60 Minuten mit einem hypoxischen Medium und anschließend mit einem normoxischen Medium perfundiert um Ischämie und Reperfusion zu simulieren. Zelllänge, zytosolisches Ca^{2+} und das Öffnen der MPTP wurden mit den Fluoreszenzfarbstoffen Fura-2-AM bzw. Calcein-2AM detektiert. Mitochondriales Calcium wurde mit Rhodamin gemessen. Der mBzR wurde selektiv mit $10\mu\text{M}$ 4CIDZP ($10\mu\text{M}$) inhibiert, aktiviert wurde er mit $4,6\mu\text{M}$ FGIN-1-27. Die MPTP wurde selektiv mit 500nM Cyclosporin A inhibiert, jeweils während der Reperfusion.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es durch die Inhibition des mBzR während der Reperfusion zu einer deutlichen Abnahme sowohl der Frequenz der zytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen als auch der Amplitude kam. Auch das Ausmaß der Hyperkontraktur und der Nekrose wurde signifikant reduziert. Der mitochondriale Calcein-Verlust, als Surrogatmarker für die MPTP-Öffnung, konnte durch die Inhibition des mBzR deutlich reduziert werden. Der Effekt war vergleichbar mit dem von CspA, einem bekannten, potenten MPTP-Inhibitor. Auch zeigte sich eine signifikante Abnahme der Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und des mitochondrialen Calciums während des Reperfusion.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung des mBzR Kardiomyozyten vor reperfusion-induzierter Nekrose schützt, indem es zu einer Abnahme der Ca^{2+} -Oszillationen kommt. Zusätzlich zeigt die vorliegende Arbeit dass es zu einer reduzierten Öffnung der MPTP kommt. Diesem Mechanismus liegt am ehesten eine Interaktion der MPTP mit dem mBzR zu Grunde, wahrscheinlich durch einen verminderten Gehalt an mitochondrialem Calcium.

7. Summary

Inhibition of the mitochondrial benzodiazepine receptor (mBzR) exhibits cardio-protective effects towards development of arrhythmia during ischemia and reperfusion in isolated rat heart. The present study investigated whether inhibition of the mBzR protects isolated cardiomyocytes against Ca^{2+} oscillation-induced necrosis and whether this is due to interaction with the mitochondrial permeability transition pore (MPTP).

Methods: Isolated adult rat cardiomyocytes were superfused for 60 min with a hypoxic buffer and then reperfused with a normoxic buffer to simulate ischemia and reperfusion, respectively. Cell length, cytosolic Ca^{2+} and MPTP opening were analysed using fura-2 or calcein, respectively. The concentration of mitochondrial Ca^{2+} was measured using rhodamine. The mBzR inhibitor 4Cl DZP (10 μM), an activator of the mBzR, FGIN-1-27 (4.6 μM), or an inhibitor of the MPTP, cyclosporine A (Csp A; 500 nM), were applied during reperfusion

Results: Inhibition of mBzR during reoxygenation markedly reduced the frequency and amplitude of cytosolic Ca^{2+} oscillations. The extent of cardiomyocyte-contracture was markedly reduced, also the extent of necrosis was markedly reduced. The reperfusion-induced loss of mitochondrial calcein, which indicates MPTP opening, was significantly reduced by inhibition of mBzR. The effect was comparable with CspA, a known inhibitor of MPTP. Mitochondrial Ca^{2+} levels were notably reduced by inhibition of mBzR.

Conclusions: The present study shows that inhibition of the mBzR protects cardiomyocytes against reperfusion-induced necrosis by reducing Ca^{2+} oscillations. Furthermore, the data demonstrate a reduced opening of MPTP due to an interaction with mBzR, probably due to a decreased mitochondrial Ca^{2+} -load.

8. Abkürzungsverzeichnis

4CIDZP	4'-Chlorodiazepam (Ro5-4864)
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
Bcl-2	B-Cell-Lymphome 2
BDM	2,3-Butanedione-Monoxime
Ca ²⁺	Calcium
CK	Kreatin Kinase
CspA	Cyclosporin A
Cyp D	Cyclophilin D
DBI	Diazepam Binding Inhibitor
FGIN-1-27	N,N-di-n-hexyl-2-(4-fluorophenyl)indole-3-acetamide
H ⁺	Wasserstoff-Ionen
IMAC	Inner mitochondrial anion channel
IMM	Innere mitochondriale Membran
K ⁺	Kalium
KMC	Kardiomyozyt
KHK	Koronare Herzkrankheit
LVEDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck
mBzR	mitochondrialer Benzodiazepin Rezeptor
MI	Myokardinfarkt
MPTP	mitochondriale Permeabilitäts Transitions Pore
MCU	Mitochondrialer Calcium Uniporter
Na ²⁺	Natrium
OMM	Äußere mitochondriale Membran
PK1195	1-(2-chlorophenyl-n-methylpropyl)-3-isoquinolincarboxamide
PLA2	Phospholipase A2
RyR	Ryanodin-Rezeptor
SERCA	Calcium- ATPase des Sarcoplasmatischen Retikulums
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TTN	Triakontatetraneuropeptide
VDAC	voltage-dependent anion channel

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1a	Schematische Darstellung der Vorgänge während der Reperfusion	5
Abbildung 1.1.b	Zelluläre Vorgänge zu Beginn der Reperfusion, die zu Hyperkontraktur und Nekrose führen; ebenfalls zeigt diese Abbildung einen Ausschnitt der bekannten protektiven Mechanismen	7
Abbildung 1.2	Aufbau des mitochondrialen Benzodiazepinrezeptors	9
Abbildung 3.1	Vereinfachte schematische Darstellung des Versuchsaufbaus	21
Abbildung 4.1a	Kardiomyozyten zu Beginn der Ischämie	29
Abbildung 4.1b	Kardiomyozyten während der Ischämie	29
Abbildung 4.1c	Kardiomyozyten während der Reperfusion	29
Abbildung 4.1d	Exemplarische Darstellung der zytosolischen Calcium-Konzentration während der Ischämie und der Reperfusion unter Kontrollbedingungen	30
Abbildung 4.2a	Kontraktur der Kardiomyozyten nach 10 Minuten Reperfusion	31
Abbildung 4.2b	Schematischer Verlauf der Zelllänge während der Reperfusion unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von 10 μ M 4-Chlorodiazepam	32

Abbildung 4.2c	Darstellung der nekrotischen Zellen nach Ischämie und Reperfusion unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von 10µM Chlorodiazepam und 4,6 µM FGIN-1-27.	33
Abbildung 4.2d	Darstellung der vitalen Zellen nach Ischämie und Reperfusion unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von 10µM 4-Chlorodiazepam und 4,6µM FGIN-1-27.	34
Abbildung 4.3a	Zytosolische Ca ²⁺ -Oszillationen, angegeben in Oszillationen pro Minute, gemessen mittels Fura-2-Ratio.	35
Abbildung 4.3b	Zytosolische Ca ²⁺ -Amplitude, angeben als Δ-Fura2-Ratio in relativen Einheiten (r.E.), gemessen als Fura-2-Quotient.	36
Abbildung 4.4a	Calceinfluoreszenz gemessen während der 14. Minute der Reperfusion	38
Abbildung 4.4b	Verlauf der mitochondrialen Calcein-Fluoreszenz während der Reperfusion.	39
Abbildung 4.5	Darstellung der reaktiven Sauerstoffspezies während der Reperfusion.	40
Abbildung 4.6	Darstellung der Menge des mitochondrialen Calciums während der 12. Minute nach Beginn der Reperfusion.	41

Abbildung 5.3b	Zusammenfassung der Prozesse, die am Mitochondrium während der Reperfusion in Anwesenheit von 4CIDZP beobachtet werden können.	48
Abbildung 5.3c	Zusammenfassung der Prozesse, die im Kardiomyozyten während der Reperfusion in Anwesenheit von 4CIDZP beobachtet werden können.	59

10. Literaturverzeichnis

1. Abdallah Y, Gkatzoflia A, Gligorievski D, et al. Insulin protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture by a survival pathway targeting SR Ca²⁺ storage. *Cardiovascular Research*. 2006;70(2):346–353. doi:10.1016/j.cardiores.2006.02.020.
2. Abdallah Y, Gkatzoflia A, Pieper H, et al. Mechanism of cGMP-mediated protection in a cellular model of myocardial reperfusion injury. *Cardiovascular Research*. 2005;66(1):123–131. doi:10.1016/j.cardiores.2005.01.007.
3. Abdallah Y, Kasseckert SA, Iraqi W, et al. Interplay between Ca²⁺ cycling and mitochondrial permeability transition pores promotes reperfusion-induced injury of cardiac myocytes. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2011;15(11):2478–2485. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01249.x.
4. Akar FG, Aon MA, Tomaselli GF, O'Rourke B. The mitochondrial origin of postischemic arrhythmias. *Journal of Clinical Investigation*. 2005;115(12):3527–3535. doi:10.1172/JCI25371.
5. Allshire A, Piper HM, Cuthbertson KS, Cobbold PH. Cytosolic free Ca²⁺ in single rat heart cells during anoxia and reoxygenation. *Biochem J*. 1987;244(2):381–385.
6. Aon MA, Cortassa S, Marbán E, O'Rourke B. Synchronized whole cell oscillations in mitochondrial metabolism triggered by a local release of reactive oxygen species in cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 2003;278(45):44735–44744. doi:10.1074/jbc.M302673200.
7. Bhamra GS, Hausenloy DJ, Davidson SM, et al. Metformin protects the ischemic heart by the Akt-mediated inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening. *Basic Res Cardiol*. 2008;103(3):274–284. doi:10.1007/s00395-007-0691-y.
8. Braestrup C, Squires RF. Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity (3H)diazepam binding. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977;74(9):3805–3809.
9. Brown DA, Aon MA, Akar FG, Liu T, Sorraín N, O'Rourke B. Effects of 4'-chlorodiazepam on cellular excitation-contraction coupling and ischaemia-reperfusion injury in rabbit heart. *Cardiovascular Research*. 2008;79(1):141–149. doi:10.1093/cvr/cvn053.
10. Campanella M, Szabadkai G, Rizzuto R. Modulation of intracellular Ca²⁺ signalling in HeLa cells by the apoptotic cell death enhancer PK11195. *Biochem Pharmacol*. 2008;76(11):1628–1636. doi:10.1016/j.bcp.2008.09.034.
11. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:395–419. doi:10.1146/annurev.immunol.16.1.395.

12. Dedkova EN, Blatter LA. Measuring mitochondrial function in intact cardiac myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2012;52(1):48–61. doi:10.1016/j.yjmcc.2011.08.030.
13. Dennis SCS, Gevers WW, Opie LHL. Protons in ischemia: where do they come from; where do they go to? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1991;23(9):1077–1086.
14. Di Lisa F, Bernardi P. Mitochondrial function and myocardial aging. A critical analysis of the role of permeability transition. *Cardiovascular Research*. 2005;66(2):222–232. doi:10.1016/j.cardiores.2005.02.009.
15. Fox KAA, Carruthers KF, Dunbar DR, et al. Underestimated and under-recognized: the late consequences of acute coronary syndrome (GRACE UK-Belgian Study). *European Heart Journal*. 2010;31(22):2755–2764. doi:10.1093/eurheartj/ehq326.
16. Ganote CE. Contraction band necrosis and irreversible myocardial injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1983;15(2):67–73.
17. Garcia-Dorado D, Inserte J, Ruiz-Meana M, et al. Gap junction uncoupler heptanol prevents cell-to-cell progression of hypercontracture and limits necrosis during myocardial reperfusion. *Circulation*. 1997;96(10):3579–3586.
18. Garcia-Dorado D, Rodriguez-Sinovas A, Ruiz-Meana M, Inserte J, Agulló L, Cabestrero A. The end-effectors of preconditioning protection against myocardial cell death secondary to ischemia-reperfusion. *Cardiovascular Research*. 2006;70(2):274–285. doi:10.1016/j.cardiores.2006.02.011.
19. Garcia-Dorado D, Theroux P, Duran JM, et al. Selective inhibition of the contractile apparatus. A new approach to modification of infarct size, infarct composition, and infarct geometry during coronary artery occlusion and reperfusion. *Circulation*. 1992;85(3):1160–1174. doi:10.1161/01.CIR.85.3.1160.
20. García-Dorado DD. Myocardial reperfusion injury: a new view. *Cardiovascular Research*. 2004;61(3):363–364. doi:10.1016/j.cardiores.2003.12.020.
21. Griffiths EJ, Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J*. 1995;307 (Pt 1):93–98.
22. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 1985;260(6):3440–3450.
23. Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovascular Research*. 2004;61(3):372–385. doi:10.1016/S0008-6363(03)00533-9.
24. Halestrap AP. What is the mitochondrial permeability transition pore? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2009;46(6):821–831. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.02.021.

25. Hausenloy DJ, Erik Bøtker H, Condorelli G, et al. Translating cardioprotection for patient benefit: position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovascular Research*. 2013. doi:10.1093/cvr/cvt004.
26. Hausenloy DJ, Maddock HL, Baxter GF, Yellon DM. Paradigm shifts in cardioprotection research: the importance of the MPTP as a therapeutic target. *Cardiovascular Research*. 2012;96(2):160–164. doi:10.1093/cvr/cvs174.
27. Hausenloy DJ, Yellon DM. Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection. *Heart Fail Rev*. 2007;12(3-4):217–234. doi:10.1007/s10741-007-9026-1.
28. Heusch G, Kleinbongard P, Skyschally A. Myocardial infarction and coronary microvascular obstruction: an intimate, but complicated relationship. *Basic Res Cardiol*. 2013;108(6):380. doi:10.1007/s00395-013-0380-y.
29. Hirsch T, Decaudin D, Susin SA, et al. PK11195, a ligand of the mitochondrial benzodiazepine receptor, facilitates the induction of apoptosis and reverses Bcl-2-mediated cytoprotection. *Exp Cell Res*. 1998;241(2):426–434. doi:10.1006/excr.1998.4084.
30. Inserte J, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, et al. Effect of inhibition of Na⁺/Ca²⁺ exchanger at the time of myocardial reperfusion on hypercontracture and cell death. *Cardiovascular Research*. 2002;55(4):739–748.
31. JENNINGS RB, SOMMERS HM, SMYTH GA, FLACK HA, LINN H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol*. 1960;70:68–78.
32. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*. 1972;26(4):239.
33. Ludbrook J. Advantages of permutation (randomization) tests in clinical and experimental pharmacology and physiology. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1994;21(9):673–686.
34. Maaser K, Sutter AP, Scherübl H. Mechanisms of mitochondrial apoptosis induced by peripheral benzodiazepine receptor ligands in human colorectal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;332(3):646–652. doi:10.1016/j.bbrc.2005.05.005.
35. Mosterd A, Hoes AW. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart*. 2007;93(9):1137–1146. doi:10.1136/hrt.2003.025270.
36. Mukhopadhyay P, Rajesh M, Yoshihiro K, Haskó G, Pacher P. Simple quantitative detection of mitochondrial superoxide production in live cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;358(1):203–208. doi:10.1016/j.bbrc.2007.04.106.

37. Obame FN, Zini R, Souktani R, Berdeaux A, Morin D. Peripheral benzodiazepine receptor-induced myocardial protection is mediated by inhibition of mitochondrial membrane permeabilization. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;323(1):336–345. doi:10.1124/jpet.107.124255.
38. Owens LM, Fralix TA, Murphy E, Cascio WE, Gettes LS. Correlation of ischemia-induced extracellular and intracellular ion changes to cell-to-cell electrical uncoupling in isolated blood-perfused rabbit hearts. Experimental Working Group. *Circulation*. 1996;94(1):10–13.
39. Papadopoulos V, Baraldi M, Guilarte TR, et al. Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol Sci*. 2006;27(8):402–409. doi:10.1016/j.tips.2006.06.005.
40. Paradis S, Leoni V, Caccia C, Berdeaux A, Morin D. Cardioprotection by the TSPO ligand 4'-chlorodiazepam is associated with inhibition of mitochondrial accumulation of cholesterol at reperfusion. *Cardiovascular Research*. 2013;98(3):420–427. doi:10.1093/cvr/cvt079.
41. Petronilli V, Miotto G, Canton M, et al. Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence. *Biophys J*. 1999;76(2):725–734. doi:10.1016/S0006-3495(99)77239-5.
42. Piot C, Croisille P, Staat P, et al. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2008;359(5):473–481. doi:10.1056/NEJMoa071142.
43. Piper H-M, Abdallah Y, Kasseckert S, Schlüter K-D. Sarcoplasmic reticulum-mitochondrial interaction in the mechanism of acute reperfusion injury. Viewpoint. *Cardiovascular Research*. 2008;77(2):234–236. doi:10.1093/cvr/cvm066.
44. Piper HM, Garcia-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovascular Research*. 1998;38(2):291–300.
45. Piper HM, Probst I, Schwartz P, Hütter FJ, Spieckermann PG. Culturing of calcium stable adult cardiac myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1982;14(7):397–412.
46. Piper HMH, Abdallah YY, Schäfer CC. The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovascular Research*. 2004;61(3):365–371. doi:10.1016/j.cardiores.2003.12.012.
47. Piper HMH, Kasseckert SS, Abdallah YY. The sarcoplasmic reticulum as the primary target of reperfusion protection. *Cardiovascular Research*. 2006;70(2):170–173. doi:10.1016/j.cardiores.2006.03.010.
48. Ruiz-Meana M, Abellán A, Miró-Casas E, Agulló E, Garcia-Dorado D. Role of sarcoplasmic reticulum in mitochondrial permeability transition and cardiomyocyte death during reperfusion. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*.

2009;297(4):H1281–9. doi:10.1152/ajpheart.00435.2009.

49. Schaller S, Paradis S, Ngoh GA, et al. TRO40303, a new cardioprotective compound, inhibits mitochondrial permeability transition. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010;333(3):696–706. doi:10.1124/jpet.110.167486.
50. Schäfer C, Ladilov Y, Inserte J, et al. Role of the reverse mode of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. *Cardiovascular Research*. 2001;51(2):241–250. doi:10.1016/S0008-6363(01)00282-6.
51. Shahzad T, Kasseckert SA, Iraqi W, et al. Mechanisms involved in postconditioning protection of cardiomyocytes against acute reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2013:1–29. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.01.003.
52. Siegmund B, Klietz T, Schwartz P, Piper HM. Temporary contractile blockade prevents hypercontracture in anoxic-reoxygenated cardiomyocytes. *Am J Physiol*. 1991;260(2 Pt 2):H426–35.
53. Siegmund B, Ladilov YV. Importance of sodium for recovery of calcium control in reoxygenated cardiomyocytes. *American Journal of Physiol Heart Circ Physiol* 1994.
54. Siegmund B, Zude R, Piper HM. Recovery of anoxic-reoxygenated cardiomyocytes from severe Ca²⁺ overload. *American Journal of Physiol Heart Circ Physiol* 1992.
55. Staat P, Rioufol G, Piot C, et al. Postconditioning the human heart. *Circulation*. 2005;112(14):2143–2148. doi:10.1161/CirculationAHA.105.558122.
56. Thibault H, Piot C, Staat P, et al. Long-term benefit of postconditioning. *Circulation*. 2008;117(8):1037–1044. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.729780.
57. Tullio F, Angotti C, Perrelli M-G, Penna C, Pagliaro P. Redox balance and cardioprotection. *Basic Res Cardiol*. 2013;108(6):392. doi:10.1007/s00395-013-0392-7.
58. Veenman L, Gavish M. The peripheral-type benzodiazepine receptor and the cardiovascular system. Implications for drug development. *Pharmacol Ther*. 2006;110(3):503–524. doi:10.1016/j.pharmthera.2005.09.007.
59. Xiao J, Liang D, Zhang H, Liu Y, Li F, Chen Y-H. 4'-Chlorodiazepam, a translocator protein (18 kDa) antagonist, improves cardiac functional recovery during postischemia reperfusion in rats. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2010;235(4):478–486. doi:10.1258/ebm.2009.009291.
60. Yellon DM, Sc D, Hausenloy DJ. Mechanisms of Disease Myocardial Reperfusion Injury. *N Engl Journal of Medicine* 2007:1–15.
61. Zisterer DM, Williams DC. Peripheral-Type Benzodiazepine Receptors. 2003:1–10.

11. Publikationen

Artikel

Shahzad Tayyab, Kasseckert Sascha Andreas, Iraqi Wisam, Johnson Victoria, Schulz Rainer, Schlueter Klaus-Dieter, Doerr Oliver, Parahueleva Mariana, Hamm Christian, Ladilov Yury, Abdallah Yaser, **“Mechanisms involved in postconditioning protection of cardiomyocytes against acute reperfusion injury”**, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* (2013)

Poster/Vorträge

1. Johnson V., Iraqi W., Dörr O., Troidl C., Nef H. , Hamm C., Abdallah Y. **“Inhibition of mitochondrial benzodiazepine receptor protects cardiomyocytes against acute reoxygenation injury “** (Vortrag, 80. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, 23. – 26. April 2014, Mannheim)
2. Johnson V, Iraqi W, Kasseckert A S, Micoogullari M, Shahzad T, Sedding D, Doerr O, Parahueleva M, Abdallah Y **“Inhibition of mitochondrial benzodiazepine receptor protects cardiomyocytes against reoxygenation injury”** (Poster, 34. Kongress der European Society of Cardiology, 25.-29. August 2012, München,)
3. Johnson V, Iraqi W, Shahzad T, Abdallah Y **” Die Hemmung des mitochondrialen Benzodiazepin-Rezeptors schützt Kardiomyozyten vor dem Reperfusionsschaden“** (Vortrag, 77. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, 27.-30. April 2011, Mannheim)
4. Micoogullari M, Kasseckert A S, Woste A, Iraqi W, Shahzad T, Johnson V, Hamm C, Abdallah Y **“Reduktion des akuten myokardialen Reperfusionsschadens durch Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) in isolierten Kardiomyozyten“** (Poster, 78. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, 11.-14. April 2012, Mannheim)

5. Johnson V, Woste A, Raffenberg, S, Shahzad T, Abdallah Y, Iraqi W “**Inhibition of mitochondrial benzodiazepine receptor protects cardiomyocytes against reperfusion injury**” (Poster, 90. Jahrestag der Deutschen Gesellschaft für Physiologie, 26.-29. März 2011, Regensburg)

12. ERKLÄRUNG

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, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. 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.“

Ort, Datum

Unterschrift

13. Danksagung

Herrn PD Dr. Yaser Abdallah danke ich für die Bereitstellung des Themas, für die sehr gute Betreuung und Unterstützung und die hilfreiche Kritik die zum Gelingen dieser Arbeit beitragen haben.

Herrn Dr. Sascha von Grote danke ich für die intensive Unterstützung und die wertvollen Anregungen.

Für die hervorragende technische Unterstützung möchte ich mich bei Frau Daniela Schreiber bedanken.

Für das nette Arbeitsklima danke ich allen anderen Mitgliedern des Institutes und besonders des Calciumlabors.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinen Geschwistern die mich mit allen Mitteln unterstützt haben und mir immer zur Seite standen.

Insbesondere danke ich allen meinen Freundinnen und Freunden für die moralische Unterstützung die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6285-9



9 783835 196285 9