

Rolle des BK-Kanals für die cGMP-abhängige Kardioprotektion bei Myokardinfarkt

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Sandra Frankenreiter
aus Stuttgart

Tübingen
2017

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:	29.03.2017
Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel
1. Berichterstatter:	JProf. Dr. Robert Lukowski
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Peter Ruth
3. Berichterstatter:	Prof. Dr. Marc Freichel

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Zielsetzung	1
1.1	Myokardinfarkt und Therapie	1
1.2	Ischämie und Reperfusion (I/R)	2
1.2.1	Ischämische Prozesse.....	2
1.2.2	Reperfusionsschaden.....	3
1.3	Rolle der Mitochondrien während I/R.....	6
1.3.1	Physiologische Funktionen.....	6
1.3.2	Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).....	7
1.3.3	Superoxiddismutasen (SODs) als endogene Antioxidantien	8
1.4	Zelltodmechanismen bei I/R	9
1.5	Kardioprotektion durch Konditionierung	11
1.5.1	Ischämische Präkonditionierung (iPre) des Herzens	11
1.5.2	Ischämische Postkonditionierung (iPost) des Herzens	14
1.6	Der NO/cGMP/PKG-Signalweg	15
1.6.1	Zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP)	15
1.6.2	NO-Synthasen (NOS).....	16
1.6.3	Guanylatzyklasen	17
1.6.3.1	Lösliche Guanylatzyklasen (sGC)	17
1.6.3.2	Membranständige Guanylatzyklasen (pGC)	19
1.6.4	Phosphodiesterasen (PDE)	19
1.6.5	cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I (PKG I)	21
1.6.6	Zielproteine der PKG I im kardiovaskulären System.....	22
1.6.7	Pharmakologische Modulation des NO/cGMP/PKG I-Signalweges bei I/R ..	24
1.7	Der BK-Kanal	26
1.7.1	Struktur und Lokalisation	26
1.7.2	Physiologische Bedeutung des BK-Kanals	29
1.7.3	Einfluss des mitoBKs auf den I/R-Schaden	30
1.7.4	Pharmakologische Modulation.....	32
1.8	Zielsetzung.....	34
2.	Material und Methoden	35
2.1	Allgemeine Materialien	35
2.1.1	Geräte	35
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	36
2.1.3	Software	37
2.2	Tiermodelle	37
2.2.1	Haltung.....	37

2.2.2	Transgene Mauslinien.....	37
2.2.2.1	Globale BK-Knockoutmäuse (BK ^{-/-})	37
2.2.2.2	Kardiomyozyten-spezifische BK-Knockoutmäuse (CMBK ^{-fl}).....	38
2.2.2.3	Glattmuskelzell-spezifische BK-Knockoutmäuse (SMBK ^{-fl})	40
2.2.2.4	ROSA26 Cre-Reportermause.....	41
2.2.2.5	Kardiomyozyten-spezifische sGC-Knockoutmäuse (CMsGC ^{-fl}).....	41
2.3	Genotypisierung.....	42
2.3.1	Materialien und Substanzen.....	42
2.3.2	Puffer und Lösungen.....	43
2.3.3	Ohrmarkierung und Schwanzspitzenbiopsie	43
2.3.4	DNA-Isolation.....	43
2.3.5	Polymerasekettenreaktion.....	44
2.3.6	Agarosegelelektrophorese	45
2.4	Kardiomyozyten- und Gewebeisolation für die Untersuchung der Cre-regulierten BK-Kanal-Expression	46
2.4.1	Materialien und Substanzen.....	46
2.4.2	Puffer und Lösungen.....	47
2.4.3	Kardiomyozytenisolation	47
2.4.4	DNA-Isolation aus Kardiomyozyten und Geweben.....	48
2.5	<i>In-vivo</i> -Mausmodelle	49
2.5.1	Material und Substanzen	49
2.5.2	Puffer und Lösungen.....	50
2.5.3	<i>In-situ</i> -Modell des akuten Myokardinfarkts	50
2.5.3.1	Anästhesie	51
2.5.3.2	Intubation	52
2.5.3.3	Ligatur der LCA und Reperfusion	53
2.5.3.4	Blutentnahme aus der <i>Aorta abdominalis</i>	54
2.5.3.5	Färbung des Herzens mit Evans Blue und TTC	54
2.5.3.6	Mechanische Konditionierung	57
2.5.3.7	Verabreichung pharmakologischer Substanzen	58
2.5.4	Chronisches Model des Myokardinfarkts.....	62
2.5.4.1	Anästhesie	62
2.5.4.2	Intubation	63
2.5.4.3	Ligatur der LCA.....	63
2.5.4.4	Eröffnung der LCA und Wundverschluss.....	64
2.5.4.5	Ausleitung der Narkose.....	64
2.5.5	Permanente Ligatur	65
2.5.6	Messung der ROS mittels MitoB-Injektion.....	66

2.5.6.1	MitoB-Injektion.....	67
2.5.6.2	Aufarbeitung der Gewebeprobe.....	68
2.5.7	Telemetrische Blutdruckmessung.....	69
2.5.7.1	Durchführung der Implantation	69
2.5.7.2	Behandlung mit pharmakologischen Substanzen	71
2.5.7.3	Entfernung des Katheters	72
2.5.8	Echokardiographie	73
2.5.8.1	Durchführung.....	73
2.5.8.2	Auswertung mit der „Vevo Strain 2100“-Methode	74
2.5.8.3	Auswertung mit der konventionellen Methode	75
2.6	Histologische Methoden	76
2.6.1	Material und Substanzen.....	76
2.6.2	Puffer und Lösungen	77
2.6.3	Anfertigung von Kryoschnitten.....	78
2.6.3.1	Gewebeentnahme und Einbettung.....	78
2.6.3.2	Schneiden am Kryotom	79
2.6.4	Sirius Rot-Färbung	79
2.6.5	Hämatoxylin- und Eosin- (H&E) Färbung.....	80
2.6.6	TUNEL-Färbung.....	81
2.6.7	Kernfärbung mit PermaFluor/Hoechst	82
2.7	Proteinanalytische Methoden	82
2.7.1	Material und Substanzen.....	82
2.7.2	Puffer und Lösungen	83
2.7.3	Proteinisolation aus Herzlysat	85
2.7.4	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	85
2.7.5	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	86
2.7.6	Semi-Dry Western Blot.....	87
2.7.7	ELISA zur Bestimmung von kardialen Troponin I.....	88
2.8	Statistik.....	89
3.	Ergebnisse	90
3.1	Bestimmung der Infarktgröße und des cTnI-Serumspiegels nach akutem Myokardinfarkt in globalen BK-KO (BK ^{-/-})-Mäusen	90
3.2	Einfluss von Konditionierung auf das Infarktareal in globalen BK-KO	92
3.2.1	Mechanische Postkonditionierung (iPost).....	92
3.2.2	Pharmakologische Konditionierung durch Sildenafilgabe	93
3.3	Folgen der kardialen I/R nach gewebespezifischer Deletion des BK-Kanals in Glattmuskelzellen (SMBK ^{-fl}).....	93
3.4	Spezifität und Effizienz der αMHC-Cre-Rekombinase.....	95

3.5	Charakterisierung des kardiovaskulären Phänotyps des CMBK-KO (CMBK ^{-fl})	97
3.6	Bestimmung des I/R-Schadens nach akutem Myokardinfarkt in CMBK-KO ...	101
3.6.1	Infarktgrößen- und cTnI-Spiegelbestimmung	101
3.6.2	Ausmaß der Apoptose	103
3.7	Auswirkungen einer mechanischen Konditionierung in CMBK-KO	105
3.8	Beeinflussung der Infarktgröße durch pharmakologische Modulation des BK-Kanals	107
3.8.1	Auswirkungen der pharmakologischen BK-Kanalblockade auf den kardialen I/R-Schaden.....	107
3.8.2	Protektion des Herzens bei I/R durch Öffnung des BK-Kanals mittels NS11021.....	108
3.9	Der mitoBK als Zielprotein des kardioprotektiven NO/cGMP/PKG I-Signalweges	111
3.9.1	Expression und Aktivität der PKG I in CMBK-Knockoutherzen.....	111
3.9.2	Verabreichung der PDE5-Hemmer Sildenafil und Tadalafil im akuten Myokardinfarktmodell.....	113
3.9.3	Einfluss der pharmakologischen Stimulation bzw. Aktivierung der sGC auf den I/R-Schaden.....	115
3.10	Bedeutung der NOS für die iPost- und Sildenafil-abhängige Konditionierung.	116
3.11	Rolle der ROS während des akuten I/R-Schadens.....	119
3.11.1	Quantifizierung der ROS mit MitoB <i>in vivo</i>	119
3.11.2	Expression der Superoxiddismutasen	121
3.12	Einfluss der Deletion des mitoBKs auf ERK und Akt als die Hauptmediatoren des RISK-Signalweges im akuten Myokardinfarktmodell	122
3.13	Auswirkungen einer 24-stündigen permanenten Ligatur auf die Infarktgröße in CMBK-CTR und -KO-Herzen.....	123
3.14	Folgen einer mitoBK-Ablation auf das Langzeitüberleben und die Herzfunktion im chronischen Myokardinfarktmodell.....	124
3.14.1	Bestimmung der Herzfunktion mittels Echokardiographie und konventioneller Auswertung.....	125
3.14.2	Vergleich der Auswertemethoden „konventionell“ und „Vevo Strain 2100“ anhand der Auswurffraktion	128
3.14.3	Segmentanalyse der Herzen post-MI mittels der „Vevo Strain 2100“-Methode	130
3.14.4	Bestimmung des Fibrosierungsgrades	136
3.15	Bedeutung der sGC in Kardiomyozyten für grundlegende kardiovaskuläre Funktionen sowie ihre Rolle bei I/R	137
3.15.1	Auswirkungen einer Deletion der sGC in CM auf den Blutdruck und I/R-Schaden nach akutem Myokardinfarkt	137
3.15.2	Einfluss des CMsGC-KOs auf die kardioprotektiven Effekte der cGMP-modulierenden Substanzen Sildenafil, Tadalafil und Cinaciguat	141
3.15.3	Aktivierung des BK-Kanals mit NS11021 in CMsGC-KO bei akutem I/R-Schaden	145

4.	Diskussion.....	146
4.1	Eignung des <i>in-vivo</i> -Myokardinfarktmodells für die durchgeführten Studien ...	146
4.2	Funktion des (mito)BK-Kanals für das kardiovaskuläre System ± I/R	148
4.2.1	Globale BK-Knockoutmäuse weisen nach akutem Myokardinfarkt einen signifikant erhöhten I/R-Schaden auf.....	148
4.2.2	Die Deletion des mitoBKs in Kardiomyozyten führt bereits unter physiologischen Bedingungen zu kardiovaskulären Beeinträchtigungen ...	150
4.2.3	Der mitoBK ist eine Komponente der kardioprotektiven Signalwege bei akutem Myokardinfarkt	153
4.2.4	Die pharmakologische Modulation des BK-Kanals beeinflusst die Infarktgröße im I/R-Modell	158
4.2.5	Die Ausschaltung des mitoBKs beeinflusst die ROS-Bildung während I/R.	161
4.2.6	Die mitoBK-abhängige Kardioprotektion und das <i>Reperfusion Injury Salvage Kinase</i> (RISK)-System.....	163
4.3	Der mitoBK als Effektormolekül des kardioprotektiven NO/cGMP/PKG I-Signalweges im akuten Myokardinfarkt	165
4.3.1	Die kardiomyozytäre sGC ist eine wichtige Komponente der Blutdruckregulation.....	167
4.3.2	Die Reduktion des I/R-Schadens durch iPost ist CMsGC-abhängig	168
4.3.3	Infarktlimitierende Effekte der pharmakologischen PDE5-Hemmung hängen von der kardiomyozytären sGC und dem mitoBK ab	169
4.3.4	Die pharmakologische Modulation der sGC triggert mitoBK-abhängige Schutzmechanismen bei I/R.....	172
4.3.5	Kardioprotektionen durch iPost und Sildenafil sind abhängig von einer funktionalen NO-Synthase.....	175
4.3.6	Limitationen der akuten I/R-Studie zur Bedeutung des NO/cGMP/PKG I/mitoBK-Signalweges.....	177
4.4	Langzeitfolgen der mitoBK-Ablation post-MI.....	178
5.	Zusammenfassung	182
6.	Literaturverzeichnis.....	186
7.	Anhang	211
7.1	Annex-Abbildungen	211
7.2	Annex-Tabellen	228
7.3	Annex-Formeln.....	234
	Publikationen, Kongressbeiträge und Stipendien.....	235
	Danksagung	237

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Metabolische Vorgänge während der ischämischen Phase	3
Abbildung 2: Prinzip des Ischämie/Reperfusionsschadens	4
Abbildung 3: Metabolische Vorgänge zu Beginn der Reperfusion.....	5
Abbildung 4: Schematische Darstellung der kardioprotektiven Signaltransduktion	12
Abbildung 5: Schematische Darstellung des NO/cGMP-Signalweges	16
Abbildung 6: Regulatorisches Netzwerk der PDEs im Herzen.....	21
Abbildung 7: Modelldarstellung der α -, β - und γ -Untereinheiten des BK-Kanals	27
Abbildung 8: Mitochondriale Lokalisation des BK-Kanals	28
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Cre/loxP-Systems.....	38
Abbildung 10: Verpaarungsschema zur Generierung der Elterntiere (F1) für die Versuchstier- kohorten.....	39
Abbildung 11: Verpaarungsschema zur Generierung der Versuchstiere (F2)	39
Abbildung 12: Tamoxifen-induzierte Deletion des BK-Kanalporenxons in Glattmuskelzellen	40
Abbildung 13: Prinzip des globalen, doppelfluoreszenten Cre-Reportermausmodells	41
Abbildung 14: Exemplarisches Ergebnis einer Genotypisierungs-PCR der CMBK-Mauslinie	46
Abbildung 15: Zeitlicher Ablauf der Operation des akuten Myokardinfarkts (I/R)	51
Abbildung 16: Durchführung des akuten Myokardinfarktmodells	53
Abbildung 17: Schematische Darstellung der Färbung mit Evans Blue und TTC.....	55
Abbildung 18: Evans Blue-Färbung im akuten Myokardinfarktmodell	56
Abbildung 19: Planimetrische Auswertung des Risikoareals und der Infarktgröße	57
Abbildung 20: Operationsschemata für die mechanische Konditionierung im akuten Myokardinfarktmodell	58
Abbildung 21: Operationsschemata für die Administrationen pharmakologischer Substanzen im akuten Myokardinfarktmodell	59
Abbildung 22: Zeitlicher Ablauf der Operation des chronischen Myokardinfarktmodells	62
Abbildung 23: Zeitlicher Ablauf des Modells der permanenten Ligatur.....	65
Abbildung 24: MitoB als Marker für mitochondriale ROS-Bildung <i>in vivo</i>	67
Abbildung 25: Zeitlicher Ablauf der Blutdruckmessung.....	69
Abbildung 26: Durchführung der Implantation der Blutdrucktransmitter	70
Abbildung 27: Zeitlicher Ablauf der Blutdruckmessung nach Tadalafil bzw. Pentobarbitalgabe	72
Abbildung 28: Auswertung der Verformung des Herzens mit „Vevo Strain 2100“	74
Abbildung 29: Berechnung der Verformung des Herzens.....	74
Abbildung 30: Segmentanalyse mit „Vevo Strain 2100“	75
Abbildung 31: Durchführung der Echokardiographie und konventionelle Auswertung	76
Abbildung 32: Erhöhter I/R-Schaden in globalen BK-Knockoutherzen nach akutem Myokardinfarkt	91
Abbildung 33: Fehlende Kardioprotektion nach iPost und nach pharmakologischer Kardioprotektion mit Sildenafil in BK-KO.....	92
Abbildung 34: PCR-Analyse der SMMHC-CreER ^{T2} -induzierten Deletion des BK-Kanals in glattmuskulären Geweben.....	94
Abbildung 35: Unbeeinflusste Infarktgröße nach Ausschaltung des BK-Kanals in Glattmuskelzellen	95

Abbildung 36: Hohe Spezifität und Effizienz der α MHC-Cre-Rekombinase	96
Abbildung 37: PCR-Analyse der α MHC-Cre-induzierten Deletion des BK-Kanals in verschiedenen Geweben	97
Abbildung 38: Reduzierter arterieller Blutdruck in CMBK-Knockoutmäusen	99
Abbildung 39: Eingeschränkte Herzfunktion der CMBK-KO	100
Abbildung 40: Weitere linksventrikuläre Parameter der echokardiographischen Messung in CMBK-KO und -CTR	101
Abbildung 41: Bestimmung der Infarktgröße und des cTnI-Spiegels in CMBK-KO	102
Abbildung 42: Erhöhte Apoptose in CMBK-Knockouterzen nach I/R	104
Abbildung 43: Quantifizierung apoptotischer Zellen nach I/R	105
Abbildung 44: Vermindertes Ansprechen der CMBK-KO auf mechanische Konditionierung	106
Abbildung 45: Anstieg der Infarktgröße bei I/R durch Paxilline in CMBK-CTR.....	108
Abbildung 46: Kardioprotektion durch Öffnung des BK-Kanals mit NS11021 in CMBK-CTR	110
Abbildung 47: Expression der PKG I in CMBK-KO und -CTR-Herzlysaten	111
Abbildung 48: Keine genotypspezifischen Änderungen in der Aktivität der PKG I	112
Abbildung 49: Verlust der durch PDE5-Blockade vermittelten Kardioprotektion in CMBK-KO.....	114
Abbildung 50: Kardioprotektion durch sGC-Stimulation bzw. -Aktivierung	116
Abbildung 51: Beeinflussung der Hämodynamik durch L-NAME in CMBK-KO	117
Abbildung 52: Einfluss einer NOS-Blockade auf die kardioprotektiven Effekte von iPost und Sildenafil	118
Abbildung 53: ROS-Spiegel in CMBK-KO und -CTR basal und nach I/R	120
Abbildung 54: Normalisierte MitoP/MitoB-Level zeigen eine erhöhte ROS-Generierung in CMBK-KO	120
Abbildung 55: Expressionsmuster der SODs im akuten Myokardinfarkt	121
Abbildung 56: Erhöhte Phosphorylierung von ERK in CMBK-CTR nach I ₃₀ /R ₁₀	122
Abbildung 57: Aktivierung von Akt im akuten Myokardinfarktmodell	123
Abbildung 58: Einfluss des mitoBKs auf die Herzschiädigung bei permanenter Ligatur der LCA..	124
Abbildung 59: Genotypunabhängige Beeinträchtigung der Herzfunktion nach I ₃₀ /R _{4W0}	126
Abbildung 60: Weitere linksventrikuläre Parameter für die Charakterisierung der Herzfunktion post-MI (nach I ₃₀ /R _{4W0}) in CMBK-KO und -CTR.....	127
Abbildung 61: Vergleich der Auswertemethoden anhand der EF	129
Abbildung 62: Prozentuale Abweichung in der Auswurfraction (EF) zwischen der konventionellen Auswertemethode und der „Vevo Strain 2100“-Methode	130
Abbildung 63: Änderungen der longitudinalen Verformbarkeit des Endokards nach Myokardinfarkt.....	131
Abbildung 64: Segmentanalyse der longitudinalen Verformung des Endokards.....	132
Abbildung 65: Beeinträchtigte longitudinale Verformung in CMBK-KO nach Myokardinfarkt.....	134
Abbildung 66: Durchschnittliche Verformung und Verformungsrate in CMBK-KO und -CTR im chronischen Myokardinfarktmodell.....	135
Abbildung 67: Fibrosefärbung der Herzen nach I ₃₀ /R _{4W0}	136
Abbildung 68: Signifikant erhöhte Ausbildung von fibrotischem Gewebe in CMBK-KO im chronischen Infarktmodell	137
Abbildung 69: Telemetrische Blutdruckmessung in CMsGC-KO und -CTR	139

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 70: Einfluss einer CM-spezifischen Deletion der sGC auf die Infarktgröße	140
Abbildung 71: Kardioprotektion durch PDE5-Hemmung benötigt eine funktionale sGC im CM....	142
Abbildung 72: Hämodynamische Effekte von L-NAME in CMsGC-Mutanten	143
Abbildung 73: Einfluss einer Modulation der NO/sGC-abhängigen Signalkaskade auf den I/R-Schaden in sGC-KO und -CTR	144
Abbildung 74: Kardioprotektion durch BK-Kanalöffnung in CMsGC-KO und -CTR	145
Abbildung 75: Schematische Darstellung der möglichen Signaltransduktion im Mitochondrium bei I/R	154
Abbildung 76: Darstellung der kardioprotektiven cGMP-abhängigen Signalkaskade.....	166
Abbildung 77: Übersicht des cGMP-Signalweges und der untersuchten Pharmaka in Kardiomyozyten.....	185

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pipettierschema des PCR-Mastermixes für BK	44
Tabelle 2: PCR-Programm	44
Tabelle 3: Größe (in bp) der erwarteten DNA-Amplifikate	45
Tabelle 4: Standardreihe für MitoB und MitoP	68
Tabelle 5: Kryotomeinstellungen	79
Tabelle 6: Basale Herzgewichte der männlichen CMBK-CTR (CMBK ^{+fl}) und CMBK-KO (CMBK ^{-fl})	98
Tabelle 7: Herzgewichte der männlichen CMBK-CTR (CMBK ^{+fl}) und CMBK-KO (CMBK ^{-fl}) nach I ₃₀ /R _{4W0}	125
Tabelle 8: Übersicht der Infarktgrößenänderungen nach Konditionierungen in den CM-spezifischen KO.....	183

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
5'-AMP	Adenosin-5'-monophosphat
5'-GMP	Guanosin-5'-monophosphat
A-Rezeptor	Adenosinrezeptor
AIF	Apoptose-induzierender Faktor
Akt	Proteinkinase B
ANP	atriales natriuretisches Peptid
ant.	vordere/r/s, <i>engl.</i> anterior
APS	Ammoniumperoxodisulfatlösung
ATP	Adenosintriphosphat
B-Rezeptor	Bradikininrezeptor
Bak	Protein der Bcl-2-Familie, <i>engl.</i> Bcl-2 antagonist/killer
Bax	Protein der Bcl-2-Familie, <i>engl.</i> Bcl-2 associated protein X
BAY 58-2667	Cinaciguat (sGC-Aktivator)
BAY 63-2521	Riociguat (sGC-Stimulator)
BAY 1021189	Vericiguat (sGC-Stimulator)
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BDM	2,3-Butandion-Monoxim
BK	spannungs- und Ca ²⁺ -abhängiger Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit, <i>engl.</i> big (conductance) K ⁺
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid, <i>engl.</i> brain natriuretic peptide
bp	Basenpaar
BSA	Rinderalbumin, <i>engl.</i> bovine serum albumin
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalziumion
CaM	Calmodulin
cAMP	zyklisches Adenosin 3',5'-monophosphat, <i>engl.</i> cyclic adenosine 3',5'-monophosphate
cGMP	zyklisches Guanosin 3',5'-monophosphat, <i>engl.</i> cyclic guanosine 3',5'-monophosphate
CIN	Cinaciguat (sGC-Aktivator)
CM	Kardiomyozyt, <i>engl.</i> cardiomyocyte
CNG	zyklisch-Nukleotid-gesteuerter Kationenkanal, <i>engl.</i> cyclic nucleotide gated channel
CNP	C-Typ natriuretisches Peptid
cpm	Zählimpulse pro Minute, <i>engl.</i> counts per minute
Cre	cyclization recombinase
CTEPH	chronisch-thromboembolische pulmonale Hypertonie
CTR	Kontrolltier, <i>engl.</i> control animal
ctr	Kontrollexperiment, <i>engl.</i> control experiment
CuZnSOD	Kupfer/Zink-Superoxiddismutase (SOD1)
d.h.	das heißt
DES	Medikamenten-beschichteter Stent, <i>engl.</i> drug eluting stent
DGK	Deutsche Gesellschaft für Kardiologie
Diast.	Diastole
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>engl.</i> deoxyribonucleic acid
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EC SOD	extrazelluläre Superoxiddismutase (SOD 3)

EDPVR	enddiastolische Druck-Volumen-Beziehung, <i>engl.</i> enddiastolic pressure volume relationship
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, <i>engl.</i> ethylene diamine tetraacetic acid
EF	Auswurfraction, <i>engl.</i> ejection fraction
EGFR	Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors, <i>engl.</i> epidermal growth factor receptor
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	p42/p44 extracellular signal regulated kinases
ESC	Europäische Gesellschaft für Kardiologie, <i>engl.</i> European Society of Cardiology
ESPVR	endsystolische Druck-Volumen-Beziehung, <i>engl.</i> endsystolic pressure volume relationship
et al.	et alii
ETC	Elektronentransportkette, <i>engl.</i> electron transport chain
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
FCS	fetales Kälberserum, <i>engl.</i> fetal calf serum
Fe ²⁺	Eisenion
fl	gefloxtes Allel, von loxP-Sequenzen flankiert
FS	Verkürzungsfraction, <i>engl.</i> fractional shortening
GAF	cGMP-specific phosphodiesterases, adenylyl cyclases and FhIA
GC	Guanylatzyklase
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor, <i>engl.</i> granulocyte colony-stimulating factor
GPCR; G	G-Protein gekoppelter Rezeptor, <i>engl.</i> G protein-coupled receptor
GSK3 β	Glykogensynthase-Kinase-3 β
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde, <i>engl.</i> hour
H ⁺	Wasserstoffion
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ S	Schwefelwasserstoff
HCN-Kanal	hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation channel
HCO ₃ ⁻	Hydrogenkarbonation
HEK	humane, embryonale Nierenzelllinie, <i>engl.</i> human embryonic kidney cells
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HG	Herzgewicht
HMR-1766	Ataciguat (sGC-Aktivator)
H-NOX	heme-nitric oxide oxygen binding
HRP	Meerrettichperoxidase, <i>engl.</i> horseradish peroxidase
HSP60	Hitzeschockprotein 60
i.a.	intraatrial
I/R	Ischämie/Reperfusion
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IK	Ca ²⁺ -abhängiger Kaliumkanal mit mittlerer Leitfähigkeit, <i>engl.</i> intermediate (conductance) K ⁺
IL-6	Interleukin 6
IMM	innere Mitochondrienmembran
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase
i.p.	intraperitoneal
iPost	ischämische Postkonditionierung, <i>engl.</i> ischemic postconditioning
iPre	ischämische Präkonditionierung, <i>engl.</i> ischemic preconditioning

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

IRAG	Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptor assoziierte cGMP-Kinasesubstrat
i.v.	intravenös
IVS	Interventrikularseptum
JAK	Januskinase
K ⁺	Kaliumion
K _{ATP}	ATP-abhängiger Kaliumkanal
KG	Körpergewicht
KHK	koronare Herzkrankheit
KO, -	Knockout
K _v -Kanal	spannungsabhängiger Kaliumkanal
KT5823	PKG-Inhibitor
LCA	linke, absteigende Koronararterie, <i>engl.</i> left anterior descending coronary artery
LC-MS	Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie
L-NA	N _ω -Nitro-L-Arginin (NOS-Inhibitor)
L-NAME	N _ω -Nitro-L-Arginin-Methylester-Hydrochlorid (NOS-Inhibitor)
loxP	locus of X-over P1
LRR	leuzinreiche Domäne, <i>engl.</i> leucin-rich repeats
LV	linker Ventrikel, <i>engl.</i> left ventricle
LVID	Durchmesser des linken Ventrikels, <i>engl.</i> left ventricular internal diameter
LVPW	Hinterwand des linken Ventrikels, <i>engl.</i> left ventricular posterior wall
LV-Vol.	Volumen des linken Ventrikels
m	Masse
mA	Milliampere
MCU	mitochondrialer Ca ²⁺ -Uniporter
MEK	MAP/ERK-Kinase
mG	membranständiges, grün fluoreszierendes Protein
Mg ²⁺	Magnesiumion
MI	Myokardinfarkt
min	Minute
MitoB	Mito-Boronsäure, <i>engl.</i> MitoBoronic acid
mitoBK	mitochondriale BK-Kanal
mitoK _{ATP}	mitochondriale ATP-abhängiger Kaliumkanal
mmHG	Millimeter Quecksilbersäule
MnSOD	Mangan-Superoxiddismutase (SOD2)
mPTP	mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-pore
mT	membranständiges, rot fluoreszierendes Protein
M _w	Molekulargewicht
MyPT1	myosin phosphatase target subunit 1
Na ⁺	Natriumion
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher, <i>engl.</i> Na ⁺ /Ca ²⁺ -exchanger
NADH	Nicotinamadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
NHE	Natrium/Protonen-Austauscher, <i>engl.</i> Na ⁺ /H ⁺ -exchanger
nM	nanomolar
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid, <i>engl.</i> nitric oxide
NOS	Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase
NS11021, NS	BK-Kanalöffner
NS1619	BK-Kanalöffner
NS2004	BK-Kanalöffner

NSTEMI	nicht-ST-Hebungs-Myokardinfarkt, <i>engl.</i> non-ST-segment elevation myocardial infarction
O ₂	Sauerstoff, <i>engl.</i> oxygen
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one
ONOO ⁻	Peroxynitrit
OP	Operation
OxPhos	oxidative Phosphorylierung
PAH	pulmonal-arterielle Hypertonie
PAX	Paxilline (BK-Kanalblocker)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung, <i>engl.</i> phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion <i>engl.</i> polymerase chain reaction
PDE	Phosphodiesterase
PFA	Paraformaldehyd
pGC	membranständige Guanylatzyklase, <i>engl.</i> particulate guanylate cyclase
P _i	anorganisches Phosphat
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG I	cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I
PLN	Phospholamban
PMSF	Phenylmethylsufonylfluorid
post.	hintere/r/s, <i>engl.</i> posterior
pS	Pikosiemens
PTCA	perkutane, transluminale Koronarangioplastie, <i>engl.</i> percutaneous transluminal coronary angioplasty
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RCK	regulator of conductance for K ⁺
RhoA	Ras homolog gene family member A
RIO	Riociguat (sGC-Stimulator)
RISK	reperfusion injury salvage kinase
RNS	reaktive Stickstoffverbindungen, <i>engl.</i> reactive nitrogen species
ROS	reaktive Sauerstoffspezies, <i>engl.</i> reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
sarcK _{ATP}	sarkolemmale ATP-abhängiger Kaliumkanal
s.c.	subkutan, <i>engl.</i> subcutaneous
SD	Standardabweichung, <i>engl.</i> standard deviation
SDS	Natriumlaurylsulfat, <i>engl.</i> sodium dodecyl sulfate
SEM	Standardfehler, <i>engl.</i> standard error of the mean
SERCA	Kalziumpumpe des sarko- und endoplasmatischen Retikulums, <i>engl.</i> sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase
Ser	Serin
sGC	lösliche Guanylatzyklase, <i>engl.</i> soluble guanylate cyclase
sGC-1	α ₁ β ₁ -Isoform der NO-sensitiven Guanylatzyklase
sGC-2	α ₂ β ₁ -Isoform der NO-sensitiven Guanylatzyklase
SIL	Sildenafil (PDE5-Hemmer)
SK	Ca ²⁺ -abhängiger Kaliumkanal mit kleiner Leitfähigkeit, <i>engl.</i> small (conductance) K ⁺
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus, <i>engl.</i> single-nucleotide polymorphisms
SOD	Superoxiddismutase
sog.	sogenannt
SPF	spezifiziert Pathogen-frei

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

SR	sarkoplasmatisches Retikulum
STAT	signal transducers and activators of transcription
STEMI	ST-Hebungs-Myokardinfarkt, <i>engl.</i> ST-segment elevation myocardial infarction
STREX	stress axis regulated exon
Syst.	Systole
TAD	Tadalafil (PDE5-Hemmer)
TASK-3	two-pore acid sensitive type 3
TdT	Desoxyribonukleotidyltransferase, <i>engl.</i> terminal desoxynucleotidyl transferase
TEDD	totale enddiastolische Durchmesser, <i>engl.</i> total end diastolic diameter
TEMED	Tetramethyldiamin
Tg	transgen
Thr	Threonin
TL	Tibiallänge
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
TOM	Translokase der äußeren Mitochondrienmembran, <i>engl.</i> translocase of the outer membrane
TPP	Triphenylphosphonium
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
Tyr	Tyrosin
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
VASP	Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein
vs.	versus
WT, +	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
λ_{Em}	Emissionswellenlänge
λ_{Ex}	Exzitationswellenlänge
μM	mikromolar
Ψ_m	Membranpotential

Besondere Hinweise

Gesetzlich geschützte Warenzeichen werden ohne besondere Kennzeichnung verwendet.

1. Einleitung und Zielsetzung

1.1 Myokardinfarkt und Therapie

Weltweit stellen ischämische Herzerkrankungen die häufigste Todesursache dar (Mozaffarian et al. 2015). Dabei werden die lebensbedrohlichen Formen unter dem Begriff Akutes Koronarsyndrom zusammengefasst, welches sowohl die instabile Angina Pectoris, den nicht-transmuralem sowie den transmuralen Myokardinfarkt (MI) umfasst. Mithilfe eines Elektrokardiogramms (EKG) kann zwischen einem nicht-transmuralem Infarkt, welcher im EKG keine ST-Streckenhebung zeigt (NSTEMI), und einem alle Wandschichten betreffenden, transmuralen Infarkt mit ST-Streckenhebung (STEMI) unterschieden werden. Dabei kann die ST-Streckenhebung als erster Indikator für den Untergang von Myokardgewebe gewertet werden. Ursache eines akuten Myokardinfarkts ist der plötzliche Verschluss eines Koronargefäßes meist aufgrund von Thrombenbildung als Folge arteriosklerotischer Gefäßveränderungen. Dies hat eine Minderdurchblutung der Gewebe (Ischämie) zur Folge, welche von dem verschlossenen Gefäß versorgt wurden. Bei länger andauernder Unterversorgung kommt es zum Gewebeuntergang. In einigen Fällen führt dies unmittelbar zum Tod oder aber zu einer irreversiblen Schädigung des Herzens und geht mit einer starken Beeinträchtigung der Herzfunktion einher. Laut dem deutschen Herzbericht 2015 der DGK (Deutsche Gesellschaft für Kardiologie - Herz und Kreislaufforschung e.V.) lag in Deutschland im Jahr 2013 die Sterbeziffer, d.h. die Anzahl der Todesfälle pro 100.000 Einwohner, beim akuten Myokardinfarkt bei 64,4. Diese Zahl ist in den letzten 10 Jahren dank einer flächendeckenderen Herzkatheter-Therapie und besseren Notarztsystemen gesunken, dennoch erleiden jährlich ca. 205.000 Menschen in Deutschland einen akuten Myokardinfarkt und ca. 85.000 Menschen sterben daran (Lowel and Meisinger 2006). Laut dem statistischen Bundesamt der Bundesrepublik Deutschland liegt damit der akute Myokardinfarkt nach der chronischen, ischämischen Herzkrankheit seit über 15 Jahren auf Rang 2 der häufigsten Todesursachen. Dabei ist der Verdacht auf Myokardinfarkt mit fast einem Drittel aller Notarzteinsätze eines der wichtigsten Einsatzgebiete im Rettungsdienst (Sefrin and Lafontaine 2004).

Ziel der Behandlung ist eine möglichst schnelle und vollständige Revaskularisierung der verschlossenen Koronararterie (Reperfusion). Hierbei wird in den meisten Fällen eine perkutane, transluminale Koronarangioplastie (PTCA), welche der Lysetherapie in Hinblick auf Reinfarzierung und Mortalität überlegen ist, durchgeführt (Cucherat et al. 2003, Task Force on the management of et al. 2012). Bei der PTCA wird ein Katheter über einen arteriellen Zugang bis zum Gefäßverschluss eingeführt und das Gefäß mittels Ballondilatation geweitet. Durch die Implantation eines röhrenförmigen Metallgitters (Stent) wird zusätzlich die Restenose, d.h. der Wiederverschluss des zuvor okkludierten

Gefäßes, verhindert. Neben dem Einsatz von Thrombozytenaggregationshemmer (Acetylsalicylsäure, Clopidogrel, Prasugrel, Ticagrelor), muss im Anschluss durch die Einnahme von Pharmaka (Sirolimus, Paclitaxel), eine Proliferation von Glattmuskelzellen und damit eine Einengung des Stentlumens verhindert werden. Hierbei werden mittlerweile häufig bereits mit Paclitaxel- bzw. mit Sirolimus beschichtete Stents (DES, *drug eluting stent*) implantiert. Die Lysetherapie basiert auf der intravenösen (i.v.) Injektion von Fibrinolytika (z.B. Alteplase, Reteplase, Streptokinase), welche sich im Koronargefäß befindende Thromben auflösen sollen. Eine dritte Therapieoption ist die Bypass-Operation, bei welcher der Blutfluss an dem okkludierten Gefäß vorbeigelegt wird (Thygesen et al. 2012).

Die aktuellen Leitlinien der ESC (Europäische Gesellschaft für Kardiologie) fordern eine Zeit vom Auftreten der ersten Symptome bis hin zur Reperfusionstherapie von maximal 90 Minuten, die aber in den wenigsten Fällen eingehalten werden kann. Daher wären ergänzende pharmakologische Ansätze, die den auftretenden Gewebeschaden vermindern und somit die Lebensdauer und -qualität langfristig entscheidend verbessern können, von enormen Wert.

1.2 Ischämie und Reperfusion (I/R)

1.2.1 Ischämische Prozesse

Die Unterversorgung des Herzgewebes mit Sauerstoff während der ischämischen Phase und der damit einhergehenden Mangel an Nährstoffen, führt zu einem Zusammenbruch der Atmungskette in den Mitochondrien. Aus der stark verringerten Adenosintriphosphat (ATP)-Produktion resultiert ein Verlust der Energiebereitstellung in der Zelle. Eine detaillierte Beschreibung der Rolle der mitochondrialen Atmungskette während I/R ist unter Abschnitt 1.3.2 dargestellt. Diese Vorgänge zwingen zum einen die Zellen zur Umstellung auf einen anaeroben Stoffwechsel, der mit einer Anreicherung von anorganischem Phosphat (P_i), Laktat und Wasserstoffionen (H^+) einhergeht (Dennis et al. 1991). Die Verringerung des pH-Wertes führt zu einer Aktivierung des Natrium (Na^+)/ H^+ -Austauschers (NHE), wodurch die intrazelluläre Anreicherung von H^+ abgebaut wird und der intrazelluläre Na^+ -Gehalt ansteigt (Frelin et al. 1985). Zum anderen können ATP-abhängige Prozesse wie die Kalzium (Ca^{2+})-Aufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum (SR) über Kalziumpumpen (SERCA) sowie der Austausch von Na^+ gegen Kalium (K^+) über die Na^+/K^+ -ATPase nicht mehr stattfinden (Kupriyanov et al. 1996). Als direkte Folge hieraus resultiert eine Akkumulation von Ca^{2+} und Na^+ in der Zelle. Ca^{2+} gelangt durch eine Umkehrung des Na^+/Ca^{2+} -Austauschers in die Kardiomyozyten,

welcher unter physiologischen Bedingungen Ca^{2+} aus der Zelle pumpt (Schafer et al. 2001, Suleiman et al. 2001, Insette et al. 2002). Die Anreicherung an Ionen führt nun osmotisch zu einer Schwellung der Kardiomyozyten und damit zu einer Zerstörung sarkolemmaler Strukturen (Abbildung 1). Des Weiteren werden Ca^{2+} -abhängige Phospholipasen und Proteasen aktiviert, die das Gewebe endgültig irreversibel schädigen (Ferdinandy et al. 2007).

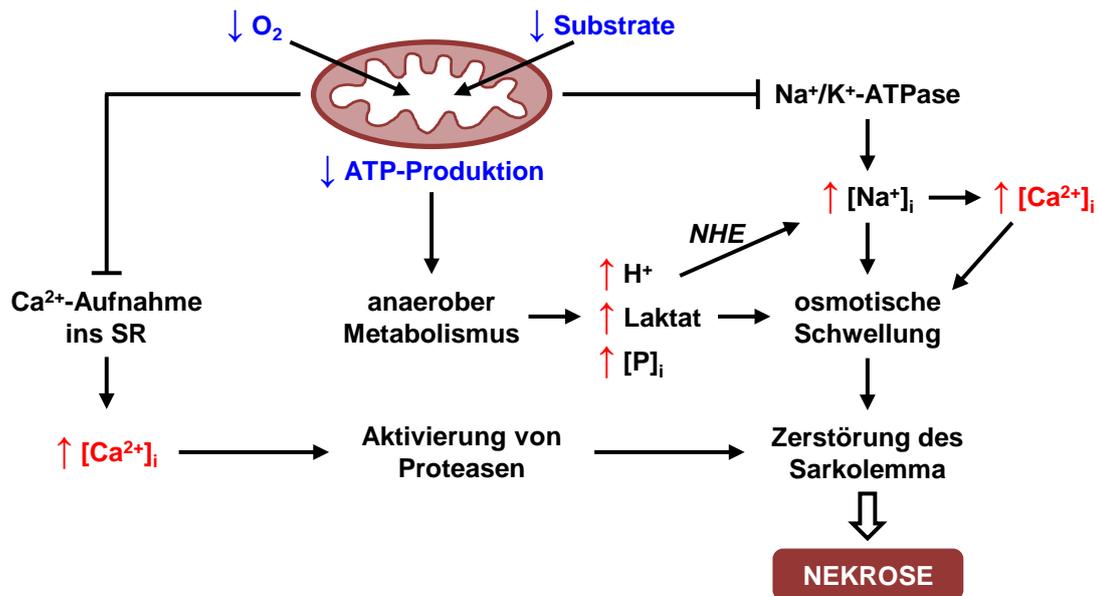


Abbildung 1: Metabolische Vorgänge während der ischämischen Phase

Während der ischämischen Phase führt der O_2 -Mangel zu einer verringerten ATP-Produktion, zu einem Anstieg intrazellulärer Ca^{2+} - und Na^+ -Konzentrationen und zu einem Absinken des pH-Wertes. Die daraus resultierende Aktivierung von Proteasen und osmotische Schwellung führt zur Zerstörung von Zellstrukturen und damit zur Nekrose (modifiziert nach Ferdinandy et al. 2007). NHE: Na^+/H^+ -Austauscher, SR: Sarkoplasmatisches Retikulum

1.2.2 Reperfusionsschaden

Die bislang einzige Möglichkeit das Herz vor den irreversiblen Schäden, die durch die Ischämie verursacht werden, zu schützen, ist die schnellstmögliche Wiedereröffnung des okkludierten Gefäßes, die sog. Reperfusion. In Abbildung 2 wird der direkte Zusammenhang des auftretenden Zelltodes mit der Dauer der ischämischen Phase deutlich (Ovize et al. 2010). Je länger die Unterversorgung des Gewebes anhält umso mehr Zelltod tritt auf bis schlussendlich alle Zellen, die von dem okkludierten Gefäß versorgt wurden, zugrunde gegangen sind.

Interessanterweise geht die Wiederversorgung des Gewebes insbesondere in den ersten Minuten mit einem massiven Anstieg an Zelltod einher (Piper et al. 2003, Garcia-Dorado 2004). Dieses Phänomen wird als Reperfusionsschaden bezeichnet und wurde erstmals 1960 von der Arbeitsgruppe um Prof. Linn beschrieben (Jennings et al. 1960). Wie in

Abbildung 2 zu erkennen ist, trägt der Reperfusionsschaden selbst einen beachtlichen Teil zum Untergang des kardialen Gewebes bei (Garcia-Dorado and Piper 2006). Im Folgenden werden die Mechanismen, die diesem Ereignis zu Grunde liegen, näher beleuchtet.

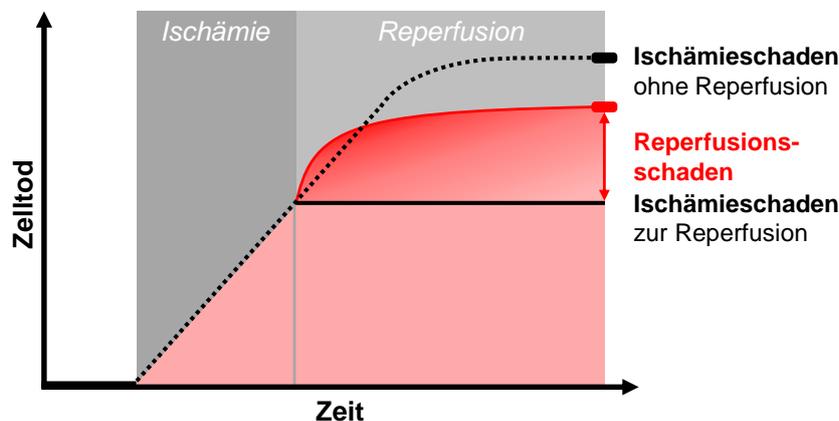


Abbildung 2: Prinzip des Ischämie/ Reperfusionsschadens

Das Ausmaß des Zelltodes ist direkt abhängig von der Dauer der Ischämie. Doch auch die Wiedereröffnung des okkludierten Gefäßes, die sog. Reperfusion, geht in den ersten Minuten mit einem massiven Gewebeeruntergang einher, welcher als Reperfusionsschaden bezeichnet wird (modifiziert nach Garcia-Dorado and Piper 2006).

Die plötzliche Wiederherstellung des koronaren Blutflusses führt neben dem Wiederaufbau der Energieversorgung, der Normalisierung des pH-Wertes und der Osmolarität zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Die das Myokardgewebe rettende sowie gleichzeitig gewebezerstörenden Eigenschaften des Sauerstoffs, welche auf der Bildung von Sauerstoffradikalen beruhen, werden verbreitet als „Sauerstoff-Paradoxon“ bezeichnet (Opie 1989, Paradies et al. 2004, Kalogeris et al. 2014).

Durch das Überangebot an molekularem Sauerstoff ist die Reaktivierung der mitochondrialen Atmungskette mit einer massiven ROS-Bildung, sowie der Bildung von reaktiven Stickstoffverbindungen (RNS) in der Anwesenheit von Stickstoffmonoxid (NO), verknüpft. ROS und RNS verursachen zum einen direkt die weitere Zerstörung sarkolemmaler Strukturen aufgrund oxidativer und nitrosativer Mechanismen und führen zum anderen zur Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR, welches während der Reperfusion eine besondere Rolle spielt (Abbildung 3, (Ferdinandy et al. 2007)). Dadurch steigt die bereits durch die ischämische Phase erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration weiter an. Die Wiederaufnahme der ATP-Produktion begünstigt die Reaktivierung der ATP-abhängigen Ionenpumpen, insbesondere von SERCA, welche die Aufnahme von Ca^{2+} in das SR fördern. Das Ca^{2+} wird aber unmittelbar über die Ryanodin-sensitiven Ca^{2+} -Kanäle wieder ins Zytosol abgegeben. Die kontinuierliche Ca^{2+} -Aufnahme und -Freisetzung ruft hochfrequente Ca^{2+} -Oszillationen hervor, die in Kombination mit den hohen zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen, eine exzessive Aktivierung der Myofibrillen

auslösen und damit zu unkontrollierten Kontraktionen führen. Diese können eine irreversible Verkürzung des Zytoskeletts, eine sog. Hyperkontraktur, hervorrufen, welche zu Rupturen der Zellmembranen und damit unmittelbar zum Zelltod führen können (Barrabes et al. 1996, Ladilov et al. 1997, Ruiz-Meana et al. 2009). Der Einfluss einer akut erhöhten Ca^{2+} -Konzentration auf die Mitochondrienfunktion sowie der resultierende Reperfusionsschaden sind in Abschnitt 1.3.2 dargestellt.

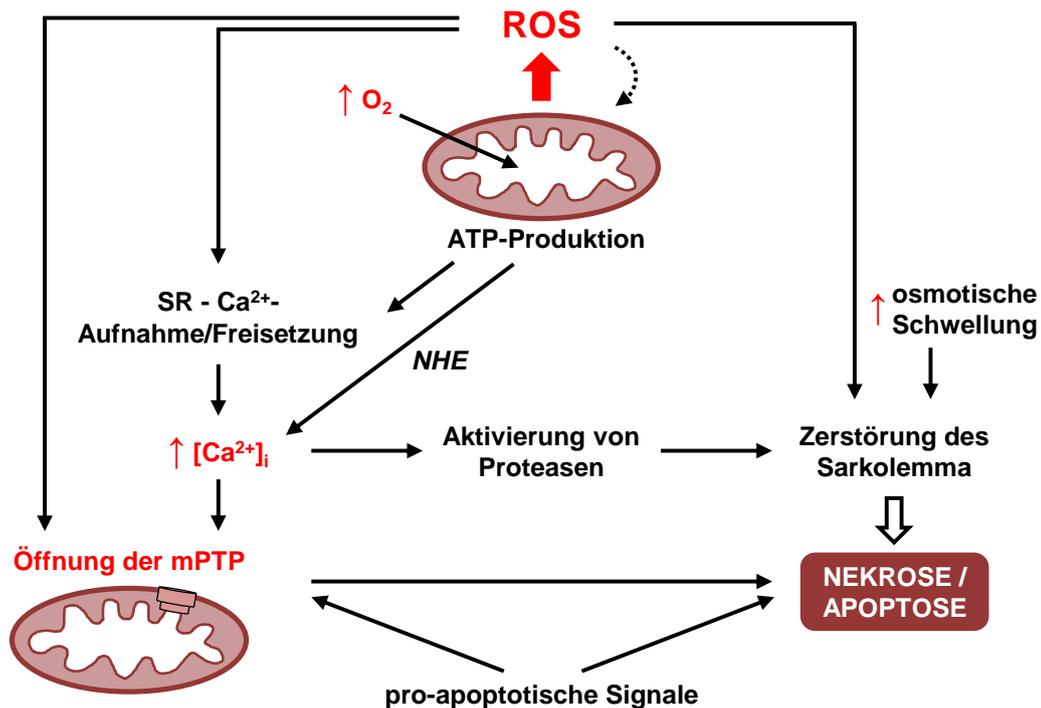


Abbildung 3: Metabolische Vorgänge zu Beginn der Reperfusion

Die plötzliche Wiederherstellung des Blutflusses führt insbesondere zu Beginn der Reperfusion zu einer Überproduktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Dies begünstigt einen weiteren Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und eine Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP). Durch die Wiederaufnahme der ATP-Produktion werden Pumpen aktiviert, die wiederum eine kontinuierliche Ca^{2+} -Aufnahme und -Freisetzung begünstigen und damit eine Hyperkontraktur auslösen. Zusätzlich werden die Aktivierung von Proteasen und die osmotische Schwellung weiter gefördert. Diese Mechanismen führen zur Einleitung des Zelltodes über nekrotische sowie apoptotische Vorgänge (modifiziert nach Ferdinandy et al. 2007). *NHE*: Na^+/H^+ -Austauscher, *SR*: Sarkoplasmatisches Retikulum

Ein weiterer wichtiger Punkt der Reperfusion ist die Normalisierung des pH-Wertes, welcher während der Ischämie sowohl intra- als auch extrazellulär stark absinkt (siehe Abschnitt 1.2.1). Durch die Wiederdurchblutung wird der extrazelluläre pH-Wert schnell auf Normalniveau gebracht, wodurch ein Protonengradient zum Zytosol resultiert. Dieser führt zu einer Aktivierung der Na^+/H^+ -Austauscher und der $\text{Na}^+/\text{Hydrogenkarbonationen}$ (HCO_3^-)-Symporter (Lagadic-Gossmann and Vaughan-Jones 1993, Piper et al. 1996). Der H^+ -Auswärtstransport ist somit mit einem Anstieg der zytosolischen Na^+ -Konzentration verbunden. Diesem wird durch Aktivierung weiterer Ionenpumpen entgegengewirkt,

welche sowohl K^+ als auch Ca^{2+} im Austausch gegen Na^+ in die Zelle bringen und somit die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration noch weiter ansteigen lassen. Die allgemein hohe intrazelluläre Ionenkonzentration während der Reperfusionsphase, sowie die Endprodukte des anaeroben Stoffwechsels führen zur osmotischen Wasseraufnahme und damit zu einer Erhöhung des intrazellulären Drucks (Grinstein et al. 1992, Garcia-Dorado and Oliveras 1993). Dies hat im Folgenden eine mechanische Beanspruchung und in Kombination mit der Hyperkontraktur und dem vorherigen Energieentzug eine Zerstörung der zellulären Strukturen bis hin zum Zelltod zur Folge (Ruiz-Meana et al. 1995, Ruiz-Meana et al. 1996, Schluter et al. 1996). In der Literatur ist in diesem Zusammenhang bereits mehrfach beschrieben worden, dass im Tiermodell die Durchführung einer hyperosmotischen Reperfusion das Herz vor einem osmotischen Anschwellen und damit vor dem Zelltod bewahren kann (Kloner et al. 1976, Trantum-Jensen et al. 1981, Garcia-Dorado et al. 1992).

Die in diesem Kapitel bislang beschriebenen Schädigungsprozesse bei der Reperfusion weisen größtenteils auf einen nekrotischen Zelltod hin. Dennoch ist mittlerweile bekannt, dass neben der Nekrose auch apoptotische Vorgänge eine wichtige Rolle spielen. Die verschiedenen Formen des Zelltodes, die bei I/R auftreten, sind in Abschnitt 1.4 detailliert beschrieben.

1.3 Rolle der Mitochondrien während I/R

1.3.1 Physiologische Funktionen

Mitochondrien nehmen ca. 30 % des Kardiomyozytenvolumens ein (Tait and Green 2012). Ihre Hauptfunktion stellt die Energiebereitstellung für die Zellkontraktion dar. Die daran beteiligte Atmungskette ist an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und besteht aus den Komplexen I-V, über die ein Elektronentransport stattfindet.

Dabei dienen die Coenzyme Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) und Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) aus dem Citratzyklus als Ausgangsstoffe für die oxidative Phosphorylierung (OxPhos). Die aus den Oxidationen freiwerdenden Elektronen werden zunächst auf Coenzym Q und im nächsten Schritt auf Cytochrom C übertragen. Mittels der Cytochrom C-Oxidase wird nun in Komplex IV molekularer Sauerstoff zu Wasser reduziert. Die während des Prozesses entstehenden Protonen werden in den Intermembranraum transportiert und bauen einen Protonengradienten auf, der im letzten Schritt die ATP-Produktion mittels der F_0F_1 -ATP-Synthase aktiviert. (Mitchell 1976, Hatefi 1985, Klingenberg 2008)

Darüber hinaus sind Mitochondrien auch an der Regulation des Zelltodes sowie an der ROS-Produktion beteiligt.

1.3.2 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Unter physiologischen Bedingungen werden primär von Komplex I ROS-Mengen, die der Signaltransduktion dienen, freigesetzt (Di Lisa et al. 2007). Wie bereits in Abbildung 3 dargestellt, ändert sich dies während der I/R, wo insbesondere zum Zeitpunkt der Reperfusion eine massive Bildung reaktiver Sauerstoffspezies einsetzt (Heusch et al. 2008). Es konnte gezeigt werden, dass eine reversible Inhibierung von Komplex I durch S-Nitrosylierung die exzessive ROS-Produktion zu Beginn der Reperfusion unterbinden kann und sich damit kardioprotektiv auswirkt (Burwell and Brookes 2008). Neben der Atmungskette existieren noch weitere Quellen für die ROS-Bildung, die jedoch eine untergeordnetere Rolle zu spielen scheinen und zu einem späteren Zeitpunkt aktiv werden. Hierzu zählen die Monoaminoxidase an der äußeren, mitochondrialen Membran, die Xanthinoxidase, die NAD(P)H-Oxidase und weitere NO-Synthasen (Kaludercic et al. 2011, Lassegue et al. 2012, Granger and Kviety 2015).

Die Mechanismen, die zu der massiven ROS-Generierung von Komplex I und II während der I/R führen, wurden erst kürzlich von den Arbeitsgruppen um Michael P. Murphy und Thomas Krieg entschlüsselt. Sie konnten zeigen, dass während der ischämischen Phase eine Umkehrung des von der Succinatdehydrogenase katalysierten Vorgangs aus Komplex II stattfindet und dies zu einer Akkumulation von Succinat führt (Chouchani et al. 2014). Dieser Vorgang erlaubt Komplex I den Protonentransport aufrecht zu erhalten (Pell et al. 2016). Die schnelle Oxidation des Succinats in den ersten Minuten der Reperfusion und die großen pH-Unterschiede führen zu einem Elektronenrückfluss zu Komplex I, wodurch große Mengen an ROS generiert werden (Chouchani et al. 2016).

Ob eine Zelle nachdem sie oxidativem Stress ausgesetzt war überlebt oder zugrunde geht, ist also letztlich von der Mitochondrien(dys)funktion unter diesen Bedingungen abhängig (Kroemer et al. 2007). Die Einleitung des Zelltodes wird durch die Ausbildung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-pore (mPTP, Abbildung 3), einer unspezifischen Pore, welche die innere und die äußere Mitochondrienmembran durchzieht, ausgelöst (Halestrap and Brenner 2003, Bernardi et al. 2006). Die genaue Struktur der Pore ist noch nicht aufgeklärt, es wird allerdings postuliert, dass die F_0F_1 -ATP-Synthase einen wichtigen Bestandteil darstellt (Giorgio et al. 2013, Alavian et al. 2014). Während der Ischämie wird eine Öffnung der Pore aufgrund des niedrigen pH-Wertes verhindert (Suleiman et al. 2001). Die großen ROS- und Ca^{2+} -Spiegel und der

Mangel an ATP stellen die Auslöser für die Öffnung der mPTP zu Beginn der Reperfusion dar.

1.3.3 Superoxiddismutasen (SODs) als endogene Antioxidantien

Endogenen Antioxidantien kommt eine wichtige Aufgabe zu, Zellorganellen vor reaktiven Sauerstoffspezies zu schützen. Im Herzen sind die drei wichtigsten Vertreter die Superoxiddismutasen (SODs), die Katalase und die Glutathionperoxidase (Dhalla et al. 2000). Es existieren drei Isoformen der SODs, welche alle die Disproportionierung von Sauerstoffradikalen zu molekularem Sauerstoff und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) katalysieren. Das entstehende H_2O_2 wird letztlich von der Katalase und der Glutathionperoxidase in Wasser umgewandelt (Stralin et al. 1995).

Da den SODs im Zusammenhang mit der I/R die größte Bedeutung zukommt, wird im Folgenden auf diese detaillierter eingegangen. Die Kupfer/Zink-SOD (CuZnSOD, SOD 1) besitzt im katalytischen Zentrum ein Kupfer- und ein Zinkion und ist hauptsächlich im Zytoplasma (Weisiger and Fridovich 1973b, Crapo et al. 1992), sowie in geringen Mengen im mitochondrialen Intermembranraum und auf der Zelloberfläche lokalisiert (Okado-Matsumoto and Fridovich 2001). Die ebenfalls intrazelluläre MnSOD (SOD 2) wird in der Mitochondrienmatrix und an der inneren Mitochondrienmembran exprimiert und enthält ein Manganion im Zentrum (Weisiger and Fridovich 1973a). Die immense Bedeutung der MnSOD leitet sich bereits aus der Tatsache ab, dass sich ein Knockout des MnSOD-Gens in Mäusen letal auswirkt und bereits heterozygote Tiere anfälliger für oxidative Schäden sind (Li et al. 1995, Tsan 2001, Van Remmen et al. 2003). Im Myokardinfarktmodell konnte zudem *in vivo* gezeigt werden, dass sich eine Überexpression der MnSOD protektiv auf die Infarktgröße auswirkt (Chen et al. 1998, Jones et al. 2003). Im Gegensatz hierzu hatte weder eine Deletion der Glutathionperoxidase noch der CuZnSOD einen Einfluss auf den I/R-Schaden (Jones et al. 2003). Die Aktivitäten der intrazellulären SODs können durch post-translationale Modifikationen beeinflusst werden. So sind beispielsweise für die MnSOD Nitrierungen durch $ONOO^-$ und Phosphorylierungen beschrieben, die eine Runterregulation der SOD-Aktivität zur Folge haben. Interessanterweise existieren Hinweise, dass die durch ROS aktivierbare Kinase ERK (*p42/p44 extracellular signal regulated kinases*) an einer Phosphorylierung der MnSOD beteiligt sein könnte (Candas and Li 2014).

Die dritte Isoform der SODs stellt die extrazelluläre SOD (EC SOD, SOD 3) mit den höchsten Expressionslevel in der Niere, der Lunge und in Glattmuskelzellen dar (Marklund 1984). Trotz ihrer geringen kardialen Expression, scheint die EC SOD eine

Rolle bei der Kardioprotektion zu spielen. Durch eine adenovirale Transfektion mit EC SOD konnte die Infarktgröße in Kaninchen nach I/R signifikant gesenkt werden und auch ihre genetische Deletion führte in Mäusen nach permanenter Ligatur zu einer gesteigerten linksventrikulären Herzhypertrophie (Li et al. 2001, van Deel et al. 2008). Dabei unterbindet die EC SOD extrazellulär und damit Mitochondrien-unabhängig die Generierung von ONOO⁻ und schützt NO vor Inaktivierung (Bolli 2007).

1.4 Zelltodmechanismen bei I/R

Im Allgemeinen werden drei verschiedene Formen des Zelltodes unterschieden. An dem I/R-Schaden und Zelltod sind nach heutiger Kenntnis primär apoptotische und nekrotische Vorgänge und Signalwege beteiligt; die Autophagie, als dritte Form des Zelltodes, scheint eher eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Vor der Entdeckung der Apoptose 1971 wurde jeglicher Zelltod als Nekrose bezeichnet (Kerr 1971). Die Nekrose zeigt sich als passiver Prozess, dessen Auslöser meist ein Schaden an der Zellintegrität, welcher durch ein starkes Anschwellen der Zelle verursacht wurde, darstellt. Daraus resultiert ein Zusammenbruch der Zellhomöostase sowie der Austritt von intrazellulären Bestandteilen, wodurch eine Entzündungsreaktion ausgelöst wird (Zong and Thompson 2006). Kerr, Wyllie und Currie definierten zu Beginn der 70er Jahre erstmals den Begriff Apoptose als einen programmierten Zelltod (Kerr et al. 1972). Im Gegensatz zur Nekrose ist die Apoptose ein aktiver, ATP-abhängiger Prozess. Hier löst die Zelle aufgrund externer oder interner Stimuli ihren eigenen, programmierten Zelltod aus. Charakteristische Merkmale der Apoptose sind das Schrumpfen der Zellen, die Bildung von Apoptosekörpern, sowie die Chromatinkondensation und eine Fragmentierung der DNA auf definierte Größen (Orrenius et al. 2007). Die Apoptose kann sowohl durch den extrinsischen als auch durch den intrinsischen Signalweg ausgelöst werden. Diese Kaskaden unterscheiden sich in ihrer Initialphase, enden jedoch beide mit der Aktivierung der Effektorcaspase 3, welche die Chromatinkondensation und die DNA-Fragmentierung initiiert (Bayir and Kagan 2008). Zudem wird postuliert, dass die Caspase 3 durch eine Förderung der Cytochrom C-Freisetzung aus den Mitochondrien das initiale Todessignal amplifiziert (Lakhani et al. 2006). Extrinsische Stimuli wie Zytokine, Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) oder Fas-Liganden triggern nach Rezeptorbindung die intrazelluläre Signalweiterleitung zur Aktivierung der Caspase 8 (Oberholzer et al. 2001). Bei der intrinsische Apoptosekaskade translokalisieren pro-apoptotische Proteine wie beispielsweise Bax (*Bcl-2 associated protein X*) und Bak (*Bcl-2 antagonist/killer*) aus der Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*)-Familie zu den Mitochondrien

(Oltvai et al. 1993). Die resultierende Erhöhung der Membranpermeabilität führt zur Freisetzung von Proteinen wie Cytochrom C und Apoptose-induzierender Faktor (AIF) aus dem Intermembranraum, welcher die Formation des sog. Apoptosoms fördert (Liu et al. 1996, Susin et al. 1996). Dieses kann daraufhin die Caspase 9 aktivieren, welche entsprechend der Caspase 8 aus dem extrinsischen Signalweg die proteolytische Aktivierung der Effektorcaspase 3 auslöst (Bayir and Kagan 2008).

Ob der Zelltod bei I/R durch apoptotische oder nekrotische Prozesse erfolgt, wurde in der Vergangenheit heftig debattiert. Eine Inhibierung der Atmungskette während der Ischämie und die dadurch verringerte ATP-Produktion lösen in Neuronen nekrotische Prozesse aus (Hartley et al. 1994, Ohgoh et al. 2000). Die exzessive Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies zu Beginn der Reperfusion kann zu Lipidoxidationen führen, welche Schäden in der Membranintegrität verursachen. Des Weiteren werden Disulfidbrücken angegriffen und damit Funktionen verschiedener Proteine modifiziert. Beide Prozesse können zu einer Erhöhung des Ca^{2+} -Einstroms führen. Welcher Zelltod auftritt könnte dabei auch von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration abhängig sein. Niedrigere Ca^{2+} -Spiegel (200-400 nM) werden mit apoptotischen Prozessen in Verbindung gebracht, während Nekrose bei Ca^{2+} -Konzentrationen $> 1 \mu\text{M}$ auftritt (Zong and Thompson 2006).

Die Öffnung der mPTP stellt ein weiteres wichtiges Ereignis während der Reperfusion dar. Solange die Pore geöffnet ist, kann keine ATP-Generierung durch oxidative Phosphorylierung stattfinden, was gegen die Initiierung eines ATP-abhängigen, programmierten Zelltod und für nekrotische Vorgänge spricht (Suleiman et al. 2001). Jedoch kann eine Öffnung der Pore auch zur Freisetzung mitochondrialer, pro-apoptotischer Faktoren führen und damit Apoptose einleiten (Narita et al. 1998, Pastorino et al. 1998). In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde allerdings gezeigt, dass in herzspezifischen Caspase 3- und globalen Caspase 7-defizienten Doppelmutanten kein Unterschied im Infarktareal oder der Herzfunktion nach I/R zu erkennen war (Inserte et al. 2016).

Mittlerweile ist eine Koexistenz beider Formen des Zelltodes bei I/R weitgehend akzeptiert. In welchem Ausmaß der jeweilige Zelltod auftritt, ist dabei stark von der Intensität und Dauer des Infarkts abhängig. Es wird vermutet, dass der zentrale, schwer betroffene ischämische Bereich nach einem Myokardinfarkt primär von Nekrose und die Randbereiche verstärkt von Apoptose betroffen sind (Bonfoco et al. 1995, Fliss and Gattinger 1996, Bartling et al. 1998).

1.5 Kardioprotektion durch Konditionierung

1.5.1 Ischämische Präkonditionierung (iPre) des Herzens

Noch bevor das Phänomen der ischämischen Präkonditionierung (iPre) bekannt war, machten Kardiologen die Feststellung, dass Patienten mit akuten Myokardinfarkt oder instabiler Angina pectoris, die zuvor mindestens einmal Symptome einer Angina pectoris zeigten, in den meisten Fällen geringere EKG-Veränderungen, weniger kardiale Folgeschäden und sogar reduzierte Infarktgrößen aufwiesen (Jaffe and Quinn 1980). Diese Beobachtung wurde mittlerweile durch eine Vielzahl retrospektiver Studien belegt (Ottani et al. 1995, Ishihara et al. 1997, Ishihara et al. 2006).

Murry et al. beschrieben 1986, dass in isolierten Hundeherzen ein viermaliger Verschluss der linken Koronararterie (LCA) von jeweils fünf Minuten, unterbrochen von jeweils fünf Minuten Reperfusion direkt vor der 40-minütigen Ischämie zu einer Reduktion der Infarktgröße um 75 % führt. Sie etablierten damit den Begriff der ischämischen Präkonditionierung, der eine Kardioprotektion durch kurze Perioden von Ischämie und Reperfusion unmittelbar vor der eigentlichen ischämischen Phase beschreibt. Die iPre wird in zwei verschiedene Formen eingeteilt. Zum einen die akute Form, welche eine unmittelbare Kardioprotektion aufgrund der Aktivierung direkt verfügbarer Signalmoleküle vermittelt. Dieser Effekt ist jedoch nach einem Zeitfenster von über zwei Stunden zwischen dem präkonditionierenden Stimulus und der Ischämie verschwunden (Murry et al. 1986). Zum anderen die zweite, verzögerte Form, welche nach einem Zeitintervall von 24 bis 48 Stunden messbar ist. Die Ausprägung dieser iPre ist weniger stark protektiv und ist auf eine gesteigerte Expression schützender Proteine zurückzuführen (Kuzuya et al. 1993, Marber et al. 1993, Bolli 2000). Im Gegensatz hierzu zeigten Masae Ishihara und ihre Gruppe 2006 in einer retrospektiven Studie, dass dieses kardioprotektive Phänomen in Patienten, die bereits zuvor einen Myokardinfarkt erlitten hatten, nicht mehr auftrat (Ishihara et al. 2006). Um die molekularen Mechanismen, welche sich hinter der akuten Präkonditionierung verbergen, genauer zu verstehen, wurde bereits eine Vielzahl von Studien durchgeführt und über 100 verschiedene Signalmoleküle und Mechanismen identifiziert (Heusch 2015). Hierbei kristallisierte sich vor allem der RISK (*reperfusion injury salvage kinase*)-Signalweg mit seinen Hauptmediatoren ERK (*p42/p44 extracellular signal regulated kinases*) und Akt (Proteinkinase B) für die intrazelluläre Signaltransduktion heraus (Hausenloy et al. 2004). Abbildung 4 zeigt schematisch die der iPre zugrunde liegenden Mechanismen. Dabei kann die iPre in zwei Phasen, eine Triggerphase (1.Phase) und eine Mediatorphase (2.Phase, *dargestellt in grün*) eingeteilt werden. Die in der Triggerphase während den kurzen Perioden von Ischämie und Reperfusion ablaufenden Ereignisse erhalten hierbei die Schutzmechanismen des

Myokards über die eigentliche Ischämie hinaus und triggern den Ablauf der Mediatorphase, welche mit Beginn der Reperfusion einsetzt (Costa et al. 2008).

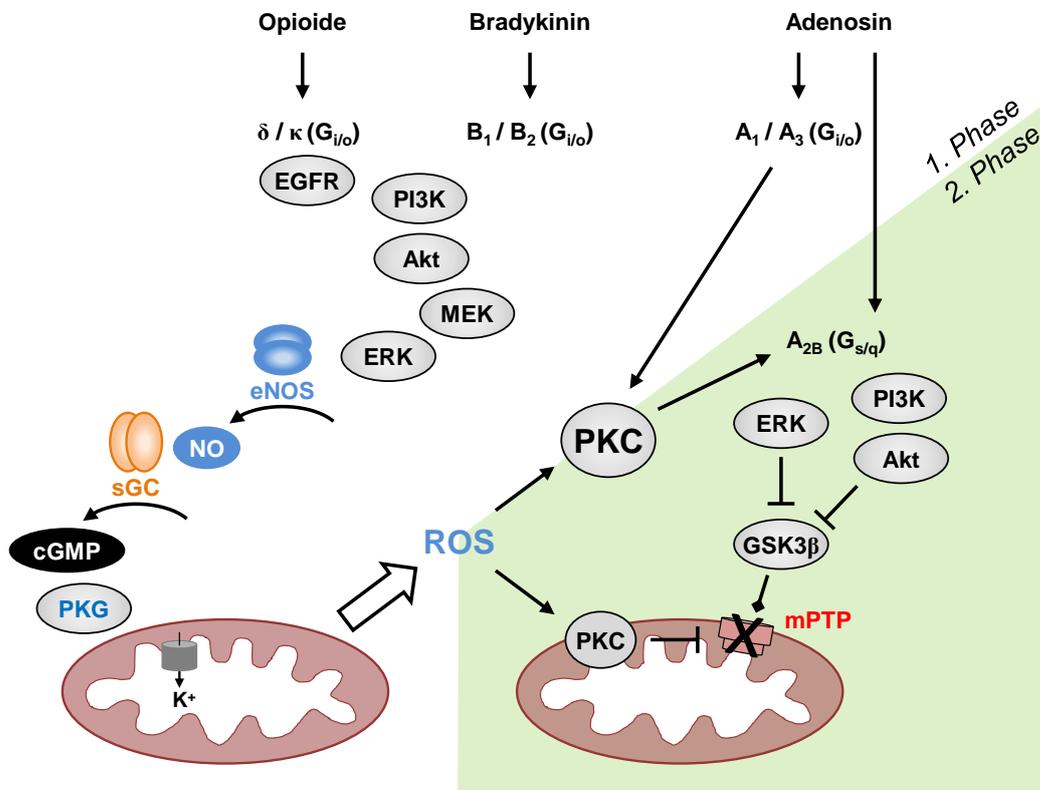


Abbildung 4: Schematische Darstellung der kardioprotektiven Signaltransduktion

In der 1. Phase („Triggerphase“) der Präkonditionierung (*iPre*) werden Mediatoren wie Opioiden, Bradykinin und Adenosin freigesetzt, die unter der Beteiligung verschiedener Kinasen den NO/cGMP/PKG I-Signalweg aktivieren. Über mitochondriale K⁺-Kanäle werden reaktive Sauerstoffspezies (ROS) generiert, die zu einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) führen, welche eine Schlüsselrolle zwischen der 1. und 2. Phase einnimmt. In der „Mediatorphase“ (grün) findet Kinasen-vermittelte Phosphorylierung und damit Inaktivierung der GSK3β statt. Dadurch wird die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-pore (mPPT) verhindert (modifiziert nach Costa et al. 2008). *Akt*: Proteinkinase B, *cGMP*: zyklisches Guanidin 3',5'-monophosphat, *EGFR*: epidermal growth factor receptor, *eNOS*: endotheliale NO-Synthase, *ERK*: p42/p44 extracellular signal regulated kinases, *GSK3β*: Glykogensynthase-Kinase-3β, *PI3K*: Phosphatidylinositol 3-Kinase, *PKG*: cGMP-abhängige Proteinkinase, *MEK*: MAP/ERK-Kinase, *NO*: Stickstoffmonoxid, *sGC*: lösliche Guanylatzyklase.

Es ist eine Reihe von endogenen Substanzen bekannt, die eine *iPre* auslösen können. Hierzu zählen unter anderem Adenosin (Schulz et al. 1995, Yang et al. 2005), Bradykinin (Penna et al. 2008) und Opioiden (Gross et al. 2004), welche unterschiedliche G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) aktivieren (Abbildung 4). Kardiomyozyten exprimieren die Adenosinrezeptoren A₁ (G_{i/o}), A_{2A} (G_s), A_{2B} (G_{s/q}) und A₃ (G_{i/o}) im Sarkolemma (Mubagwa and Flameng 2001, Headrick et al. 2013). Opioiden aktivieren G_i-gekoppelte κ- und δ-Rezeptoren, wobei insbesondere der δ-Rezeptor eine wichtige Rolle bei der *iPre* zu spielen scheint (Ikeda et al. 2006). Des Weiteren existieren in Kardiomyozyten zwei verschiedene Bradykininrezeptoren, wodurch einer durch Stress induziert (B₁, G_{q/i}) und der zweite konstitutiv exprimiert wird (B₂, G_{q/i}) (Marceau et al. 1998, Tschöpe et al. 2000).

Neben der endogenen Aktivierung der Kardioprotektion, kann diese auch über exogene Applikation verschiedener Substanzen und Neurohormone wie beispielsweise Acetylcholin (Cohen et al. 2001, Krieg et al. 2004), Angiotensin II (Liu et al. 1995, Dawn 2006) oder Epoxyeicosatriensäure (Nithipatikom et al. 2006) vermittelt werden.

Der erste zytosolische Mediator wurde von der Arbeitsgruppe um James M. Downey beschrieben, die zeigte, dass eine Inhibierung der Proteinkinase C (PKC) den protektiven Effekt der iPre aufheben kann (Liu et al. 1994, Ytrehus et al. 1994). Die PKC spielt bei der iPre eine bedeutende Rolle, da bei ihr die Signalwege der endogenen kardioprotektiven Liganden zusammenlaufen und ihr vermutlich die Schlüsselfunktion zwischen 1. und 2. Phase zukommt (Downey et al. 2007, Costa et al. 2008). Bradykinin und Opioide aktivieren beide die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), welche daraufhin Akt phosphoryliert und damit aktiviert (Tong et al. 2000, Oldenburg et al. 2004). Im nächsten Schritt wird über die endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) das Signalmolekül Stickstoffmonoxid (NO) generiert (Dimmeler et al. 1999). NO fungiert als Aktivator der löslichen Guanylatzyklase (sGC) und führt zur Bildung des Botenstoffs zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP), welches die cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I (PKG I oder cGKI) aktiviert (siehe Abschnitt 1.6). Dies führt zur Öffnung mitochondrialer Kaliumkanäle. In der Literatur ist dabei vor allem die Rolle des ATP-abhängigen Kaliumkanals (K_{ATP}) beschrieben. Der K^+ -Einstrom über den K_{ATP} -Kanal führt zu einem leichten Anschwellen der Mitochondrien und einer milden Erhöhung der ROS-Produktion (Andrukhiv et al. 2006, Costa et al. 2006). Im Jahr 2014 konnte außerdem gezeigt werden, dass auch dem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten BK-Kanal eine wichtige Bedeutung bei der iPre zukommt (siehe Abschnitt 1.7.3). Die PKC kann direkt durch ROS aktiviert werden (Korichneva et al. 2002). Auf die Rolle des NO/cGMP/PKG-Signalweges bei I/R wird detailliert in Abschnitt 1.6 eingegangen. Adenosin kann ebenfalls die PI3K aktivieren (Krieg et al. 2002), sein primärer kardioprotektiver Mechanismus verläuft jedoch über eine von K^+ -Kanälen und ROS-unabhängigen Aktivierung der PKC, deren Signalweg noch nicht vollständig entschlüsselt ist (Cohen et al. 2001, Qin et al. 2003). Interessanterweise scheint bei größeren Säugetieren die PKC α -Isoform wichtig für die Kardioprotektion zu sein (Kitakaze et al. 1994, Schulz et al. 2003), wohingegen bei Nagetieren der PKC ϵ die Hauptrolle zugeschrieben wird (Gray et al. 1997, Ping et al. 2002).

Die genaue Signaltransduktion zu Beginn der Mediatorphase in den ersten Minuten der Reperfusion ist noch nicht entschlüsselt. Es wurde jedoch gezeigt, dass eine aktive PKC unabdingbar für die Protektion ist und ihre Funktion u.a. aus einer Erhöhung der Sensitivität der G_s -gekoppelten A_{2B} -Rezeptoren besteht (Kuno et al. 2007). Weitere zentrale Effektoren sind ERK und Akt, die im phosphorylierten Zustand die

Glykogensynthase-Kinase-3 β (GSK3 β) phosphorylieren und damit die Öffnung der mPTP verhindern (Tong et al. 2002, Juhaszova et al. 2004, Solenkova et al. 2006). Die GSK3 β gehört dabei zu den wenigen Kinasen, welche konstitutiv aktiv sind und durch Phosphorylierung inhibiert werden.

1.5.2 Ischämische Postkonditionierung (iPost) des Herzens

Da die iPre für die Therapie eines akuten Myokardinfarkts nur von geringer Bedeutung ist, wurde nach Möglichkeiten gesucht, die Infarktgröße auch bei bereits bestehender Ischämie zum Zeitpunkt der Reperfusion zu reduzieren. Im Jahr 2003 wurde von der Arbeitsgruppe um Jakob Vinten-Johansen beschrieben, dass drei Zyklen mit jeweils 30 Sekunden Ischämie und Reperfusion direkt zu Beginn der Reperfusion die Infarktgröße vergleichbar zur iPre reduzieren können (Zhao et al. 2003). Dies prägte den Begriff der ischämischen Postkonditionierung (iPost), die kurze, repetitive Episoden von Ischämie und Reperfusion direkt nach der eigentlichen Ischämie beschreibt. Interessanterweise ist die iPost im Gegensatz zur iPre nur in einem sehr begrenzten Zeitfenster möglich. Bei kleinen Nagetieren wird ein Zeitintervall von 10 bis maximal 60 Sekunden nach Beginn der Reoxygenierung beschrieben, in welchem die iPost beginnen muss. Auch beim Menschen konnte bereits nach fünf Minuten kein Effekt mehr erzielt werden (Kin et al. 2004, Vinten-Johansen et al. 2005). Des Weiteren sind mindestens drei Zyklen Okklusion und Reperfusion notwendig um eine Kardioprotektion durch iPost zu erzielen (Ovize et al. 2010). Trotz vielversprechender Ergebnisse im Tiermodell wird die Translation der Postkonditionierung in die Klinik kontrovers diskutiert. Kleinere Studien zeigten bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt (STEMI) nach iPost und PTCA eine Verbesserung der kardialen Parameter beispielsweise eine Reduktion der Infarktgröße, eine erhöhte Perfusion des Herzgewebes, sowie eine Auflösung der ST-Streckenhebung und eine verbesserte Auswurfraction (EF) im Vergleich zu den Kontrollgruppen, bei welchen nur die PTCA durchgeführt wurde (Staat et al. 2005, Laskey et al. 2008, Xue et al. 2010). Doch konnte dies weder 2013 in einer groß angelegten multizentrischen Studie mit 700 Patienten (Hahn et al. 2013) noch in weiteren kleineren Studien (Sorensson et al. 2010, Freixa et al. 2012, Tarantini et al. 2012) bestätigt werden.

Der Mechanismus der Postkonditionierung beruht nach heutigem Kenntnisstand größtenteils auf der gleichen Signaltransduktion wie die Präkonditionierung. So wird auch hier die Kardioprotektion über die endogenen Liganden Adenosin (Yang et al. 2005), Bradykinin (Penna et al. 2008) und Opiode (Gross et al. 2004) vermittelt. Des Weiteren spielen ebenfalls die am RISK-Signalweg beteiligten Kinasen PI3K, ERK und Akt eine

wichtige Rolle (Hausenloy and Yellon 2006). Wie in Abbildung 4 gezeigt führt auch bei der iPost die Phosphorylierung dieser Kinasen zu einer Aktivierung der eNOS und damit der sGC (Penna et al. 2006). Als Folge wird die Öffnung der mPTP verhindert, was zum Schutz der Kardiomyozyten den Zelltod unterbindet (siehe hierfür auch Abschnitt 1.3.2) (Argaud et al. 2005, Bopassa et al. 2006). Cohen et al. postulierten 2007 zudem, dass der Schutz durch iPost primär über den Erhalt des niedrigen pH-Wertes und der damit verbundenen Inhibition der Öffnung der mPTP ausgelöst wird. Sekundär wird durch die kurzen Phasen der Reoxygenierung eine moderate ROS-Bildung stimuliert, was als Trigger für die in Abbildung 4 dargestellte Signalkaskade fungiert (Cohen et al. 2007).

1.6 Der NO/cGMP/PKG-Signalweg

1.6.1 Zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP)

cGMP wurde 1963 erstmals im Rattenurin beschrieben und ist ein im gesamten Organismus verbreiteter, intrazellulärer Botenstoff, der in viele physiologische Prozesse von der Modulation der Leitfähigkeit von Ionenkanäle über Zellwachstum und Apoptose bis hin zur Zellmobilität und -kontraktilität involviert ist (Ashman et al. 1963). Die Bildung von cGMP erfolgt durch zwei verschiedene Guanylatzyklen. Dabei wird die membranständige Guanylatzyklase (pGC) über natriuretische Peptide und die lösliche Guanylatzyklase (sGC) über NO aktiviert. cGMP ist damit der einzig bekannte Botenstoff, der von einem Gas aktiviert wird. Es existieren drei Typen von Effektormolekülen für cGMP, von denen jedoch nur der cGMP-abhängigen Proteinkinase (PKG) und den Phosphodiesterasen (PDE) im kardiovaskulären System eine wichtige Bedeutung zugeschrieben wird. Den dritten Typ stellen zyklische Nukleotid-gesteuerte Kationenkanäle (CNG) dar, welche im retinalen und olfaktorischen Neuroepithel sowie in Nephronen exprimiert werden.

In vielen Zellen werden sowohl die sGC und die pGC als auch verschiedene PDEs koexprimiert. Die Tatsache, dass die cGMP-Antwort abhängig davon ist, welche Guanylatzyklase für die cGMP-Generierung verantwortlich war, legt die Vermutung nahe, dass cGMP in der Zelle in Kompartimenten vorliegt. So ist cGMP, welches von der pGC gebildet wurde, unmittelbar an der Plasmamembran lokal verfügbar, wohingegen dies nicht für das globale, sGC-gebildete cGMP gilt (Castro et al. 2006). Diese intrazellulären cGMP-Pools werden zudem durch die unterschiedliche Lokalisation der PDEs gesteuert (siehe Abschnitt 1.6.4). Die Generierung, die Signaltransduktion und der Abbau von cGMP sind nachfolgend detaillierter beschrieben.

1.6.2 NO-Synthasen (NOS)

Für die Entdeckung von NO als Signalmolekül im Herzkreislaufsystem und damit auch des NO-cGMP-Signalweges wurden 1998 Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro und Ferid Murad mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin ausgezeichnet (Arnold et al. 1977, Katsuki et al. 1977, Ignarro et al. 1987). Die endogene Bildung von NO erfolgt durch NO-Synthasen (NOS), welche sich in drei Isoformen unterteilen lassen. Die neuronale NO-Synthase (nNOS) und die endotheliale NO-Synthase (eNOS) werden in einer Vielzahl von Geweben konstitutiv exprimiert und sind an der zellulären Signaltransduktion beteiligt. Ihre Aktivierung erfolgt in Abhängigkeit von Ca^{2+} und Calmodulin (CaM). Die Bildung der dritten Isoform wird Ca^{2+} /CaM-unabhängig im Rahmen einer Immunabwehr- bzw. Entzündungsreaktion induziert (iNOS) (Marletta 1994). L-Arginin stellt für alle Isoformen die alleinige Vorstufe von NO dar und wird durch Oxidation der Guanidinogruppe in Anwesenheit von NADPH und molekularem Sauerstoff in Citrullin und NO umgewandelt (Marletta 1993, Morris and Billiar 1994). Das gasförmige NO kann nicht gespeichert werden und diffundiert ungehindert über Zellmembranen. Dabei interagiert es unmittelbar vor allem mit Hämkomplexen verschiedener Proteine wie der sGC, des Hämoglobins oder des Cytochroms P450 (Davis et al. 2001). Aus diesem Grund sind unter physiologischen Konditionen die NO-Konzentrationen sehr gering ($< 1\mu\text{M}$) (Krumenacker et al. 2004). In Abbildung 5 ist eine schematische Übersicht des NO/cGMP-Signalweges dargestellt (Derbyshire and Marletta 2012).

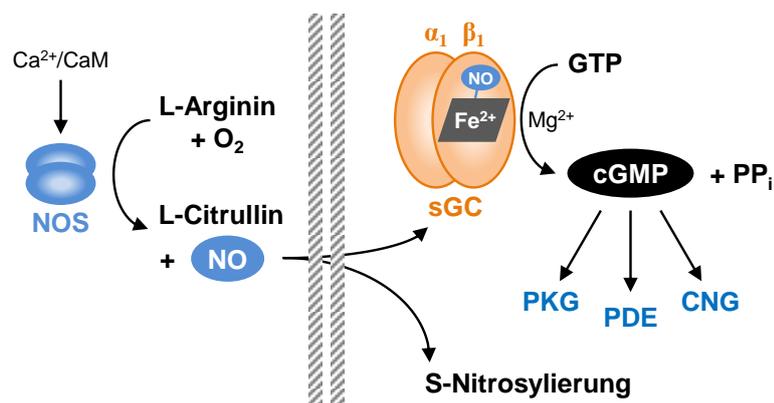


Abbildung 5: Schematische Darstellung des NO/cGMP-Signalweges

Die NO-Synthase (NOS) katalysiert die Reaktion von L-Arginin und O_2 in L-Citrullin und NO. Das gasförmige NO diffundiert in benachbarte Zellen und aktiviert die lösliche Guanylatzyklase (sGC), welche die Bildung von cGMP fördert. PDE, PKG und CNG-Kanäle stellen Effektormoleküle von cGMP dar (modifiziert nach Derbyshire et al. 2012). *CaM*: Calmodulin, *cGMP*: zyklisches Guanosin 3',5'-monophosphat, *CNG*: zyklischer Nukleotid-gesteuerter Kationenkanal, *GTP*: Guanosin triphosphat, *NO*: Stickstoffmonoxid, *NOS*: NO-Synthase, *PDE*: Phosphodiesterase, *PKG*: cGMP-abhängige Proteinkinase, *PP_i*: anorganisches Diphosphat.

Wie bereits in Abschnitt 1.5.1 beschrieben sind die NOS an den kardioprotektiven Signalwegen der Konditionierung beteiligt. So konnte gezeigt werden, dass sowohl eine

unselektive NOS-Inhibierung mit N^ω-Nitro-L-Arginin (L-NA) als auch eine für iNOS selektive Hemmung mit Aminoguanidin die kardioprotektiven Effekte einer verzögerten Präkonditionierung aufhebt (Takano et al. 1998). Eine Überexpression der eNOS wird vor allem mit einer verbesserten Herzfunktion und einer reduzierten Hypertrophie nach akutem Myokardinfarkt in Verbindung gebracht (Janssens et al. 2004). Eine globale Deletion der eNOS in Mäusen führt im Gegenzug zu einer milden arteriellen Hypertonie sowie zu kardialer Dysfunktion und verstärkten Remodeling-Prozessen post-MI (Huang et al. 1995, Shesely et al. 1996, Scherrer-Crosbie et al. 2001). Die Ausbildung einer Hypertonie kann auch bei Gabe des NOS-Inhibitors N^ω-Nitro-L-Arginin-Methylesterhydrochlorid (L-NAME), welcher auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, beobachtet werden (Obst et al. 2006, Groneberg et al. 2010).

1.6.3 Guanylatzyklasen

1.6.3.1 Lösliche Guanylatzyklasen (sGC)

Die NO-sensitive GC formiert sich als Heterodimer aus einer α - und einer β -Untereinheit. Bislang sind jeweils zwei Isoformen der Untereinheiten (α_1 , α_2 , β_1 , β_2) bekannt, wobei über die Funktion und Expression der β_2 -Untereinheit bislang nur wenig beschrieben ist (Yuen et al. 1990, Mergia et al. 2003). Dabei besitzen die α -Untereinheiten eine fast 50%ige Homologie in ihrer Gensequenz, die β -Untereinheiten weisen 41 % Homologie auf. Das Heterodimer $\alpha_1\beta_1$ (sGC-1) wird ubiquitär in fast allen Geweben exprimiert und ist für einen Großteil der NO-induzierten cGMP-Bildung verantwortlich (Budworth et al. 1999, Mergia et al. 2003). Die Lokalisation der $\alpha_2\beta_1$ -Isoform (sGC-2) ist dagegen begrenzter. Sie weist die höchsten Expressionslevel im Gehirn auf, wo sie zu gleichen Anteilen wie das $\alpha_1\beta_1$ -Heterodimer nachweisbar ist (Mergia et al. 2003). Die physiologische Bedeutung zwei gleich regulierter NO-GCs konnte bislang noch nicht abschließend entschlüsselt werden. Mittlerweile konnte aber gezeigt werden, dass die sGC nicht wie ursprünglich gedacht nur im Zytosol lokalisiert ist. In Rattenherzen konnte ca. 1/5 der sGC-1 in der Membranfraktion nachgewiesen werden (Zabel et al. 2002).

Jede Untereinheit der sGC besteht dabei aus der N-terminalen sog. „H-NOX“-Domäne, zwei zentralen Domänen für die Dimerisierung und der katalytischen Domäne am C-Terminus. Proteine der H-NOX-Familie (*heme-nitric oxide oxygen binding family*) sind durch ihre Häm-bindende Eigenschaft charakterisiert (Boon and Marletta 2005). Die β_1 -Untereinheit besitzt zudem die prosthetische Hämgruppe, welche das NO über Histidin₁₀₅ binden kann und somit durch eine Konformationsänderung die Umsetzung von Guanosintriphosphat (GTP) zu cGMP an der C-terminalen, hochkonservierten

katalytischen Domäne begünstigt (Abbildung 5, (Ignarro et al. 1982, Wedel et al. 1994, Zhao et al. 1998, Koesling 1999)). Die zentralen Domänen bestehen aus einer PAS-Domäne (benannt nach den Proteinen *period circadian protein*, *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein* und *single-minded protein*) und einer weiteren Helixregion, die für die Dimerisierung der beiden Untereinheiten von Bedeutung sind (Kelley et al. 2000, Shiga and Suzuki 2005).

Unter oxidativem Stress verschiebt sich das Redoxgleichgewicht der Hämgruppe von der reduzierten Form (Fe^{2+}) zur oxidierten Form (Fe^{3+}). Dies geht mit einem Verlust des Häms einher, weshalb eine Bindung von NO nicht mehr möglich ist (Stasch et al. 2006, Roy et al. 2008, Zhou et al. 2008).

Um die Funktion der löslichen Guanylatzyklase zu untersuchen, wurde eine Reihe von Knockout (KO)-Mäusen generiert. Die Ausschaltung der β_1 -Untereinheit durch Deletion des Exons 10 führte dabei zu einem vollständigen Verlust der sGC. Die Bedeutung der sGC für den Organismus zeigte sich hier deutlich, da 60 % der homozygoten KO-Tiere innerhalb von zwei Tagen verstarben. Mäuse, die die ersten drei Tage überlebten, verstarben im Alter von 3-5 Wochen. Ursache hierfür waren gastrointestinale Komplikationen vor allem das Auftreten von Dysmotilität und damit verbundenen langen Passagezeiten, Obstipation und Perforationen des Gastrointestinaltraktes, die erst durch eine Ballaststoff-freie Spezialdiät behoben werden konnten. Im kardiovaskulären System ist die sGC für die Relaxation der glatten Muskulatur eine wichtige Komponente. Die komplette Deletion der sGC führte zu einem systolischen Blutdruckanstieg von fast 30 mmHg. (Friebe et al. 2007, Groneberg et al. 2010)

Im Gegensatz hierzu zeigten Tiere mit einer Deletion der α_1 - oder α_2 -Isoform keine Veränderungen in der Lebenserwartung. Interessanterweise führte eine Deletion der α_1 -Isoform, in welcher 90 % der sGC fehlen, nur zu einer Erhöhung des systolischen Blutdrucks um 7 mmHg (Mergia et al. 2006). Obwohl die sGC-1 auch im Herzen die dominante Form ist, zeigte ihre Ausschaltung keine Auswirkungen auf die Infarktgröße nach akutem Myokardinfarkt mit vorgeschalteter iPre (Sips et al. 2011). Dafür konnte durch die Ausschaltung ein positiv inotroper und lusitroper Effekt auf die basale Herzfunktion beobachtet werden, der einen modulatorischen Einfluss der sGC-1 auf die Myokardfunktion vermuten lässt (Buys et al. 2008, Sips et al. 2011). Es konnte keine Hochregulation der verbleibenden Isoform beobachtet werden, umso bemerkenswerter ist es, dass diese Tiere auch mit einem minimalen Prozentsatz der verbleibenden sGC-Isoform überleben können (Mergia et al. 2006).

1.6.3.2 Membranständige Guanylatzyklen (pGC)

Die membranständigen oder partikulären Guanylatzyklen (pGC) sind im Gegensatz zu den sGCs NO-unabhängig und damit nicht in den NO/cGMP/PKG-Signalweg involviert. Es konnten bisher sieben Isoformen der pGC (GC-A bis -G) identifiziert werden, welche als Homodimere vorliegen. Der Aufbau der unterschiedlichen pGCs ist hochkonserviert und beinhaltet eine extrazelluläre Bindungsdomäne am N-Terminus, einen kurzen Transmembranteil und eine intrazelluläre katalytische Domäne am C-Terminus, die für die Umwandlung von GTP in cGMP verantwortlich ist. Die GC-A vermittelt dabei die endokrinen Effekte der atrialen und B-Typ natriuretischen Peptide (ANP und BNP) wie die Regulation des Blutdrucks und der Homöostase, sowie antihypertrophe und antifibrotische Effekte im Herzen. Die GC-B stellt den Rezeptor für das C-Typ natriuretische Peptid (CNP) dar. CNP/GC-B spielen neben antihypertropen Effekten eine wichtige Rolle bei vaskulären Regenerierungsprozessen und der enchondralen Ossifikation. Des Weiteren sind die Liganden der GC-C, Guanylin und Uroguanylin, bekannt. (Garbers and Lowe 1994, Denninger and Marletta 1999, Kuhn 2003, Rosenkranz et al. 2003)

ANP und BNP werden hauptsächlich in Atrium und Ventrikel produziert (de Bold et al. 2001). Es existiert eine Vielzahl von Studien, die eine Deletion der GC-A im Tiermodell in Zusammenhang mit schwerer Hypertonie und kardialer Hypertrophie beschreiben (Lopez et al. 1995, Oliver et al. 1997, Holtwick et al. 2003, Skryabin et al. 2004). In den letzten Jahren rückte zudem die Rolle der natriuretischen Peptide bei Myokardinfarkt bei verschiedenen Arbeitsgruppen in den Fokus. Die Administration von ANP und BNP führte sowohl in Ratten- als auch Kaninchenherzen unter Einbeziehung des ATP-abhängigen Kaliumkanals (K_{ATP} -Kanal) zu einer Reduktion der Infarktgröße (Yang et al. 2006, Burley and Baxter 2007, Ren et al. 2007). Für CNP, welches hauptsächlich vom Endothelium gebildet wird, konnte ebenso ein positiver Einfluss auf den I/R-Schaden sowie auf kardiale Umbauprozesse nach Myokardinfarkt nachgewiesen werden (Hobbs et al. 2004, Soeki et al. 2005).

1.6.4 Phosphodiesterasen (PDE)

Phosphodiesterasen (PDEs) dienen der Hydrolyse der zyklischen Moleküle cGMP und cAMP (zyklisches Adenosin 3',5'-monophosphat) zu den inaktiven Produkten Guanosin-5'-monophosphat (5'-GMP) und Adenosin-5'-monophosphat (5'-AMP) (Soderling et al. 1998b).

In Säugetieren sind bisher elf verschiedene Familien von Isoenzymen (PDE1-PDE11) identifiziert. Diese unterscheiden sich besonders in ihrer Spezifität und Affinität für cGMP

und cAMP. Die PDEs 5, 6 und 9 sind dabei hoch spezifisch für cGMP, die PDEs 4, 7 und 8 weisen eine hohe Präferenz für cAMP auf. Die restlichen fünf PDEs hydrolysieren sowohl cGMP als auch cAMP, jedoch mit unterschiedlicher Aktivität und Affinität für die zyklischen Nukleotide. Aufgrund vieler Subfamilien und Splicevarianten besteht eine große Variation bezüglich der Distribution im Organismus und in verschiedenen Spezies. (Bender and Beavo 2006, Conti and Beavo 2007, Kass et al. 2007)

Der regulatorische N-Terminus charakterisiert dabei die jeweilige PDE-Familie, während die katalytische Domäne eine größtenteils konservierte Struktur darstellt (Keravis and Lugnier 2012). Eine Besonderheit stellt die sog. GAF-Domäne (*cGMP-specific phosphodiesterases, adenyl cyclases and Eh1A*) dar, welche in den PDEs 2, 5, 6, 10 und 11 identifiziert wurde. GAF-Domänen ermöglichen die allosterische Bindung von cGMP, welches dadurch als Modulator bzw. Aktivator der PDE fungieren kann und über einen Rückkopplungsmechanismus seinen eigenen Abbau bzw. die Hydrolyse von cAMP regulieren kann (Martinez et al. 2002, Kass et al. 2007).

Im Herzen konnte die Expression der PDEs 1 und 2 (Loughney et al. 1996), 3 (Meacci et al. 1992), 4 (Kostic et al. 1997), 5 (Senzaki et al. 2001), 8 (Soderling et al. 1998a) und 9 (Onody et al. 2003) nachgewiesen werden, wobei die Lokalisation der PDE5 in adulten Kardiomyozyten umstritten ist (Lukowski et al. 2014). Dabei scheinen sich jedoch neben den Affinitätsunterschieden auch Unterschiede im Expressionsmuster zu ergeben. Während die PDE1A vor allem in Myofibroblasten eine wichtige Rolle spielt, weist die PDE1C hohe Expressionslevel in Kardiomyozyten auf (Lukowski et al. 2014). Die PDEs 1A und B zeigen eine leicht erhöhte Affinität für cGMP, die PDE1C für cAMP (Keravis and Lugnier 2012). Gemeinsam ist allen PDE1-Isoformen die Ca^{2+} -abhängige Regulation über eine Bindungsstelle für Calmodulin (Sonnenburg et al. 1995). Die PDEs 2 und 3 sind sowohl in Kardiomyozyten als auch in kardialen Endothelzellen lokalisiert (Zaccolo and Movsesian 2007, Lukowski et al. 2014). Eine Regulation der PDE2 kann über cGMP-Bindung an die GAF-Domäne erfolgen, was in einer Aktivitätssteigerung und damit in einer erhöhten Hydrolyse von cAMP resultiert (Kass et al. 2007). PDE3 bindet ebenso cGMP und cAMP. Dabei erfolgt die Umsetzung von cAMP um den Faktor 10 schneller als die von cGMP, wodurch cGMP als kompetitiver Inhibitor fungieren kann (Degerman et al. 1997).

Erste Studien wiesen nur sehr geringe Expressionslevel der PDE5 im Herzen auf, weshalb für sie nur eine untergeordnete Rolle für die physiologische Herzfunktion postuliert wurde (Loughney et al. 1998, Wallis et al. 1999). Dabei stellt die PDE5 das wichtigste Arzneistofftarget unter den PDEs dar. Der Einsatz von PDE5-Inhibitoren bei kardiovaskulären Erkrankungen wird in Abschnitt 1.6.7 ausführlicher diskutiert. Die genaue Lokalisation der PDE5 im Herzen, insbesondere ob eine Expression in

Kardiomyozyten stattfindet, ist noch nicht abschließend geklärt, da einige Studien, die eine Kardiomyozytenlokalisation postulieren, in Gesamtherzlysaten durchgeführt wurden bzw. die Effekte von PDE5-Inhibitoren auch auf die Hemmung anderer PDEs zurückzuführen sein könnten (Kass et al. 2007, Lukowski et al. 2010). Die Aktivität der PDE5 kann über eine PKG-abhängige Phosphorylierung am Serin₁₀₂ moduliert werden, welche die Bindung von cGMP an die GAF-Domäne erhöht. Dies führt im Sinne einer negativen Rückkopplung zu einer erhöhten Hydrolyse von cGMP und damit zu einer Reduktion der intrazellulären cGMP-Konzentration (Mullershausen et al. 2004).

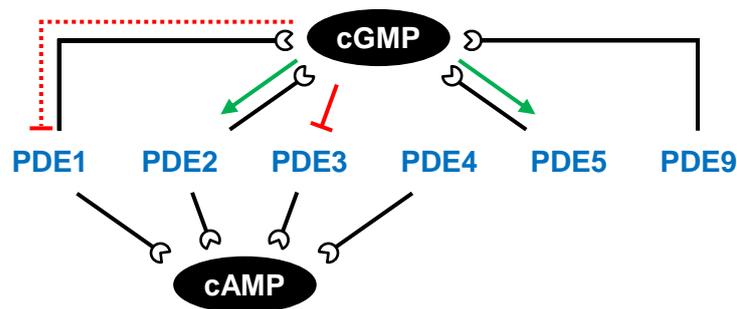


Abbildung 6: Regulatorisches Netzwerk der PDEs im Herzen

Schematische Darstellung der wichtigsten kardialen Phosphodiesterasen (PDEs) und ihre Spezifität für die Hydrolyse von zyklischem Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) und/oder zyklischem Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP). Ebenfalls dargestellt sind regulatorische Einflüsse von cGMP auf die Aktivität der PDEs (modifiziert nach Zaccolo and Movsesian 2007).

Das regulatorische Netzwerk der wichtigsten kardialen PDEs ist in Abbildung 6 nochmals verdeutlicht. Die intrazelluläre räumliche Verteilung der PDE-Isoformen an bestimmte Strukturelemente und die daraus entstehenden Mikrodomänen, unterstützen die Theorie, dass die zyklischen Nukleotide im Kardiomyozyten in unterschiedliche Pools separiert sind (Fischmeister et al. 2006). Dabei dient der Crosstalk zwischen den PDEs zur Feinregulation der intrazellulären Konzentration von cGMP und cAMP (Lincoln et al. 1995).

1.6.5 cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I (PKG I)

Die PKG (auch: cGK) zählt zur Gruppe der Serin/Threonin-Kinasen. In Säugetieren sind 2 Gene, *prkg1* und *prkg2*, bekannt, welche für die PKG I α und β sowie für die PKG II kodieren (Sandberg et al. 1989, Wernet et al. 1989, Orstavik et al. 1997). Eine hohe Expression der PKG I ist dabei in Glattmuskelzellen, Thrombozyten, im Gehirn und in der Niere zu finden (Keilbach et al. 1992, Feil et al. 2005). Im Herzmuskel ist vor allem die α -Isoform der PKG I präsent (Geiselhoring et al. 2004). Die PKG II ist in vielen Geweben

parallel zu den PKG I-Isoformen exprimiert, vermittelt jedoch andere Funktionen (Gamm et al. 1995). Sie ist dabei häufig im Endothel lokalisiert und an sekretorischen Prozessen wie die Wasser- und Chloridsekretion im Darm (French et al. 1995), sowie die Renin- und Aldosteronfreisetzung in der Niere (Wagner et al. 1998, Spiessberger et al. 2009) beteiligt. Des Weiteren ist eine Expression der PKG II in vielen Gehirnregionen, in Chondrozyten, der Lunge und der Prostata nachweisbar (el-Husseini et al. 1995, Lohmann et al. 1997). Die beiden Kinasen unterscheiden sich dabei auch in ihrer Lokalisation in der Zelle. Während die löslichen Isoformen PKG I α und β im Zytosol lokalisiert sind, führt die Myristoylierung des Aminoterminus der PKG II zu einer Verankerung an der Plasmamembran (Vaandrager et al. 1996). Die PKG besteht aus drei funktionellen Einheiten, einer katalytischen, einer regulatorischen und der NH₂-terminalen Domäne. Die regulatorische Domäne besitzt zwei Bindungsstellen für cGMP mit unterschiedlichen Affinitäten. Werden diese beide besetzt, finden eine Autophosphorylierung des Aminoterminus und damit eine Änderung in der Sekundärstruktur statt (Doskeland et al. 1983, Landgraf et al. 1990). Dies führt zu einer Aufhebung der Inhibierung der katalytischen Domäne durch die N-terminale Pseudosubstratbindungsstelle (Huggins et al. 1991). Die katalytische Domäne enthält eine Bindungsstelle für Mg²⁺/ATP, sowie die Bindungstasche, in welcher der Phosphatrest des ATPs auf ein Serin oder Threonin des Substrates übertragen wird (Pfeifer et al. 1999). Der N-Terminus besitzt noch zwei weitere Funktionen. Er enthält ein Leucizipper-Motiv, welches zum einen die PKGs als Homodimere zusammenhält (Hofmann et al. 1992) und dessen Länge zum anderen für die subzelluläre Lokalisation der PKGs verantwortlich ist.

Für die Aktivierung der PKG I reichen cGMP-Spiegel im submikromolaren Bereich aus, wobei die PKG I α um den Faktor 10 sensitiver für cGMP ist als die β -Isoform (Ruth et al. 1991).

1.6.6 Zielproteine der PKG I im kardiovaskulären System

Für die Charakterisierung der Zielproteine der PKG I stehen eine Reihe genetisch veränderter Mausmutanten zur Verfügung. Es zeigte sich, dass eine globale Deletion der PKG I zu einer massiv verkürzten Lebenserwartung führt und dies vor allem auf schwerwiegende vaskuläre und intestinale Defekte zurückzuführen ist (Pfeifer et al. 1998). Es sind über zehn Substrate identifiziert, die *in vivo* von der PKG I phosphoryliert werden (Hofmann et al. 2006). Die PKG I spielt dabei eine wichtige Rolle im kardiovaskulären System. In vaskulären Glattmuskelzellen stellen das Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptor assoziierte cGMP-Kinasesubstrat (IRAG) (Schlossmann et al. 2000) und der BK-Kanal

(Sausbier et al. 2000) Targets für die Modulation des extrazellulären Ca^{2+} -Einstroms und der intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung dar. Zudem konnten Phospholamban (Koller et al. 2003), RhoA (*Ras homolog gene family member A*) (Somlyo and Somlyo 2000) und die Zieluntereinheit MYPT1 (*myosin phosphatase target subunit 1*) der Myosin-Leichtkettenphosphatase (Surks et al. 1999) als weitere Substrate der PKG identifiziert werden. Eine Phosphorylierung dieser Targets führt zu verringerten zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen und damit zur Vasorelaxation. Dies korreliert mit der Hypertonie, welche in globalen PKG I-KO-Mäusen zu beobachten ist (Pfeifer et al. 1998). Neben der Vasorelaxation wird für die PKG I eine Funktion bei der Adhäsion, der Proliferation und dem Überleben von vaskulären Glattmuskelzellen postuliert (Zhang et al. 2007a). Doch konnte die These, dass die PKG I in pathophysiologische vaskuläre Umbauprozesse involviert ist, in gewebespezifischen Mausmutanten durch eine mittels Karotisligatur verursachten Restenose nicht bestätigt werden (Lukowski et al. 2008). Zudem ist gezeigt, dass die PKG I in Neovaskularisierungsprozesse involviert ist. Dabei war eine Ischämie-induzierte Angiogenese in Mausmutanten, die die PKG I α überexprimierten, signifikant erhöht und im Gegenzug in den PKG I-KO-Tieren reduziert (Yamahara et al. 2003).

Für die in den Kardiomyozyten (CM) lokalisierte PKG I sind eine Reihe von Zielstrukturen identifiziert, die der PKG I eine wichtige Bedeutung für die Erregungsleitung und Kontraktilität zuweisen (Hofmann and Wegener 2013). Es konnte sowohl in globalen als auch in CM-spezifischen Mausmutanten gezeigt werden, dass der NO/cGMP/PKG I-Signalweg negativ inotrope Effekte unabhängig von parasymphatischen Reizen vermittelt (Godecke et al. 2001, Wegener et al. 2002). Mechanistisch könnte dies auf eine Hemmung von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen zurückzuführen sein. Interessanterweise kann CNP einen positiven inotropen Effekt ausüben, welcher sich in Mäusen mit einer Überexpression der PKG I α noch ausgeprägter darstellt (Wollert et al. 2003). Scheinbar ist die PKG I α sowohl an NO-vermittelten, negativ inotropen Prozessen als auch an positiv inotropen Mechanismen über CNP beteiligt. Dies könnte eine Beteiligung nicht-kardiomyozytärer Zellen oder eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation des cGMPs (siehe Abschnitt 1.6.1) zur Ursache haben. Während Mäuse mit einer Deletion von ANP oder der GC-A eine Blutdruck-unabhängige Fibrosierung und Hypertrophie entwickeln (Oliver et al. 1997, Kishimoto et al. 2001, Holtwick et al. 2003), ist die Rolle der PKG I bei kardialer Herzhypertrophie noch umstritten. Doch konnte 2013 die Arbeitsgruppe von Michaela Kuhn zeigen, dass CM-spezifische PKG I α -Knockouttiere anfälliger für Druck- bzw. Angiotensin II-stimulierte pathologische Gewebeveränderungen sind, welche eine dilatative Kardiomyopathie auslösen (Frantz et al. 2013). Es wird postuliert, dass hierbei die reduzierte Phosphorylierung von Phospholamban und damit die verringerte

Aktivierung von SERCA, welches Ca^{2+} nach erfolgter Kontraktion wieder zurück in das sarkoplasmatische Retikulum pumpt, pathophysiologische Mechanismen begünstigt. Dieser Signalweg scheint auch bei der iPost sowie bei Gabe eines Schwefelwasserstoff-Donors beim akuten Myokardinfarkt aktiviert zu werden und Kardioprotektion zu vermitteln (Inserte et al. 2014, Bibli et al. 2015). Die Kardioprotektion durch iPost scheint dabei nicht durch die kardiomyozytäre PKG I vermittelt zu werden, jedoch aber die durch sGC-Aktivierung bzw. PDE5-Hemmung stimulierten protektiven Effekte auf den I/R-Schaden (Methner et al. 2013b).

1.6.7 Pharmakologische Modulation des NO/cGMP/PKG I-Signalweges bei I/R

Viele Erkenntnisse über den NO/cGMP/PKG I-Signalweg sprechen für seine Aktivierung und seinen kardioprotektiven Einfluss bei I/R. Aus diesem Grund wurde eine Vielzahl von pharmakologischen Substanzen untersucht, die Moleküle aus diesem Signalweg modulieren. Das wohl bekannteste, bereits seit 1998 auf dem deutschen Arzneimittelmarkt unter dem Namen Viagra erhältliche Pharmakon, stellt Sildenafil aus der Wirkstoffklasse der PDE5-Inhibitoren dar. Diese Arzneistoffe sind seit längerem für die Therapie der erektilen Dysfunktion im Einsatz, da die erhöhten cGMP-Spiegel zu einer besseren Durchblutung des *Corpus cavernosum penis* führen. Des Weiteren rücken sie bei der Therapie der pulmonalen Hypertonie, insbesondere in Kombination mit Angiotensin II-Rezeptorantagonisten, in den Fokus (Galie et al. 2016). Für Sildenafil (SIL) und den Weiterentwicklungen Tadalafil (TAD) und Vardenafil, welche noch spezifischer die PDE5 hemmen, existiert eine Reihe überzeugender Studien, die eine Kardioprotektion während I/R im Tierversuch zeigen (Salloum et al. 2007, Das et al. 2009, Salloum et al. 2009, Koka et al. 2013, Methner et al. 2013b). In einer klinischen Studie mit 70 Postinfarkt-Patienten mit diastolischer Dysfunktion (SIDAMI-Studie) konnte allerdings kein Benefit durch eine Sildenafil-Behandlung (3x40 mg pro Tag) festgestellt werden (Andersen et al. 2013). Milrinon, ein PDE3-Inhibitor, zeigte einen Zusatznutzen bei der kurzfristigen Therapie der Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt (Karlsberg et al. 1996, Zewail et al. 2003). Es ist jedoch keine Reduktion des I/R-Schadens und damit keine direkte Beeinflussung der Infarktgröße beschrieben. Mit 8-Bromo-cGMP, einem zellpermeablen cGMP-Analogon, steht eine Substanz zur Verfügung, mit der bereits im Tiermodell eine Reduktion der Infarktgröße erreicht werden konnte (D'Souza et al. 2003, Giricz et al. 2009).

NO/sGC stellen weitere Komponenten der Signalkaskade und damit potentielle Angriffspunkte für die Therapie des akuten Myokardinfarkts dar. Gefäßerweiternde NO-Donatoren wie die Arzneistoffe Molsidormin und Isosorbidmononitrat finden ihren Einsatz bei pektangiösen Beschwerden. Bei einigen kardiovaskulären Erkrankungen wie der Hypertonie oder der koronaren Herzkrankheit (KHK) erzielen die NO-Donatoren nicht die gewünschte Wirksamkeit bzw. es entwickelt sich nach mehrjähriger Anwendung ein Gewöhnungseffekt, die sog. „Nitrattoleranz“ (Chirkov and Horowitz 2007). Ein weiterer Nachteil dieser Arzneistoffe sind die vielen Nebeneffekte von NO wie beispielsweise S-Nitrosylierungen (Handy and Loscalzo 2006), DNA-Schäden (Burney et al. 1999) oder Interaktionen mit Cytochrom C-Oxidasen (Erusalimsky and Moncada 2007). Für Nitroglycerin konnte im akuten Myokardinfarktmodell mit 30 min Ischämie, gefolgt von drei Stunden Reperfusion bei einer kontinuierlichen Infusion für 65 min, beginnend fünf Minuten vor Ende der Ischämie keine Protektion festgestellt werden (Salloum et al. 2007). In einer 2015 veröffentlichten Phase II-Studie führte die intrakoronare Applikation von Natriumnitrit unmittelbar vor der Ballondilatation ebenfalls zu keiner Reduktion der Infarktgröße (Jones et al. 2015).

In den letzten Jahren sind Arzneistoffe, die die sGC modulieren, in den Fokus gerückt und ihre Entdeckung und Entwicklung wurde 2015 mit dem deutschen Zukunftspreis ausgezeichnet. Hier muss zwischen zwei Gruppen differenziert werden. Die Stimulatoren können sowohl NO-unabhängig als auch synergistisch mit NO die sGC stimulieren. Als Voraussetzung besteht hier jedoch die Präsenz der reduzierten Hämgruppe (Friebe et al. 1996). Der sGC-Stimulator Riociguat (BAY 63-2521) stellt den ersten Vertreter der neuen Wirkstoffklasse dar, welcher für die Therapie der chronisch-thromboembolischen pulmonalen Hypertonie (CTEPH) und der pulmonal-arteriellen Hypertonie (PAH) zugelassen ist (Ghofrani et al. 2013a, Ghofrani et al. 2013b). Dessen Weiterentwicklung Vericiguat (BAY 1021189) befindet sich derzeit in einer ersten Phase III-Studie (VICTORIA-Studie), in welcher seine Wirksamkeit an ca. 5000 Herzinsuffizienzpatienten mit reduzierter Auswurfraction untersucht wird. Im Gegensatz hierzu agieren die sGC-Aktivatoren unabhängig von NO und der Hämgruppe (Stasch et al. 2006). Die bekanntesten Vertreter sind hierbei Cinaciguat (BAY 58-2667) und Ataciguat (HMR-1766), deren Effektivität in Studien zur akuten, dekompensierten Herzinsuffizienz (Hingorany and Frishman 2011) und zur Behandlung einer durch Kalzifikation erworbenen Aortenklappenstenose (ClinicalTrials.gov-ID-Nummer: NCT02049203) untersucht werden. Die positiven Effekte auf die Herzfunktion und auf die kardialen Umbauprozesse von Ataciguat bei Langzeitgabe, welche an Tag 10 post-MI begonnen wurde, konnten in Ratten bereits bestätigt werden (Fraccarollo et al. 2014). Sowohl der Einfluss von sGC-Stimulatoren als auch -Aktivatoren auf den akuten I/R-Schaden wurde bereits *in vivo*

und *ex vivo* im Tiermodell untersucht. Interessanterweise können beide Substanzklassen das Herz vor einem akut auftretenden Schaden schützen und die Infarktgröße reduzieren (Ockaili et al. 2008, Salloum et al. 2012, Methner et al. 2013b, Bice et al. 2014). Für Riociguat konnte zudem eine verbesserte Prognose der Herzfunktion 28 Tage nach erzeugtem Myokardinfarkt gezeigt werden (Methner et al. 2013a).

Zusammenfassend konnten bislang vor allem für die Inhibitoren der PDE5, sowie für die Modulatoren der sGC vielversprechende Therapieansätze zur Reduktion des I/R-Schadens im Tierversuch beobachtet werden, die erwünschten kardioprotektiven Effekte in Myokardinfarktpatienten blieben (bisher) allerdings aus.

1.7 Der BK-Kanal

1.7.1 Struktur und Lokalisation

Kaliumkanäle werden ubiquitär in praktisch allen Zellen des Organismus exprimiert und spielen eine wichtige Rolle in der Regulation des Membranpotentials. Anhand ihrer Struktur, Funktion und Aktivierbarkeit kann diese sehr heterogene Familie von Ionenkanälen in weitere Unterfamilien eingeteilt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wird speziell auf die Gruppe der Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanäle und dabei insbesondere auf den BK-Kanal eingegangen.

Die durch Ca^{2+} aktivierbaren Kaliumkanäle können aufgrund ihrer unterschiedlichen Leitfähigkeit in drei weitere Gruppen, in SK- (*small conductance K^+*), in IK- (*intermediate conductance K^+*) und in BK- (*big conductance K^+*) Kanäle, unterteilt werden. Der BK-Kanal (*auch* MaxiK, $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$, KCNMA1 und mSlo1) unterscheidet sich dabei durch seine hohe Leitfähigkeit von 100-300 pS von den SK- und IK-Kanal mit Leitfähigkeiten von 2-25 pS (Blatz and Magleby 1986, Stocker 2004) bzw. 20-80 pS (Marty and Neher 1985, Lang and Ritchie 1990). Ein weiteres wichtiges Merkmal des BK-Kanals ist die Eigenschaft, dass er im Gegensatz zu den beiden anderen Kanälen auch spannungsgesteuert aktiviert werden kann (Barrett et al. 1982).

Strukturell besteht der BK-Kanal aus vier porenformenden α -Untereinheiten, die ein Tetramer ausbilden, sowie aus regulatorischen β - und γ -Untereinheiten. Die α -Untereinheiten werden von einem Gen *Kcnma1* kodiert und unterscheiden sich einzig durch die Ausbildung verschiedener Spleißvarianten (Adelman et al. 1992, Chen et al. 2005). Eine Regulation des STREX (*stress axis regulated exon*)-Spleißens moduliert

beispielsweise die Sensitivität für Ca^{2+} - und Spannung, die Kanalaktivität und die Aktivierbarkeit des Kanals durch die Proteinkinase A (PKA) (Zhou et al. 2012).

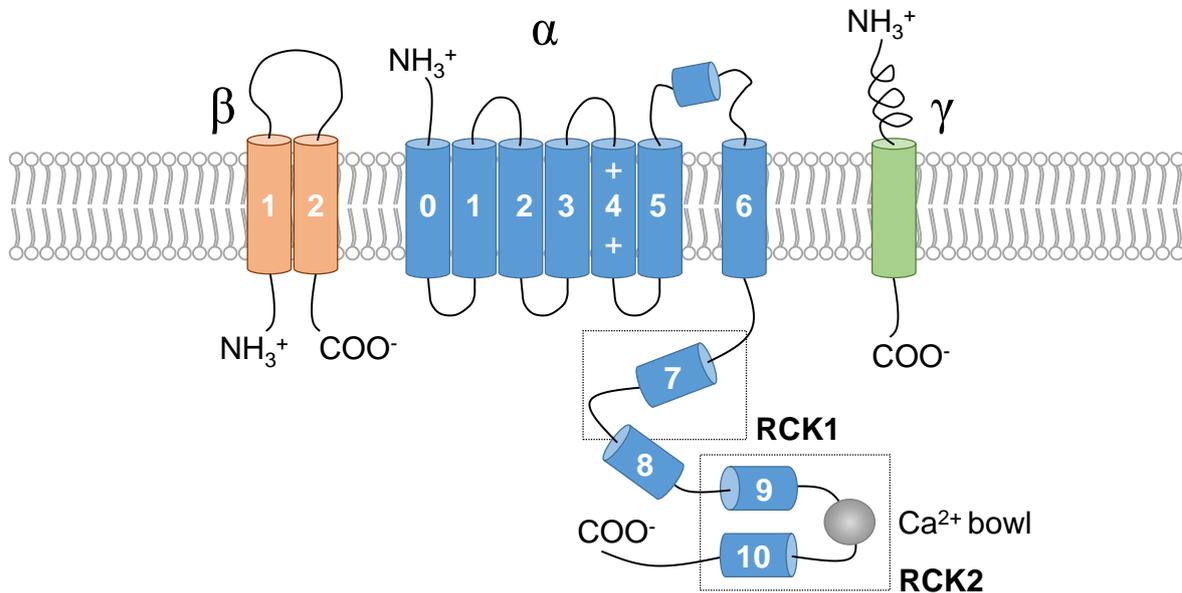


Abbildung 7: Modelldarstellung der α -, β - und γ -Untereinheiten des BK-Kanals

Die α -Untereinheit besteht aus sieben transmembranären Domänen (S0-S6), die den Spannungssensor (S4) und die Kanalpore zwischen S5 und S6 beinhalten, sowie aus einem ca. 800 Aminosäuren langen C-Terminus mit vier hydrophoben Segmenten (S7-S10) und zwei RCK (*regulator of conductance for K^+*)-Domänen. Sowohl die RCK1-Domäne als auch die sog. Ca^{2+} bowl in der RCK2-Domäne beinhalten aktivitätsbeeinflussende Sensoren für Ca^{2+} . Die akzessorischen β - und γ -Untereinheiten üben Einflüsse auf die Lokalisation und die Ca^{2+} -unabhängige Aktivierbarkeit des BK-Kanals aus.

Jede α -Untereinheit gliedert sich wie in Abbildung 7 dargestellt in einen extrazellulären N-Terminus, gefolgt von sieben Transmembrandomänen (S0-S6), sowie einem ca. 800 Aminosäuren langen, ins Zytoplasma ragenden C-Terminus, der vier weitere hydrophobe Abschnitte (S7-S10) enthält (Meera et al. 1997). Zwischen den Segmenten S5 und S6 ist die für K^+ durchlässige Pore ausgebildet. Der Spannungssensor in Segment 4 stellt ein unter spannungsabhängigen Kaliumkanälen (K_v) konserviertes Motiv dar (Diaz et al. 1998). Im Gegensatz dazu unterscheidet sich der BK-Kanal von den anderen K_v -Kanälen durch ein siebtes Segment (S0), welches den N-Terminus auf die extrazelluläre Seite verlagert. Der C-Terminus beinhaltet zwei hochaffine Bindungsstellen für Ca^{2+} . Eine davon ist in der RCK1 (*regulator of conductance for K^+*)-Domäne lokalisiert, welche als ein Regulator der Ca^{2+} -Leitfähigkeit fungiert und somit entscheidend die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals beeinflusst (Jiang et al. 2001, Xia et al. 2002, Lingle 2007). Die zweite befindet sich in einer aspartatreichen Region, der sog. „ Ca^{2+} bowl“ (Schreiber and Salkoff 1997). Neben Ca^{2+} existiert in der RCK1-Domäne zudem eine Bindungsstelle für Magnesium (Mg^{2+}), welches Ca^{2+} -unabhängig, vermutlich aber durch Interaktion mit

dem Spannungssensor, den BK-Kanal aktiviert (Shi et al. 2002, Yang et al. 2007, Yang et al. 2008). Hinzu kommen Sequenzbereiche, die Effekte durch pH-Wertänderungen (Hou et al. 2008b), Kohlenstoffmonoxid (Hou et al. 2008a), freie Hämgruppen (Tang et al. 2003), ROS (Tang et al. 2004), sowie durch Phosphorylierung mittels den Kinasen PKA, PKC und PKG (Schubert and Nelson 2001, Zhou et al. 2001, Tian et al. 2004) vermitteln.

Zusätzlich zu den intrazellulären Liganden werden die Lokalisation und Funktion des BK-Kanals von akzessorischen β - und γ -Untereinheiten beeinflusst (Abbildung 7). Es sind vier unterschiedliche β -Untereinheiten (β_{1-4}) bekannt, die einen gemeinsamen Aufbau von zwei transmembranären Domänen und intrazellulären N- und C-Termini besitzen (Knaus et al. 1994). Erst 2012 wurden die γ -Untereinheiten (γ_{1-4}) identifiziert, welche im strukturellen Aufbau eine leucinreiche LRR (*leucine-rich repeats*)-Sequenz vereint. Neben einer Beeinflussung der Lokalisation des BK-Kanals, führen sie zu einer Ca^{2+} -unabhängigen Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierungskurve in negativer Richtung (Yan and Aldrich 2012).

Der BK-Kanal ist in fast allen Zelltypen an der Plasmamembran lokalisiert (Wellman and Nelson 2003). Eine Ausnahme bilden hier neben Gliomzellen und Astrozyten die Kardiomyozyten, in welchen der BK-Kanal ausschließlich in der inneren Mitochondrienmembran (IMM) nachgewiesen werden konnte (Xu et al. 2002, Douglas et al. 2006, Singh et al. 2013, Soltysinska et al. 2014). Mittlerweile konnten noch weitere intrazelluläre BK-Kanäle im Nukleus, ER und Golgiapparat identifiziert werden, deren Funktion aber weitgehend unbekannt ist (Singh et al. 2012).

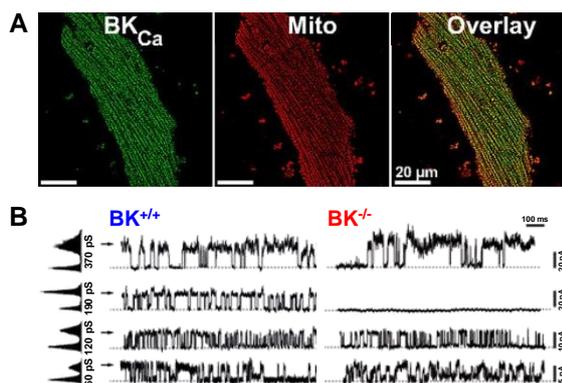


Abbildung 8: Mitochondriale Lokalisation des BK-Kanals

(A) Lokalisation des BK-Kanals (BK_{Ca}) in Mitochondrien durch Kofärbung von ventrikulären Kardiomyozyten mit Mitotracker und anti-BK-Antikörper (Singh et al. 2013). (B) Kardiomyozytäre Mitoblasten von BK-Wildtypieren ($\text{BK}^{+/+}$) zeigten bei +80 mV vier Leitfähigkeiten mit unterschiedlichen Frequenzen (linke Spuren). Die Leitfähigkeit bei 190 pS war hingegen in den Mitoblasten globaler BK-Knockouts ($\text{BK}^{-/-}$) nicht messbar (rechte Spuren). (Soltysinska et al. 2014)

Die mitochondriale Lokalisation des BK-Kanals in den Kardiomyozyten, im Folgenden als mitoBK bezeichnet, ist in Abbildung 8A dargestellt. Sie wird bedingt durch ein 50 Aminosäuren langes Spleißexon (DEC) am C-Terminus (Singh et al. 2013). Die gleiche Arbeitsgruppe konnte in einer erst kürzlich veröffentlichten Studie zeigen, dass eine Interaktion zwischen dem mitoBK und TOM22, einem Bestandteil des

Translokasekomplexes, der Proteine über die äußere Mitochondrienmembran transloziert, auftritt (Zhang et al. 2016). Dies führte sie zu der Vermutung, dass der mitoBK über den TOM (*translocase of the outer membrane*)-Komplex in den mitochondrialen Intermembranraum gelangt.

Eine weitere Bestätigung der mitochondrialen Expression des BK-Kanals, konnte durch elektrophysiologische Messungen in kardiomyozytären Mitoblasten gezeigt werden. Hier wiesen BK-Wildtypiere (BK-WT) vier Leitfähigkeiten mit unterschiedlichen Frequenzen auf, wobei die Leitfähigkeit bei 190 pS in globalen BK-KOs nicht messbar war (Abbildung 8B). Diese Leitfähigkeit zeigte sich zudem in BK-WT sensitiv für die Zugabe eines BK-Kanalöffners und -blockers. (Soltysinska et al. 2014)

In den Mitochondrien von ventrikulären Myozyten wurden neben den α -Untereinheiten, vor allem β_1 -Untereinheiten identifiziert (Ohya et al. 2005). Bislang ist noch ungeklärt, ob in den Mitochondrien zudem auch γ -Untereinheiten existieren. In der Cochlea konnte mittels Proteomik gezeigt werden, dass 20 % der Proteine, die mit dem BK-Kanal interagieren, mit Mitochondrien assoziiert sind (Kathiresan et al. 2009). Interessanterweise findet eine direkte Interaktion zwischen der β_1 -Untereinheit des mitoBKs und der Cytochrom C-Oxidase, einer Komponente der Atmungskette, statt (Ohya et al. 2005). Neben den Kardiomyozyten konnte eine Expression von BK-Kanälen auch in humanen Fibroblasten (Wang et al. 2006) und kardialen Neuronen (Wojtovich et al. 2013) sowie in Glattmuskelzellen (Knaus et al. 1994) nachgewiesen werden. In diesen Zelltypen ist der BK-Kanal vermutlich ausschließlich in der Zellmembran lokalisiert.

1.7.2 Physiologische Bedeutung des BK-Kanals

Neben seiner vielseitigen Aktivierbarkeit unterliegt der BK-Kanal einer breitgefächerten Gewebeverteilung. So wird er in zahlreichen glattmuskulären Geweben wie in Gefäßen (McCobb et al. 1995), den Atemwegen (Savaria et al. 1992), der Harnblase (Herrera et al. 2000) und dem *Corpus cavernosum* (Werner et al. 2005) exprimiert. Eine Dysfunktion des BK-Kanals wird hierbei mit einer Reihe von Erkrankungen wie Hypertonie (Pluger et al. 2000, Sausbier et al. 2005), erektile Dysfunktion (Werner et al. 2008), sowie Reizblasensymptomatik und Inkontinenz (Meredith et al. 2004, Sprossmann et al. 2009) assoziiert. Neuronal spielt der BK-Kanal für die Erregbarkeit von Neuronen sowie für die Neurotransmitterausschüttung in synaptischen Endigungen eine wichtige Rolle (Sausbier et al. 2004, Wang 2008). Eine Deletion des BK-Kanals im Tiermodell zeigt sich in einer zerebralen Dysfunktion, welche sich in fehlender motorischer Koordination und lokomotorischen Störungen äußert. Des Weiteren können epileptische Anfälle (Du et al.

2005), Störungen im zirkadianen Rhythmus (Meredith et al. 2006) sowie abnormale Lidschlussreflexe aufgrund einer reduzierten Aktivität der zerebralen Purkinjezellen auftreten (Sausbier et al. 2004). BK-Knockouttiere wiesen nach der Okklusion der mittleren Zerebralarterie ein größeres Infarktareal, schwerwiegendere neuronale Defizite sowie eine erhöhte Mortalität auf (Liao et al. 2010). Eine Beteiligung der BK-Kanäle an hormonellen Sekretionsprozessen wurde beispielsweise für die Katecholaminausschüttung aus dem Nebennierenmark und die Aldosteronfreisetzung aus der Nebennierenrinde postuliert (Lingle et al. 1996, Nagayama et al. 1998, Sausbier et al. 2005). Im Ohr kann die Abwesenheit der BK-Kanäle, welche in den inneren Haarzellen der Cochlea lokalisiert sind, zu einem progressiven Hörverlust führen (Ruttiger et al. 2004). Zudem werden dem BK-Kanal Funktionen für die Filtration in der Niere (Pluznick et al. 2005), die K⁺-Sekretion im Kolon (Sausbier et al. 2006, Sorensen et al. 2008), die angeborene Immunität (Ahluwalia et al. 2004), die Migration von Tumorzellen (Edalat et al. 2016) und die Entstehung von Adipositas (Illison et al. 2016) zugeschrieben.

Im Herzen wird eine Beteiligung des BK-Kanals am Sinusrhythmus postuliert, da eine pharmakologische Inhibierung des Kanals mit einer reduzierten Herzfrequenz und einer verlangsamten Schrittmacherfunktion einhergeht (Imlach et al. 2010, Lai et al. 2014). Auf die Rolle des BK-Kanals bei I/R wird im nachfolgenden Abschnitt genauer eingegangen.

1.7.3 Einfluss des mitoBKs auf den I/R-Schaden

Mitochondriale Präsenz ist neben dem mitoBK auch für eine Reihe weiterer Kaliumkanäle beschrieben wie beispielsweise für die zu Beginn des Kapitels erwähnten IK- und SK-Kanäle, sowie für TASK-3 (*two-pore acid sensitive type 3*), spannungsabhängige (Kv1.3), pH-sensitive und ATP-abhängige K⁺-Kanäle (mitoK_{ATP}). Für letztere, deren Lokalisation parallel zum mitoBK an der IMM nachgewiesen werden konnte, existiert eine Reihe von Studien, die ihren protektiven Einfluss bei I/R postulieren (Oldenburg et al. 2004, Costa and Garlid 2008), jedoch auch kontrovers diskutiert werden (Garlid and Halestrap 2012). Wohingegen der K_{ATP}-Kanal auch am Sarkolemma von Kardiomyozyten exprimiert wird (Suzuki et al. 2002), ist der BK-Kanal wie bereits erwähnt einzig an der IMM lokalisiert. Durch die Öffnung des mitoBKs (und des mitoK_{ATP}s) strömt K⁺ in das Mitochondrium, was zu einer Depolarisation des Membranpotentials führt. Dies limitiert den starken Ca²⁺-Einstrom, der während der Ischämie und insbesondere der Reperfusion in der mitochondrialen Matrix auftritt (Sato et al. 2005, Kang et al. 2007). Studien sowohl in isolierten Mitochondrien als auch in isolierten Herzen konnten eine reduzierte

ROS-Bildung durch die pharmakologische Öffnung des mitoBKs (siehe hierfür auch 1.7.4) zeigen (Stowe et al. 2006, Heinen et al. 2007a).

Isolierte Kardiomyozyten von globalen BK-Knockouttieren wiesen erhöhte ROS-Spiegel nach Anoxie/Reoxygenierung auf. Die globale Deletion des BK-Kanals führte zudem in ventrikulären Muskelfasern zu Beeinträchtigungen im energetischen Stoffwechsel durch eine reduzierte Kapazität in der oxidativen Phosphorylierung sowohl unter Normoxia als auch unter Anoxie/Reoxygenierung. (Soltysinska et al. 2014)

Ein weiterer Punkt ist die Annahme, dass die hohe intramitochondriale K^+ -Konzentration und die Depolarisation des Membranpotentials dem Protoneneinstrom entgegenwirken und so eine leichte Entkopplung der Atmungskette bewirken, wodurch reaktive Sauerstoffspezies entstehen (Stowe et al. 2006). Diese könnten eine Aktivierung der PKC ϵ begünstigen, welche ihrerseits eine Öffnung der mPTP verhindern kann (Costa and Garlid 2008). Auch eine direkte Inhibition des mitoBKs durch das proapoptotische Protein Bax (siehe Abschnitt 1.4) und eine daraus resultierende Öffnung der mPTP ist möglich (Cheng et al. 2008, Cheng et al. 2011). Des Weiteren konnte in koexprimierenden HEK-Zellen eine Interaktion des mitoBKs mit der ATP/ADP-Translokase nachgewiesen werden, die neben dem Transport von ATP aus dem Mitochondrium auch einen Regulator der mPTP darstellt (Zhang et al. 2016). Die bereits unter Abschnitt 1.5.1 beschriebenen kardioprotektiven Konditionierungseffekte können durch eine globale Ausschaltung des BK-Kanals *ex vivo* aufgehoben werden (Soltysinska et al. 2014).

Erste Hinweise lassen vermuten, dass der BK-Kanal eine wichtige Rolle für die durch cGMP-Erhöhung induzierte Kardioprotektion bei I/R spielt. So war in isolierten Rattenherzen eine Reduktion der Infarktgröße durch eine 10-minütige Infusion von Sildenafil unmittelbar vor der ischämischen Phase bei gleichzeitiger Blockade des BK-Kanals mit Paxilline bzw. der PKG I durch KT5823 nicht mehr möglich (Behmenburg et al. 2015). Eine direkte, Ca^{2+} -unabhängige Aktivierung des plasmamembranständigen BK-Kanals durch den NO/cGMP/PKG I-Signalweg konnte bereits in mehreren Zelltypen bestätigt werden (Sausbier et al. 2000, Swayze and Braun 2001). Dabei sind drei Serinreste am C-Terminus der α -Untereinheit identifiziert, welche direkt von der PKG I phosphoryliert werden (Kyle et al. 2013). Dennoch ist bislang noch ungeklärt wie das Signal von der zytosolischen PKG I über die äußere Mitochondrienmembran zum mitoBK an der IMM transferiert wird. Dass diese Signaltransduktion stattfindet, konnte bereits für den mitoK_{ATP} gezeigt werden (Costa et al. 2005).

1.7.4 Pharmakologische Modulation

NeuroSearch war eines der ersten Unternehmen, das einen synthetischen BK-Kanalöffner namens NS2004 entwickelte (Olesen et al. 1994b). Mittlerweile steht eine Reihe von synthetischen Substanzen zur Verfügung, von denen das Benzimidazolonderivat NS1619 und der Biaryl-thioharnstoff NS11021 die größte Bekanntheit erlangt haben (Olesen et al. 1994a, Bentzen et al. 2007). Es wird postuliert, dass NS1619 entweder direkt an die Linkerregion zwischen dem Segment S6 und der RCK bindet oder dass die Konformation dieser Region entscheidend für eine Aktivierung durch NS1619 ist (Gessner et al. 2012). Bei verschiedenen Spezies wie Mäusen (Xu et al. 2002, Wang et al. 2004), Ratten (Cao et al. 2005, Gao et al. 2005), Meerschweinchen (Stowe et al. 2006) und Kaninchen (Shi et al. 2007) konnte bereits in isolierten Langendorffherzen eine Reduktion des I/R-Schadens durch die Administration von NS1619 gezeigt werden. Allerdings demonstrierte NS1619 weder eine gute Wirksamkeit noch eine hohe Spezifität. Bedeutende Nebeneffekte stellen die zusätzliche Inhibition von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen in ventrikulären Myozyten sowie von spannungsabhängigen Ca^{2+} -, K^{+} - und Na^{+} -Kanälen dar (Edwards et al. 1994, Olesen et al. 1994a, Holland et al. 1996, Park et al. 2007). Zudem postulierte die Gruppe um Alicia J. Kowaltowski komplett BK-Kanal unabhängige Mechanismen in Mitochondrien als Auslöser für die Kardioprotektion (Cancherini et al. 2007). NS11021 stellt ein deutlich selektiveres und potenteres Pharmakon dar und wurde deshalb auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet. Seine Wirkung entfaltet es durch die Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierungskurve in negativer Richtung und einer daraus resultierende Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit (Bentzen et al. 2007). In *ex-vivo*-Systemen führte NS11021 ebenfalls zu einer Kardioprotektion nach I/R (Bentzen et al. 2009, Wojtovich et al. 2013).

Erst kürzlich wurde Rottlerin (*auch* Mallotoxin) als wirksamer BK-Kanalaktivator in Zusammenhang mit Kardioprotektion bei induzierter Kardioplegie beschrieben. Dabei erfolgt die Annahme, dass Rottlerin vergleichbar zu den γ -Untereinheiten den BK-Kanal durch Interaktion mit der porenformenden α -Untereinheit stimuliert. Es resultiert eine Linksverschiebung der Aktivierungskurve um ca. 70 mV, was insbesondere bei einem Membranpotential von mehr als -150 mV an der IMM für den mitoBK von Bedeutung ist. (Cordeiro et al. 2015a, Cordeiro et al. 2015b)

Des Weiteren existieren neben endogenen BK-Kanalöffnern wie Arachidonsäure (Hou et al. 2009) und 17β -Estradiol (Ohya et al. 2005) noch eine neuere Gruppe, die sog. GoSlo-SR-Familie (Roy et al. 2012) und einige Arzneistoffe, welche neben ihrer Hauptwirkung Einfluss auf die Aktivierung des BK-Kanals nehmen. Hierzu zählen beispielsweise das Antiepileptikum Zonisamid (Huang et al. 2007), der selektive Estrogenrezeptor-modulator Tamoxifen (Dick et al. 2001) sowie der PDE3-Inhibitor Cilostazol (Wu et al. 2004).

Das aus *Penicillium paxilli* stammende Alkaloid Paxilline ist der am häufigsten eingesetzte BK-Kanalblocker. Der genaue Wirkmechanismus ist noch nicht entschlüsselt, doch wird eine allosterische Bindung des Paxillines vermutet, welche die Neigung des BK-Kanals für den geschlossenen Zustand um ein 500-faches erhöht gegenüber dem offenen Zustand (Zhou and Lingle 2014). Dabei ist Paxilline auch in der Lage den mitoBK an der IMM zu inhibieren (Aon et al. 2010, Soltysinska et al. 2014). Die Administration von Paxilline kann zudem im Langendorffmodell die kardioprotektiven Wirkungen von NS11021 antagonisieren (Bentzen et al. 2009). Ein Nachteil von Paxilline stellt die zusätzliche Hemmung von SERCA dar (Bilmen et al. 2002). Die BK-Kanalinhibitoren Iberiotoxin und Charybdotoxin zeigen eine hohe Spezifität für den BK-Kanal, sind aber aufgrund ihrer Peptidstruktur ungeeignet für die Modulation mitochondrialer Kanäle (Clements et al. 2015).

Zusammenfassend kann der BK-Kanal pharmakologisch moduliert werden, allerdings ist bislang keine spezifische Blockade/Öffnung des mitoBKs möglich.

1.8 Zielsetzung

Die Therapieoptionen beim akuten Myokardinfarkt sind limitiert. Trotz intensiver Forschung ist bislang die schnellstmögliche Wiedereröffnung des verschlossenen Koronargefäßes in Kombination mit einer antithrombotischen Therapie die einzige Möglichkeit das Herz vor dem voranschreitenden Ischämieschaden zu schützen. Die akute Wiederherstellung des Blutflusses, die sog. Reperfusion, führt vermutlich über eine exzessive Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) jedoch auch selbst zu Zelltod und kardialer Dysfunktion (Garcia-Dorado 2004). Zahlreiche präklinische Befunde implizieren, dass mithilfe von mechanischen sowie pharmakologischen Konditionierungsansätzen der Ischämie/Reperfusion (I/R)-Schaden reduziert werden kann. Hierbei scheint die Aktivierung des NO/cGMP/PKG I-Signalweges eine bedeutende Rolle zu spielen. Basierend auf zellfreien Untersuchungsmodellen sowie unterstützt durch *ex-vivo*-Analysen wurden mitochondriale K⁺-Kanäle als mögliche Effektormoleküle der cGMP-vermittelten Kardioprotektion postuliert (Costa et al. 2008). Eine Öffnung dieser K⁺-Kanäle wirkt möglicherweise limitierend auf die ROS-Freisetzung und Ca²⁺-Überladung und somit auf den I/R-Schaden. In diesem Zusammenhang war ein zentrales Ziel dieser Arbeit die Rolle des endogenen BK-Kanals für die Protektionsmechanismen in Kardiomyozyten bei Myokardinfarkt *in vivo* zu entschlüsseln. Hierfür wurden erstmals Mausmutanten mit einer globalen bzw. mit gewebespezifischen Deletionen des BK-Kanals in einem *in-vivo*-Myokardinfarktmodell mit 30 min Ischämie, gefolgt von 120 min Reperfusion analysiert. Es wurden die Auswirkungen der Kardiomyozyten-spezifischen BK-Kanalablation auf kardiovaskuläre Funktionsparameter wie Blutdruck und Herzfunktion sowie auf die myokardialen I/R-Schäden erfasst. Neben den akuten Auswirkungen auf die Infarktgröße wurden auch die klinisch relevanteren Langzeitfolgen des Myokardinfarkts nach 4 Wochen Reperfusion anhand Veränderungen in der Herzfunktion und des Fibrosierungsgrades studiert. Von großem Interesse war zudem der in der Eingangshypothese formulierte Zusammenhang zwischen dem BK-Kanal und den cGMP-abhängigen Schutzwirkungen bei Myokardinfarkt und damit die Annahme, dass die direkte Öffnung des mitoBKs mittels pharmakologischer Ansätze *in vivo* kardioprotektiv wirkt. Um die entsprechenden Zusammenhänge und Mechanismen abzubilden wurden cGMP-erhöhende Wirkstoffe und direkte BK-Kanalmodulatoren im Sinne einer pharmakologischen Prä- bzw. Postkonditionierung verwendet. Ein Fokus der vorliegenden Arbeit lag dabei auch auf der kardiomyozytären sGC, die möglicherweise den primären Generator des kardioprotektiven cGMPs bei I/R darstellt. In Analogie zu den Studien im mitoBK-Mausmodell wurde für diese Untersuchungen der I/R-Schaden bei Myokardinfarkt erstmalig in Mausmutanten mit einer Kardiomyozyten-spezifischen sGC-Ablation charakterisiert.

2. Material und Methoden

Allgemeine Laborgeräte, Software und standardmäßig verwendete Chemikalien und Laborverbrauchsmaterial sind in Abschnitt 2.1 aufgeführt. Versuchsspezifische Materialien, Substanzen und Puffer sind zusammen mit den entsprechenden Methoden in den jeweiligen Abschnitten 2.3-2.7 tabellarisch aufgelistet.

2.1 Allgemeine Materialien

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Amersham Imager 600	GE-Healthcare
Analysenwaage	VWR-124, Sartorius
Autoklav	VX-55, Systec
	ELV 3870, Tuttnauer
BioDoc Analyze	Biometra
Echokardiograph für Kleintiere	Vevo 2100, VisualSonics
Eismaschine	6213 Ziegra
Elektrodenplatten für Semi-Dry (WB)	Scie-Plas, 30034507
Elektrophoresekammer (Agarosegel)	Sub-cell, BioRad
Elektrophoresekammer (SDS-Page)	MiniProtean 3 Cell, BioRad
ELISA-Plattenreader	Tecan Infinite F200
EttanDige Imager	GE-Healthcare
Fluoreszenzmikroskop	ApoTome, Zeiss
Gelgießapparatur	Bio-Rad
Gewebehomogenisator	Polytron 1130, Kinematica
	Minilys, Bertin Technologies
Hamilton-Spritze	X035, Carl Roth
Heizblock	Thermomixer compact, Eppendorf
Heizplatte mit Temperaturkontrolle	TCAT-2LV Controller, Physitemp
Isofluran-Absauganlage	LAS, Groppler
Isofluran-Narkoseeinheit	0258-Narkoseeinheit, Völker
Kreisschüttler	Genie 2 G560E, Scientific Industries
Kryotom	Microm HM, Thermo Scientific
Kühlzentrifuge	Centrifuge 5417 R, Eppendorf
Langendorff-Perfusionsanlage	Harvard Apparatus
Lichtmikroskop	Axiovert 200, Zeiss
Luftstromschränke (Tierhaltung)	Uniprotect, Bioscape
Magnetische Heizplatte	50383, Heidoolph
Mehrfachdispenser	Handy StepS, Brand
Messschieber	Digitale Schieblehre, Mitutoyo
Mikrowelle	MWG 800 FiF
Nanophotometer	P 330, Implen
Netzanschlussgerät	EV 231, Consort
	Standard Power Pack, P15, BioRad
PCR-Maschine	Mastercycler, Eppendorf
pH-Meter	pH 540 GLP, WTW
	pH-Meter 761 Calimatic, Knick
Pipetten (10, 20, 200, 1000 µl)	Pipetman, Gilson
Pipetten, 8-Kanal (200, 1000 µl)	ResearchPro, Eppendorf
Pipettierhilfe	Accu-jet pro, Brand

MATERIAL UND METHODEN

Präzisionswaage	BP2100S, Sartorius
Reagenzglasrotator	3025, GFL
Reinstwasseraufbereitungsanlage	Purelab flex, Elga Milli-Q Biocell, Millipore
Schlauchpumpe (Kardiomyozytenisolation)	Ismatec
Schüttler	S20, 60283-00, CAT
Stereomikroskop	Leica M80 Leica EZ5
Stoppuhr	TR118, Oregon Scientific
Systemkamera	Lumix TZ8, Panasonic
Taschenwaage	LS2000H, G&G
Telemetriesystem	DataScience Int.
Vacuumzentrifuge	Concentrator 5301, Eppendorf
Ventilator (Beatmung)	MiniVent Typ 845, Hugo Sachs Electronics
Wärmelampe	Infrarotlampe, Beurer
Zentrifuge	Centrifuge 5415 D, Eppendorf Centrifuge 5417 C, Eppendorf

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Bestellnummer	Hersteller
Aluminiumfolie Rotilabo	2596.1	Carl Roth
Costar Stripette 5 ml	CL S4487	Corning
10 ml	CL S4488	Corning
25 ml	CL S4489	Corning
Einmalskalpell	Blade 21	Feather Safety Razor
Filterpapier Rotilabo 0,35 mm	CL67.1	Carl Roth
Konische Zentrifugenröhrchen 15 ml	430766	Corning
50 ml	430291	Corning
stehend 50 ml	430897	Corning
Küvetten	67.742	Sarstedt
Parafilm	H666.1	Carl Roth
PCR Tube 0,5 ml	0030124.537	Eppendorf
Petrischalen 100 x 20 mm	430167	Corning
Pipettenspitzen 10 µl	765288	Greiner bio one
200 µl	70.760.002	Sarstedt
1000 µl	70.762	Sarstedt
Präzisionswischtücher KIMTECH	AA64.1	Carl Roth
Reaktionsgefäß Rotilabo 1,5 ml	CH76.1	Carl Roth
2,0 ml	CK06.1	Carl Roth
Reaktionsgefäß SafeSeal 1,5 ml	72.706.400	Sarstedt
Spritzen 1 ml Luer	3000013	BD Bioscience
Wägeschälchen	1878.2	Carl Roth

2.1.3 Software

Software	Hersteller
AxioVision Rel 4.8.1.0	Zeiss
Corel Draw 11	Corel Corporation
Dataquest A.R.T.3.1	DataScience Int.
EttanDige Imager 1.0	GE-Healthcare
GNU Image Manipulation Program	GIMP
GraphPad Prism 4	GraphPad Software
GSA Image Analyser	GSA
ImageQuant TL 7.0	GE-Healthcare
Magellan 7	Tecan
Microsoft Office 2010, 2013	Microsoft
Microsoft Windows 7, 10	Microsoft
Vevo Strain 2100	VisualSonics

2.2 Tiermodelle

2.2.1 Haltung

Die Züchtung und Haltung der Versuchstiere wurde in der Abteilung Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie des Pharmazeutischen Instituts der Eberhard Karls Universität Tübingen durchgeführt. Die Haltung der Mäuse erfolgte in einem offenen spezifiziert Pathogen-freien (SPF) Haltungssystem mit einer Raumtemperatur (RT) von $22 \pm 2^\circ\text{C}$ bei 50-60 % relativer Luftfeuchtigkeit und einem Rhythmus von abwechselnd 12 Stunden Helligkeit und 12 Stunden Dunkelheit. Die Tiere wurden in Gruppen von 2 bis 3 Mäusen pro Käfig (Makrolon Typ II) gehalten. Den Mäusen standen grobes Holzeinstreu und Nistmaterial sowie kleine Kunststoffhäuser zur Verfügung. Sie wurden mit Trinkwasser sowie einer handelsüblichen Standarddiät ad libitum ernährt, welche täglich kontrolliert wurden.

2.2.2 Transgene Mauslinien

2.2.2.1 Globale BK-Knockoutmäuse ($\text{BK}^{-/-}$)

Für das Modell des konstitutiven, globalen BK-Knockouts (*kurz*: BK-KO; $\text{BK}^{-/-}$) wurden Mäuse mit SV129/C57BL6-Hintergrund verwendet, die homozygot eine Deletion des für die Porenregion des BK-Kanals kodierenden DNA-Abschnitts in dem *Kcnma1*-Gen aufwiesen. Als Kontrollen fungierten Wildtyp-Wurfgeschwister (*kurz*: BK-WT; $\text{BK}^{+/+}$). Die Generierung der $\text{BK}^{-/-}$ -Mäuse wurde 2004 von Sausbier et al. beschrieben (Sausbier et al. 2004). Die Verpaarung für den Erhalt der Versuchstiere in der F2-Generation erfolgte

durch Kreuzung heterozygoter 129.B6-KCNMA1^{tm/PR}-Mäuse (*kurz*: BK^{-/+}). Die Zucht und Genotypisierung der Tiere wurde von Frau Isolde Breuning durchgeführt.

2.2.2.2 Kardiomyozyten-spezifische BK-Knockoutmäuse (CMBK^{-fl})

Die Generierung der konditionalen Kardiomyozyten-spezifischen BK-Knockoutmäuse (α MHC-Cre^{Tg/+}; BK^{-fl}, *kurz*: CMBK-KO; CMBK^{-fl}) erfolgte mithilfe eines Cre/loxP-Rekombinasesystems. Die Cre (*cyclization recombinase*)-Rekombinase katalysiert die Rekombination zwischen zwei loxP (*locus of X-over P1*)-Erkennungssequenzen, welche zuvor flankierend in dem zu entfernenden Genabschnitt (gefloxtes Allel, fl) eingebracht wurden (Sternberg and Hamilton 1981). Die loxP-Sequenz besteht aus einem zentralen Element mit 8 Basenpaaren, welches die Orientierung bestimmt, und beidseitig von palindromischen Sequenzen mit jeweils 13 Basenpaaren flankiert wird. DNA-Segmente, die zwischen zwei gleichgerichteten loxP-Stellen liegen, werden durch die Cre-Rekombinase als kreisförmiges Produkt herausgeschnitten und abgebaut (Abbildung 9).

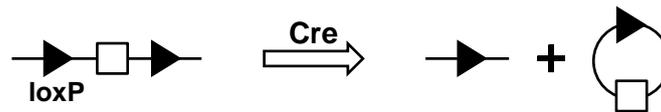


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Cre/loxP-Systems

Das Zielallel (*Quadrat*) wird von zwei gleichgerichteten loxP-Stellen (*Dreiecke*) flankiert, welche von der Cre-Rekombinase erkannt werden. Diese katalysiert die Rekombination der loxP-Sequenzen und bedingt damit, dass das gefloxt Allel als kreisförmiges Produkt aus der DNA herausgeschnitten und abgebaut wird.

Als Promotor für die Kardiomyozyten-spezifische Expression der Cre-Rekombinase wurde das für die schwere Myosinkette vom Typ 6c-kodierende Gen verwendet (Agah et al. 1997). Für die Generierung der F1-Elterngeneration wurden heterozygote B6.FVB-Tg(Myh6-cre)2182Mds/J-Mäuse (*kurz*: α MHC-Cre^{Tg/+}, Charles River Laboratories / Stock-Nr.: 011038) mit BK^{-/+}-Tieren gekreuzt (Abbildung 10).

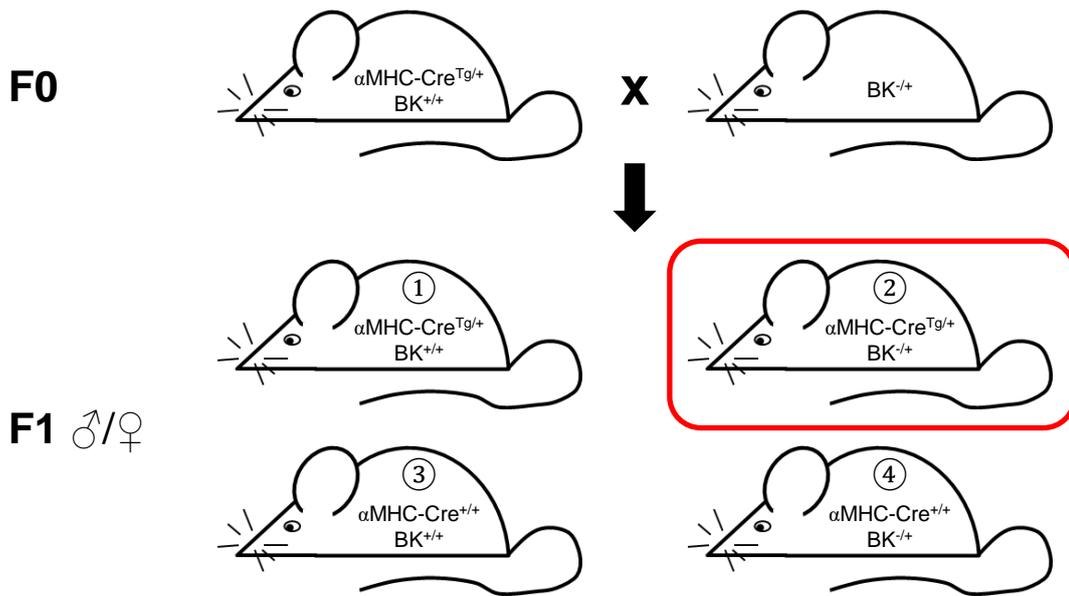


Abbildung 10: Verpaarungsschema zur Generierung der Elterntiere (F1) für die Versuchstierkohorten
 Kreuzung von $\alpha\text{MHC-Cre}^{\text{Tg}/+}$ Tieren mit $\text{BK}^{-/-}$ -Mäusen für die Generierung der F1-Elterntiere (roter Kasten, ②), sowie zum Erhalt der Linie (①).

Die aus der F1-Generation erhaltenen Nachkommen wurden einerseits zur Produktion der Versuchstiere (Abbildung 10, ②) und andererseits für den Erhalt der Elterngeneration (Abbildung 10, ①) eingesetzt. In einem weiteren Verpaarungsschritt wurden die $\alpha\text{MHC-Cre}^{\text{Tg}/+}$; $\text{BK}^{-/-}$ -Mäuse der F1-Generation (Abbildung 10, ②) mit 129.B6-KCNMA1^{tmL2/PR} (kurz: $\text{BK}^{\text{fl/fl}}$, Eigenzucht)-Tieren verpaart (Abbildung 11).

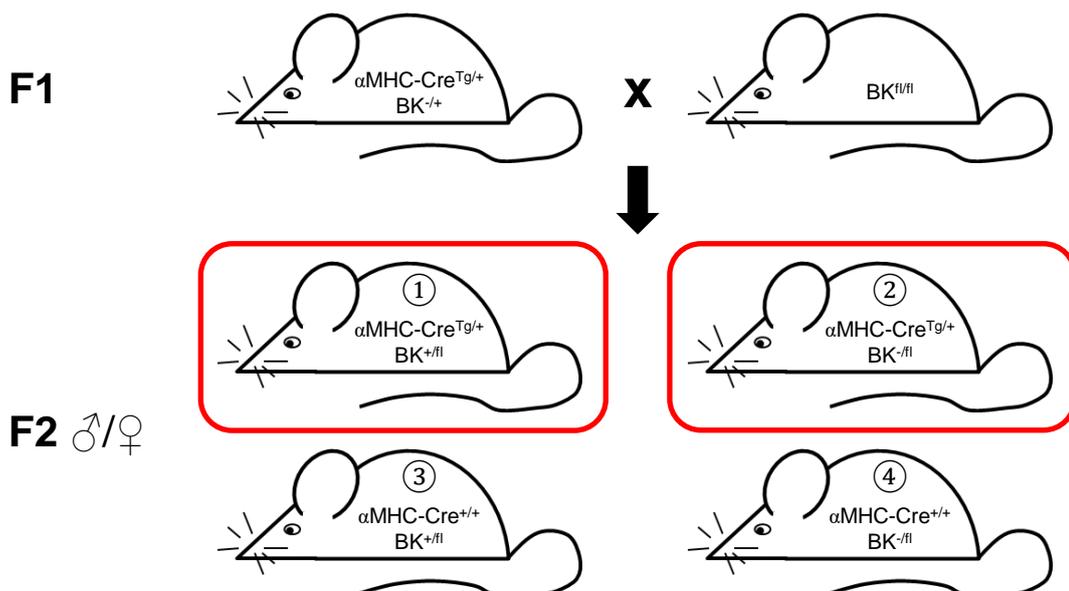


Abbildung 11: Verpaarungsschema zur Generierung der Versuchstiere (F2)
 Die Verpaarung der F1-Nachkommen (Abbildung 10, ②) mit den geflochten BK-Tieren ($\text{BK}^{\text{fl/fl}}$) resultierte in den CMBK-CTR ($\alpha\text{MHC-Cre}^{\text{Tg}/+}$; $\text{BK}^{+/fl}$, ①) und CMBK-KO ($\alpha\text{MHC-Cre}^{\text{Tg}/+}$; $\text{BK}^{-/fl}$, ②) -Versuchstieren.

Diese Kreuzung führte wie in Abbildung 11 dargestellt neben den unerwünschten Genotypen (③,④) zu den CMBK^{+fl} (①) und CMBK^{-fl} (②) -Versuchstieren. Die CMBK^{+fl}-Wurfgeschwister wurden hierbei als Kontrollen verwendet, da sie ebenfalls die Cre-Rekombinase in den Kardiomyozyten exprimieren, wodurch sich potentielle Einflüsse des Cre-Rekombinasetransgens besser abschätzen lassen.

2.2.2.3 Glattmuskelzell-spezifische BK-Knockoutmäuse (SMBK^{-fl})

Der Glattmuskelzell-spezifische BK-Knockout (SMMHC-CreER^{T2} Tg/+; BK^{-fl}, kurz: SMBK-KO; SMBK^{-fl}) wurde ebenfalls mithilfe des Cre/loxP-Systems generiert. Die Verpaarungen wurden analog zur Generierung der CMBK-Knockouttiere durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2.2.2). Da das SMMHC-CreER^{T2}-Transgen auf dem Y-Chromosom lokalisiert ist, wurden ausschließlich männliche Tiere dieser Linie für die entsprechenden Verpaarungen verwendet. Bei der eingesetzten Liganden-aktivierbaren Cre-Rekombinase (CreER^{T2}) handelte es sich um ein Fusionsprotein aus der Cre-Rekombinase und einer mutierten Ligandenbindungsdomäne eines Steroidrezeptors (Östrogenrezeptor), an der kein endogenes Östrogen, aber ein synthetischer Ligand (Tamoxifen) binden kann um die Cre-Rekombinase zu aktivieren. Die Expression der Cre-Rekombinase erfolgte unter der Kontrolle des Glattmuskelzell-spezifischen Promotors für das Gen *Myh11*, welches für die schwere Myosinkette kodiert (Wirth et al. 2008). Im Unterschied zu dem αMHC-Cre-basierten Mausmodell (siehe Abschnitt 2.2.2.2) wurde die Glattmuskelzell-spezifische Deletion des BK-Kanals erst durch Tamoxifengabe in zunächst prä-mutanten SMBK^{-fl}-Mäusen induziert. SMBK^{+fl} (SMMHC-CreER^{T2} Tg/+; BK^{+fl}, kurz: SMBK-CTR)-Wurfgeschwister wurden ebenfalls mit Tamoxifen behandelt und als Kontrollen für die durchgeführten Versuche verwendet.

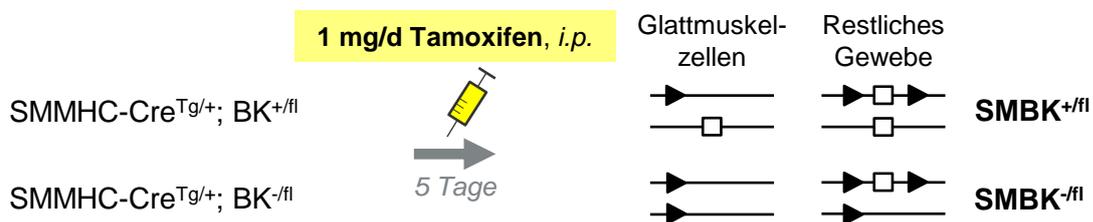


Abbildung 12: Tamoxifen-induzierte Deletion des BK-Kanalporenxons in Glattmuskelzellen

Die Aktivierung der Cre-Rekombinase in Glattmuskelzellen (SMMHC-Cre) erfolgte durch Injektion von Tamoxifen (1 mg/d, *i.p.* für 5 Tage). Nach weiteren sieben Tagen wurden die Tiere für die Versuche verwendet. Zielallel (*Quadrat*); loxP-Erkennungssequenzen (*Dreiecke*); SMBK-KO (SMBK^{-fl}), SMBK-CTR (SMBK^{+fl}).

Für die Aktivierung der Cre-Rekombinase wurde den männlichen Versuchsmäusen im Alter von acht Wochen jeweils 1 mg Tamoxifen, gelöst in 50 µl Miglyol, an fünf aufeinander folgenden Tagen intraperitoneal (*i.p.*) appliziert, wodurch spezifisch in der

glatten Muskulatur eine Konversion des loxP-flankierten BK-Allels (fl) in ein BK-Knockout-Allel (-) erzielt wurde (Abbildung 12). Nach einer Zeitspanne von sieben Tagen, nach welcher die vollständige Deletion des SMBKs zu erwarten war (Sprossmann et al. 2009), wurden die Tiere innerhalb weiterer sieben Tage für Experimente verwendet.

2.2.2.4 ROSA26 Cre-Reportermause

Mithilfe der ROSA26 Cre-Reportermaus (*kurz: ROSA^{mTG/+}*) kann die Spezifität und Effizienz der gewebespezifischen Cre-Rekombination untersucht werden (Muzumdar et al. 2007). In dieser Maus wurde ein DNA-Abschnitt ins Genom eingebracht, der sowohl für ein rot (mT) als auch für ein grün (mG) fluoreszierendes, membranständiges, global exprimiertes Protein kodiert. Die für mT-kodierende DNA-Sequenz wird dabei von zwei loxP-Stellen flankiert. Somit erscheinen sämtliche Gewebe der Maus unter dem Fluoreszenzmikroskop zunächst rot. Nach Cre-vermittelter Rekombination kommt es zur Exzision des geflochtenen mT-Abschnitts. In Abhängigkeit von der Spezifität und Effizienz der Cre wird in der Folge das grün fluoreszierende mG-Protein exprimiert. In Abbildung 13 sind die entsprechenden Vorgänge für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen der ROSA^{mTG/+}-Reportermäusen nach Verpaarung mit der α MHC-Cre^{Tg/+}-Mauslinie, die eine Kardiomyozyten-spezifische Cre-Rekombinase bildet (siehe Abschnitt 2.2.2.2), dargestellt.

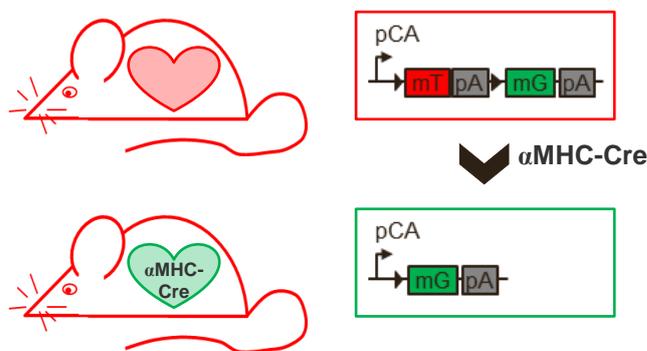


Abbildung 13: Prinzip des globalen, doppel-fluoreszenten Cre-Reportermausmodells

Ein gefloxter DNA-Abschnitt führt in den ROSA^{mTG/+}-Mäusen zu einer ubiquitären Expression eines rot fluoreszierenden, membranständigen Proteins (mT). Nach Cre-vermittelter Rekombination (*hier: α MHC-Cre*) wird das geflochte DNA-Segment deletiert, was zur Expression eines grün fluoreszierenden, membranständigen Proteins (mG) führt. Durch die Kardiomyozyten-spezifische Expression der α MHC-Cre wird die grüne Fluoreszenz in den ROSA^{mTG/+}; α MHC-Cre^{Tg/+}-Mäusen exklusiv in den Kardiomyozyten beobachtet.

2.2.2.5 Kardiomyozyten-spezifische sGC-Knockoutmäuse (CMsGC^{-fl})

Die gewebespezifischen Mutanten α MHC-CreER^{T2} Tg/+; sGC^{-fl} (*kurz: CMsGC-KO; CMsGC^{-fl}*) und die Kontrollwurfgeschwistermäuse α MHC-CreER^{T2} Tg/+; sGC^{+fl} (*kurz: CMsGC-CTR; CMsGC^{+fl}*) wurden durch Kreuzung gefloxter B6-Gucy1b3<<tm1.1Frb(flox)>>-Mäuse (sGC-KO) mit α MHC-CreER^{T2}-transgenen Tieren (Takefuji et al. 2012) generiert. Die Ausschaltung der β_1 -Untereinheit durch Deletion des Exons 10 führte zu einem vollständigen Verlust der löslichen Guanylatzyklase (sGC) (Friebe et al. 2007). Um die sGC spezifisch in den Kardiomyozyten zu inaktivieren, wurde

die CreER^{T2}-Rekombinase durch Tamoxifen aktiviert. Das Injektionsprotokoll entsprach dabei der unter Abschnitt 2.2.2.3 beschriebenen Durchführung. Erst nach einem Zeitraum von 50 Tagen war mit einer vollständigen Ablation der sGC zu rechnen (Groneberg et al. 2010). Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche starteten daher frühestens nach Ablauf dieser Frist. Die Versuchstiere wurden von Herrn Prof. Dr. Andreas Friebe, Physiologisches Institut, Julius-Maximilians-Universität Würzburg generiert und von ihm zur Verfügung gestellt.

2.3 Genotypisierung

2.3.1 Materialien und Substanzen

Material/Substanz/Kit	Bestellnummer	Hersteller
2-Log DNA-Ladder	32000-S	New England Biolabs
Agarose	840004	Biozym Scientific
Borsäure	6943.3	Carl Roth
Bromphenolblau	15375	Serva
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	K039.1	Carl Roth
Ethanol (100 %)	32205	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid	E1510	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	8043.2	Carl Roth
Ficoll 400	CN90.3	Carl Roth
High Pure PCR Preparation Kit	11796828001	Roche
Isopropanol	6752.3	Carl Roth
Tamoxifen	T5648	Sigma-Aldrich
Taq DNA-Polymerase	11435094001	Roche
Taq-Puffer (10x)	11435094001	Roche
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	5429.3	Carl Roth
Xylencyanol	X4126	Sigma-Aldrich

Primer Mauslinie	Bezeichnung	Sequenz (von 5' nach 3')
αMHC-Cre ^{Tg/+}	F1	ATG ACA GAC AGA TCC CTC CTA TCT CC
	F2	CAA ATG TTG CTT GTC TGG TG
	R1	CTC ATC ACT CGT TGC ATC ATC GAC
	R2	GTC AGT CGA GTG CAC AGT TT
SMMHC-CreER ^{T2 Tg/+}	F1	TGA CCC CAT CTC TTC ACT CC
	F2	AAC TCC ACG ACC ACC TCA TC
	R	AGT CCC TCA CAT CCT CAG GTT
BK	F1	TGG TCT TCT TCA TCC TCG GG
	F2	AAG GGC CAT TTT GAA GAC GTC
	R	CCA GCC ACA GTG TTT GTT GG
ROSA ^{mTG/+}	F	CTC TGC TGC CTC CTG GCT TCT
	R1	CGA GGC GGA TCA CAA GCA ATA
	R2	TCA ATG GGC GGG GGT CGT T

- ▶ Lösen der Primer entsprechend den Herstellerangaben mit autoklaviertem dH₂O
- ▶ Einstellen auf Stammkonzentration von 100 µM; Arbeitskonzentration: 20 µM

2.3.2 Puffer und Lösungen

0,5 M EDTA pH 8,0	
EDTA x 2 H ₂ O	108 g
dH ₂ O	<i>ad</i> 1000 ml
▶ auf pH 8,0 einstellen	

10x TBE-Puffer	
TRIS	108 g
Borsäure	55 g
0,5 M EDTA pH 8,0	40 ml
dH ₂ O	<i>ad</i> 1000 ml
▶ 1:10 Verdünnung für 1x TBE	

Agarosegel 2 %	
Agarose	2 g
1x TBE-Puffer	100 ml

DNA-Längenstandard	
6x Dye (s.u.)	20 µl
2-log DNA-Ladder	10 µl
dH ₂ O	90 ml

6x Gel-Ladepuffer (6x Dye)	
Ficoll 400	9 g
0,5 M EDTA pH 8,0	12 ml
10x TBE-Puffer	30 ml
Bromphenolblau (55 mg/ml)	1,35 ml
Xylencyanol (50 mg/ml)	1,50 ml

2.3.3 Ohrmarkierung und Schwanzspitzenbiopsie

Um die Versuchstiere dem richtigen Genotyp zuordnen zu können, wurden sie im Alter von 3-4 Wochen mit einem Ohrclip versehen. Nach der Markierung wurde zur Genotypisierung eine Biopsie der Schwanzspitze vorgenommen, aus welcher im Anschluss die DNA zur weiteren Analyse isoliert wurde.

2.3.4 DNA-Isolation

Für die DNA-Isolation wurde das High Pure PCR Preparation Kit der Firma Roche verwendet. Im ersten Schritt wurde die Gewebeprobe mit 200 µl Gewebelysepuffer und 40 µl Proteinase K über Nacht bei 55°C auf dem Schüttler (500 U/min) inkubiert. Durch die Bestandteile des Gewebelysepuffers werden hierbei Zellmembranen zerstört. Die Proteinase K fungiert als Endo-/Exopeptidase und sorgt damit für den Abbau der Proteine im Zellysat. Zudem werden in Kombination mit EDTA vorhandene, endogene DNAsen inaktiviert. Im Anschluss wurde die Gewebeprobe mechanisch zerkleinert und mit einer Lösung aus 200 µl Bindepuffer und 100 µl Isopropanol bei 13.000 U/min für 5 min zentrifugiert. Die DNA im Überstand wurde in ein Polypropylen-Filterröhrchen transferiert. Diese Filterröhrchen weisen eine Silica-Beschichtung auf, die in Gegenwart von Guanidin eine Bindung der Nukleinsäuren an die Säulenmatrix ermöglicht. Es folgte ein

Zentrifugationsschritt mit 8000 U/min für 1 min. Mit den nachfolgenden zwei Waschschritten (Zugabe von 500 µl Waschpuffer, Zentrifugation bei 8000 U/min für 1 min) wurde die an der Säulenmatrix gebundene DNA weiter aufgereinigt. Durch die Zugabe von 200 µl Elutionspuffer mit hoher TRIS-Konzentration wurde die DNA-Silica-Bindung destabilisiert und die isolierte DNA eluiert. Die Aufbewahrung erfolgte für maximal 24 Stunden bei 4°C bzw. bei längerer Lagerung bei -20°C.

2.3.5 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht die selektive enzymatische Amplifikation bestimmter DNA-Abschnitte *in vitro* (Mullis and Faloona 1987). Dabei synthetisiert eine hitzestabile DNA-Polymerase unter Zugabe von Desoxyribonukleotiden, Magnesiumionen und den entsprechenden Primer zum gewünschten DNA-Abschnitt einen komplementären Strang. Im ersten Schritt erfolgt hierbei die Denaturierung bei hoher Temperatur, bei welcher die bestehenden Wasserstoffbrücken getrennt und die Basenpaarungen der doppelsträngigen DNA gespalten werden. Die spezifische, komplementäre Anlagerung der Primer an die nun einzelsträngige DNA wird als „Annealing“ bezeichnet. Um eine Rehybridisierung zu vermeiden werden die Primer im Überschuss zugegeben. Bei der Elongation findet die Vervielfältigung der durch die Primer flankierten DNA-Abschnitte statt. Als DNA-Matrize zur Vervielfältigung wurde die eluierte DNA der Schwanzspitzenbiopsien (siehe Abschnitt 2.3.4) und der isolierten Gewebe (siehe Abschnitt 2.4.4) herangezogen. Die benötigte Menge der in Tabelle 1 aufgeführten Substanzen wurde entsprechend der Anzahl an Proben berechnet und zu einem PCR-Mastermix kombiniert. 47 µl des Mastermix wurden mit jeweils 3 µl der isolierten DNA für die Amplifikation vereinigt. Die Einstellungen der Temperatur und Dauer der einzelnen Schritte der Polymerasekettenreaktion am Thermocycler (Eppendorf Mastercycler) sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 1: Pipettierschema des PCR-Mastermixes für BK

isolierte DNA	3,0 µl
dH ₂ O	36,8 µl
dNTPs (10 mM/Nukleotid)	1,0 µl
Taq-Puffer (10x)	5,0 µl
Vorwärtsprimer F1	2,0 µl
Vorwärtsprimer F2	1,0 µl
Rückwärtsprimer R	1,0 µl
Taq DNA-Polymerase	0,2 µl

Tabelle 2: PCR-Programm

1. Initiale Denaturierung (94°C)	3 min
2. Denaturierung (94°C)	30 s
3. Annealing (54°C)	30 s
4. Elongation (72°C)	30 s
5. Wiederholung Schritt 2.-4. 35x	
6. Finale Elongation (72°C)	3 min
7. Kühlung 4°C	max. 24 h

2.3.6 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient zur Auftrennung der amplifizierten DNA-Fragmente. Hierbei wandert die durch die Phosphatgruppen des Zucker-Phosphat-Rückgrats der Nukleinsäuren negativ geladene DNA im elektrischen Feld zur positiv geladenen Elektrode. Die Wanderungsgeschwindigkeit der linearen DNA-Fragmente durch das Agarosegel ist dabei negativ proportional zum Molekulargewicht. Der mit einem pH-Wert von 8,0 leicht basische Elektrophoresepuffer (0,5 M EDTA pH 8,0, siehe Abschnitt 2.3.2) gewährleistet dabei den polyanionischen Zustand der DNA. Die Größencharakterisierung erfolgt mithilfe eines DNA-Längenstandards, welcher DNA-Fragmente einer definierten Länge (Anzahl in Basenpaaren (bp)) enthält.

Es wurde eine Agarosekonzentration von 2 % in 1x TBE-Puffer verwendet (siehe Abschnitt 2.3.2). Die Agarose/1x TBE-Mischung wurde in der Mikrowelle erhitzt bevor Ethidiumbromid in einer finalen Konzentration von 0,1 µl/ml zugegeben wurde und das noch flüssige Gel in einen Gelschlitten gegossen wurde. Das fluoreszierende Ethidiumbromid interkaliert in die DNA, wodurch die Visualisierung bei Anregung mit UV-Licht möglich wird. Die Polymerisation des Gels benötigt bei RT eine Zeit von ca. 20 min. In dieser Zeit wurden die Proben mit dem 6-fach konzentrierten Gel-Ladepuffer (6x Dye, siehe Abschnitt 2.3.2) im Verhältnis 6:1 versetzt. Im Anschluss konnten diese zusammen mit dem DNA-Längenstandard (siehe Abschnitt 2.3.2) aufgetragen und die Elektrophorese bei 100 V für ca. 50 min (abhängig von der Fragmentgröße) durchgeführt werden. Die im Ladepuffer enthaltenen Farbstoffe Bromphenolblau (entspricht ca. 100 bp) und Xylencyanol (entspricht ca. 800 bp) dienten als Anhaltspunkte an welchen Stellen im Gel sich welche Fragmentgrößen zum aktuellen Zeitpunkt befanden. Die hohe Viskosität des 6x Dyes verhinderte ein Diffundieren der Proben aus den Geltaschen.

Tabelle 3: Größe (in bp) der erwarteten DNA-Amplifikate

BK (+)	466	αMHC-Cre (+)	200	SMMHC-CreER ^{T2} (+)	230	ROSA (+)	330
BK (-)	132	αMHC-Cre (Tg)	300	SMMHC-CreER ^{T2} (Tg)	270	ROSA (mTG)	250
BK (fl)	577						

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mittels Polymerasekettenreaktion und sich anschließender Gelelektrophorese verschiedene BK-Kanal- (siehe Abschnitt 2.2.2.1 und 2.2.2.2), αMHC-Cre- (siehe Abschnitt 2.2.2.2), SMMHC-CreER^{T2}- (siehe Abschnitt 2.2.2.3) und ROSA26- (siehe Abschnitt 2.2.2.4) Allele amplifiziert und identifiziert. Die Größe der jeweiligen DNA-Amplifikate sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die Detektion der Banden ist nachfolgend exemplarisch für die Charakterisierung der Kardiomyozyten-spezifischen BK-Knockouts und Kontrollmäuse gezeigt (Abbildung 14).

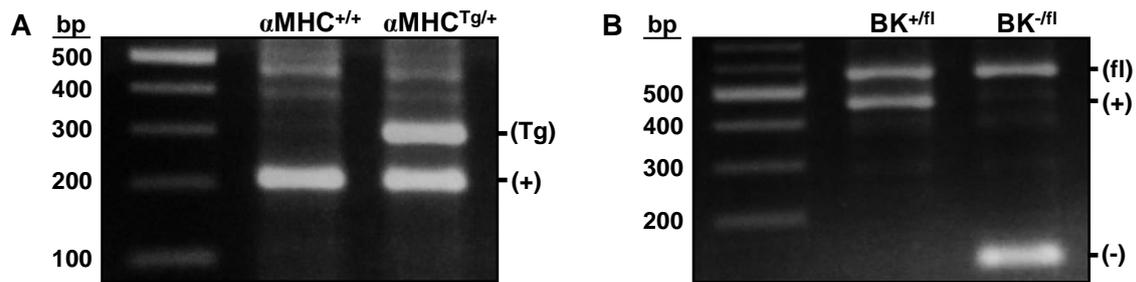


Abbildung 14: Exemplarisches Ergebnis einer Genotypisierungs-PCR der CMBK-Mauslinie
 (A) Repräsentative Darstellung der PCR-Ergebnisse von $\alpha\text{MHC-Cre}^{+/+}$ -Kontrollmäusen und heterozygoten $\alpha\text{MHC-Cre}^{\text{Tg}/+}$ -transgenen Tieren; (Tg): transgen, 300 bp; (+): Kontrolle, 200 bp. (B) Exemplarische Genotypisierungs-PCR zur Identifizierung von heterozygoten BK-Kontrolltieren ($\text{BK}^{+/fl}$) und Tieren, die sowohl ein KO- als auch ein gefloxtes BK-Allel tragen ($\text{BK}^{-/fl}$); (fl): gefloxt, 577 bp; (+): Wildtyp, 466 bp; (-): Knockout, 132 bp.

2.4 Kardiomyozyten- und Gewebeisolation für die Untersuchung der Cre-regulierten BK-Kanal-Expression

2.4.1 Materialien und Substanzen

Material/Substanz/Kit	Bestellnummer	Hersteller
2,3-Butandion-Monoxim (BDM)	B0753	Sigma-Aldrich
CM-Fetales Kälberserum (FCS)	10099141	Life technologies
Dinatriumphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)	30412	Sigma-Aldrich
Glucose BioXtra	G7528	Sigma-Aldrich
Heparin- Na^+ 5.000 I.E.	PZN 3170642	Ratiopharm
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	H3375	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid (KCl)	P5405	Sigma-Aldrich
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO_3)	60339	Sigma-Aldrich
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	5655	Sigma-Aldrich
Kalziumchlorid (CaCl_2)	S5886	Sigma-Aldrich
Kollagenase Typ II (337 U/mg)	4176	Cell Systems
Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$)	63138	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	S5886	Sigma-Aldrich
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	S5761	Sigma-Aldrich
Phosphate buffered saline (PBS)	14190094	Life technologies
Perma-Hand Seide (5/0)	K880H	Ethicon
Phenolrot	P5530	Sigma-Aldrich
Sterilfilter (Nalgene 0,2 μm , 150 ml)	10762732	Thermo Scientific
Sterilfilter (Nalgene 0,2 μm , 500 ml)	10578471	Thermo Scientific
Taurin	T0625	Sigma-Aldrich
Trypsin (10x)	15090046	Life technologies
Zellsieb (100 μm)	352360	BD Bioscience

2.4.2 Puffer und Lösungen

Perfusionspuffer (Stock)	
HEPES	4,766 g
KCl	0,700 g
KHCO ₃	2,020 g
KH ₂ PO ₄	0,164 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,600 g
NaCl	13,2 g
NaHCO ₃	2,020 g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	0,214 g
Phenolrot	0,024 g
Taurin	0,0075 g
dH ₂ O	ad 2000 ml
▶ steril filtrieren	

Stopplösung 1	
Perfusionspuffer pH 7,46	54 ml
FCS (100 %)	6 ml
CaCl ₂ (10 mM)	75 µl
▶ steril filtrieren	

Perfusionspuffer pH 7,46	
Perfusionspuffer (Stock)	1960 ml
BDM (500mM)	40 ml
Glucose	2 g
▶ auf pH 7,46 einstellen	
▶ steril filtrieren	

Digestionspuffer	
Perfusionspuffer pH 7,46	900 ml
Trypsin (10x)	5 ml
CaCl ₂ (100 mM)	112,5 µl
▶ steril filtrieren	
▶ Kollagenase Typ II	15 mg

Stopplösung 2	
Perfusionspuffer pH 7,46	171 ml
FCS (100 %)	9 ml
CaCl ₂ (10 mM)	225 µl
▶ steril filtrieren	

2.4.3 Kardiomyozytenisolation

Die Isolation von Kardiomyozyten aus dem Gesamtherz dient für gewöhnlich der Kultivierung dieser Zellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Kardiomyozyten isoliert, um die Spezifität der verwendeten α MHC-Cre-Rekombinase, die zur Generierung der Kardiomyozyten-spezifischen Knockoutmodelle (siehe Abschnitt 2.2.2.2) verwendet wurde, zu verifizieren.

In einem ersten Schritt wurden die vorbereiteten Lösungen Digestionspuffer, Perfusionspuffer (pH 7,46), Stopplösungen 1 und 2 (Herstellung siehe Abschnitt 2.4.2), sowie 1x PBS bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Die Langendorff-Perfusionsanlage wurde mit dem Perfusionspuffer gespült. Dabei wurde der angeschlossene Rückflusskühler so temperiert, dass das Perfusat eine Temperatur von 37°C erreichte. Im nächsten Schritt wurde die Maus durch eine intraperitoneale Injektion heparinisiert (40 I.E Heparin-Na⁺ in 200 µl steriler 0,9 %iger NaCl-Lösung). Nach 10 min wurde das Tier mittels zervikaler Dislokation getötet und das Herz entnommen. Das Herz wurde in 37°C temperierten 1x PBS freipräpariert, dann über die Aorta auf eine Kanüle aufgezo- gen und mit einem Faden fixiert. Die Kanüle wurde sofort an die Langendorffapparatur angeschlossen und das Herz für 4 min bei einer Pumprate von 2,5 ml/min für 4 min

gespült. Von dem Digestionspuffer wurden 2,5 ml abgenommen und die restliche Lösung mit 15 mg Kollagenase II versetzt (siehe Abschnitt 2.4.2). Mit dieser Lösung wurde nun das Herz für weitere 17,5 min durchspült. Anschließend wurde das verdaute Herz abgenommen und die Aorta, die Vorhöfe und sonstiges Gewebe entfernt. In den zuvor abgenommenen 2,5 ml Digestionspuffer wurde das Herz mit einer spitzen Schere in kleine Stücke gezupft. Die kleinen Gewebestücke wurden für insgesamt 3 min zuerst mit einer 2 ml, dann mit einer 5 ml Stripette langsam resuspendiert, dass eine möglichst homogene Suspension entstand. Die Kardiomyozytensuspension wurde durch einen Zellsieb mit 100 µm Porendurchmesser in ein konisches Zentrifugenröhrchen überführt. Mit 2,7 ml der Stopplösung 1 wurde das vorherige Gefäß nochmals ausgespült und die neu entstandene Suspension auf das Zellsieb gegeben. Die gesiebte Suspension wurde erneut mit einer Stripette für 3 min resuspendiert und dann für 10 min stengelassen, damit sich die Kardiomyozyten von den übrigen zellulären Bestandteilen der Suspension absetzen. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues konisches Zentrifugenröhrchen überführt, das entstandene Pellet 1 wurde behalten. Der abgenommene Überstand wurde bei 1000 U/min für 1 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der neue Überstand abgenommen und verworfen. Das 2. Pellet wurde in 2 ml Stopplösung 2 resuspendiert und mit Pellet 1 vereinigt. Nachdem unter dem Mikroskop verifiziert wurde, dass es sich um eine reine Kardiomyozytenkultur handelte, wurden die isolierten Kardiomyozyten bis zur DNA-Isolation auf Eis gelagert.

2.4.4 DNA-Isolation aus Kardiomyozyten und Geweben

Neben den Kardiomyozyten wurden auch Aorta, Gehirn, Glattmuskelzellen, Leber, weißes Fettgewebe, sowie Atrium und Ventrikel auf ihre Cre-regulierte BK-Kanal-Expression untersucht. Hierfür wurden diese Gewebe den Tieren entnommen und analog zur Schwanzspitzenbiopsie in 200 µl Lysepuffer über Nacht bei 55°C / 500 U/min inkubiert. Die isolierten Kardiomyozyten wurden hierfür erneut für 1 min / 1000 U/min zentrifugiert und das entstandene Pellet wurde in dem Lysepuffer resuspendiert. Die weitere Isolation erfolgte wie unter Abschnitt 2.3.4 beschrieben. Die Gewebe aus Gehirn, Leber, weißem Fett, Glattmuskel und Ventrikel wurden in jeweils 200 µl Elutionspuffer aufgenommen, wohingegen die Gewebe aus Aorta und Atrium, sowie die isolierten Kardiomyozyten in jeweils 100 µl eluiert wurden. Mithilfe eines Nanophotometers wurde anschließend die DNA-Konzentration bestimmt und mit Elutionspuffer aus dem High Pure PCR Preparation Kit (siehe Abschnitt 2.3.1) auf eine Konzentration von 10 ng/µl eingestellt. Für die Durchführung der PCR und der Gelelektrophorese siehe Abschnitte 2.3.5 und 2.3.6.

2.5 *In-vivo*-Mausmodelle

2.5.1 Material und Substanzen

Material/Substanz/Kit	Bestellnummer	Hersteller
2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)	93140	Sigma-Aldrich
Acetonitril, LC-MS	34967	Sigma-Aldrich
Ameisensäure	94318	Sigma-Aldrich
Ampuwa (Aqua ad iniectabilia)	PZN 2159615	Fresenius Kabi
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	PZN 1578681	Bayer
Blutdruckkatheter	TA11PA-C10	DataScience Int.
Cinaciguat	HY-14181	MedChemExpress
Cleanisept-Desinfektionstücher	PZN 1885992	Schumacher GmbH
d ₁₅ -MitoB		<i>Dr. M. Murphy, Cambridge, UK</i>
d ₁₅ -MitoP		<i>Dr. M. Murphy, Cambridge, UK</i>
Dimethylsulfoxid (DMSO)	D2650	Sigma-Aldrich
Enthaarungscreme (Veet for men)	PZN 4916836	Reckitt Benckiser
Ethanol, absolut	32205	Sigma-Aldrich
Evans Blue (C.I. 23860)	A4388	AppliChem
Formaldehydlösung (35 %)	4979.1	Carl Roth
Gewebeklebeband (Leukosilk)	PZN 0397109	BSN Medical GmbH
Glutaraldehyd (25 %)	3778.1	Carl Roth
Intubationskanüle	73-2839	Harvard Apparatus
Isofluran CP	798-932	cp-pharma
Kanülen 20G, 0,9x40 mm	301300	BD Bioscience
Kanülen 25G, 0,5x16 mm	4658302	B Braun
Kanülen 27G, 0,4x19 mm	302200	BD Bioscience
Ketamin-ratiopharm 100 mg O.K.	PZN 7538837	Ratiopharm
Kunststoffröhrchen	Gel 20P	Art
N _ω -Nitro-L-Arginin-Methylester-Hydrochlorid (L-NAME)	80210	Cayman Chemical
Metamizol-Na ⁺	PZN 7387887	1a-Pharma
MitoB		<i>Dr. M. Murphy, Cambridge, UK</i>
MitoP		<i>Dr. M. Murphy, Cambridge, UK</i>
NaCl, isoton 0,9 %	PZN 02159621	Fresenius Kabi
Nahtmaterial (Ethibond Excel) 6-0	6697H	Ethicon
Nahtmaterial (Ethilon) 8-0	2808G	Ethicon
Nahtmaterial (Perma Hand Seide) 5-0	K880H	Ethicon
Nahtmaterial (Prolene) 7-0	EH7813E	Ethicon
NS11021	SML0622	Sigma-Aldrich
Objektträger Menzel Gläser	J2800AMNZ	Thermo Scientific
Octenisept	PZN 07463832	Schülke
Paxilline	P2928	Sigma-Aldrich
PBS	14190094	Life technologies
Pehazell	PZN 03545941	Paul Hartmann AG
Pentobarbital-Natrium (Narcoren)	PZN 11336163	Merial GmbH
Polyethylenschlauch	800/100/140	Smiths Medical
PreCelly-Tubes	431-0170	VWR
Rasierklinge Wilkinson sword	classic	Wilkinson
Resorba-Seide 7/0	R101	Resorba
Riociguat	HY-14779	MedChemExpress
Sildenafilcitrat	82714520	Molekula
Silikonschlauch, 1,5x1x3,5 mm	15828	Eur. Pharm.
Sterilfilter Millex-GV, 0,22 µm	SLGV004SL	Merck
Tadalafil	88434289	Molekula

MATERIAL UND METHODEN

Tergazyme	Z273287	Sigma-Aldrich
Ultraschallkontaktgel	4011	Sonogel
Wasser, LC-MS	39253	Sigma-Aldrich
Wattestäbchen	PZN 6141575	Heinz Herenz Med.
Xylazin (Rompun 2 %)	PZN 1320422	Bayer

OP-Besteck	Bestellnummer	Hersteller
Bulldogklemme (Bulldog Serrefine)	18050-35	FST
Elektrokoagulator (Low Cost Cautery Kit)	18010-00	FST
Gefäßklemme (Micro Serrefine)	18052-01	FST
Katheterhalter (Vessel Cannulation Forceps)	00608-11	FST
Nadelhalter (Castroviejo Micro Needle Holder)	12060-01	FST
Nadelhalter (Castroviejo Needle Holder)	12565-14	FST
Nadelhalter mit Schere (OlsenHegar)	12002-12	FST
Pinzette (Graefe Forceps, Tips Curved)	11152-10	FST
Pinzette (Graefe Forceps, Tips Slight Curve)	11151-10	FST
Pinzette (Vessel dilating forceps angeled 45°)	00276-13	FST
Pinzette (Vessel dilating forceps)	18153-11	FST
Schere (Vannas-Tübingen Spring Scissors)	15003-08	FST
Schere, extrafein (Extra Fine Bonn Scissors)	14084-08	FST

2.5.2 Puffer und Lösungen

1 % Evans Blue-Lösung	
Evans Blue	400 mg
0,9%ige NaCl-Lösung	40 ml

1 % TTC-Lösung	
TTC	25 mg
1x PBS	2,5 ml

16 % Ketamin/ 2,5 % Xylazin-Lösung	
Ketamin	2,0 ml
Xylazin	312,5 l
Aqua ad iniectabilia	ad 12,5 ml

Puffer 1 (MitoB)	
Acetonitril	30 ml
Ameisensäure	50 l
Wasser, LC-MS	19,95 ml

1 % TergazymLosung	
Tergazym	300 mg
dH ₂ O	40 ml

2 % Glutaraldehydlösung	
Glutaraldehyd (25 %)	2 ml
dH ₂ O	23 ml

Alle weiteren Verdünnungen von pharmakologischen Substanzen sind zusammen mit ihrer Applikationsart im Kontext ihrer jeweiligen Verwendung beschrieben.

2.5.3 *In-situ*-Modell des akuten Myokardinfarkts

Als Grundlage für die Etablierung des akuten Myokardinfarkts im Mausmodell wurde das bereits mehrfach in der Literatur beschriebene *in-situ*-Infarktmodell der Ischämie und

Reperfusion (I/R, Abbildung 20, ①) (Schwanke et al. 2002, Eckle et al. 2006, Methner et al. 2013b) verwendet und modifiziert. Da der Verlauf eines Myokardinfarkts nicht allein von der genetischen Beschaffenheit und der Funktion des Herzens abhängt, sondern vielmehr von einem komplexen Zusammenspiel vieler physiologischer Faktoren beeinflusst wird, ist es von entscheidendem Vorteil, gesunde oder I/R-stimulierte Herzen in ihrer (patho-)/physiologischen Umgebung, d.h. in einem *in-vivo*-Modell zu betrachten.

In Abbildung 15 ist der zeitliche Ablauf der Operation dargestellt. Die unter den Abschnitten 2.5.3.1-5 detailliert beschriebene Versuchsdurchführung wurde bei allen Versuchskohorten durchgeführt, mit Ausnahme der scheinoperierten Gruppe (Abbildung 20, ②), bei der die Okklusion der linken absteigenden Koronararterie (LCA) unterlassen wurde. Die Operationen wurden an globalen BK^{-/-}, SMBK^{-fl}, CMBK^{-fl} und CMsGC^{-fl} sowie an den entsprechenden Wurfgeschwisterkontrolltieren durchgeführt.

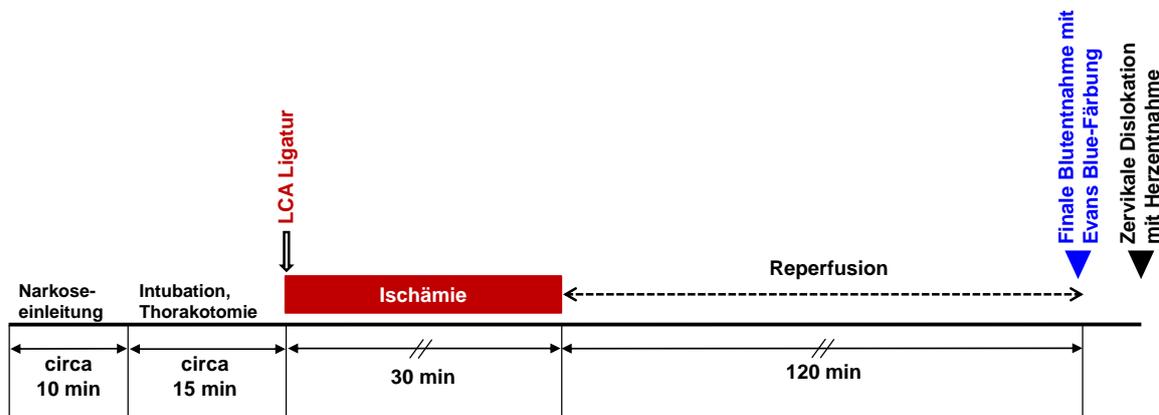


Abbildung 15: Zeitlicher Ablauf der Operation des akuten Myokardinfarkts (I/R)
LCA: linke Koronararterie

2.5.3.1 Anästhesie

Die Betäubung erfolgte mittels intraperitonealer Gabe von Pentobarbital-Natrium. Hierfür wurde das Fertigarzneimittel Narcoren® (16g/100ml) in einer 1 ml-Spritze direkt vor dem Gebrauch mit steriler 0,9%iger NaCl-Lösung 1:8 auf eine Konzentration von 20 mg/ml verdünnt. Die intraperitoneale Injektion erfolgte mittels einer 27G Kanüle in einer Dosierung von 70 mg pro kg Körpergewicht (Eckle et al. 2006, Methner et al. 2013b). Die Durchführung der intraperitonealen Injektion ist unter Abschnitt 2.5.3.7 beschrieben. Für die Überwachung der Anästhesietiefe wurden über die gesamte Dauer des Versuchs in regelmäßigen Abständen die Zwischenzehen- sowie die Lidreflexe kontrolliert, welche im chirurgischen Toleranzstadium ausgeschaltet sind. Wurde ein Abflachen der Narkosetiefe bemerkt, meist nach ca. 60 min Reperfusion, wurde in einer Dosierung von 10 mg·kg⁻¹·h⁻¹ (Eckle et al. 2006) nachdosiert.

2.5.3.2 Intubation

Sobald die Maus keine Reflexe mehr zwischen den Zehen bzw. am Auge aufzeigte, wurde sie vorsichtig in Rückenlage auf eine Heizplatte (ML295/M Homeothermic Controller and Plate) gelegt und die Vorder- und Hinterfüße wurden mit Gewebeklebeband (Leukosilk) fixiert. Die Temperatur der Heizplatte wurde mittels der dazugehörigen Rektalthermometersonde, welche mit der Heizplatte verbunden war, geregelt. Diese wurde eingeführt und ebenfalls mit Gewebeklebeband in Position gehalten. Die Körpertemperatur der Tiere wurde konstant auf $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ gehalten, wodurch ein Auskühlen der Versuchstiere nach Eintritt der Narkose verhindert wurde.

Für die Intubation wurde mit einer feinen Schere (Extra Fine Bonn Scissors, FST) ein ca. 1 cm langer medianer Hautschnitt am Hals längs gesetzt. Um die Trachea freizulegen wurden die sich in der *Regio trachealis* befindenden Muskeln (*Musculus sternohyoideus* et *musculus sternethyoideus* usw.) vorsichtig zu beiden Seiten gespreizt bzw. wenn notwendig durchtrennt. Dieser Vorgang erlaubte anschließend die Visualisierung des richtigen Platzierens der Intubationskanüle (Abbildung 16A, ①). Hierfür wurde eine Schleife aus dünner Perma Hand Seide 5-0 um die oberen Schneidezähne gelegt. Durch das Fixieren der Seide mit Gewebeklebeband wurde die Maus in leicht überstreckte Rückenlage gebracht. Mit einer atraumatischen Pinzette wurde die Zunge behutsam zur Seite gezogen und die Intubationskanüle vorsichtig in einem Winkel von ca. 45 Grad durch den Larynx in die Trachea eingeführt. Durch das Freilegen der Trachea war die Position der Kanüle gut sichtbar und diese konnte optimal ausgerichtet und mit Gewebeklebeband fixiert werden (Abbildung 16D). Die Beatmung erfolgte mit 100 % Sauerstoff mittels eines Ventilators für kleine Nagetiere (MiniVent Typ 845, HSE, Abbildung 16A, ②). Die Atemfrequenz wurde auf 110 Atemzüge pro Minute eingestellt (Schmidt et al. 2010). Die Einstellung des richtigen Inspirationsvolumens wurde über den Druck auf zwei Schlauchstücke bei 10 cm Wassersäule, welche jeweils mit dem Ventilator verbunden waren, kontrolliert (Inspirationsdruck 10 mbar (③), Expirationsdruck 3 mbar (④); (Schmidt et al. 2010)) und betrug je nach Größe der Maus zwischen 125-200 μl (Abbildung 16A). Die richtige Position der Intubationskanüle war während der kontrollierten Atmung insbesondere durch das rhythmische Heben und Senken des Brustkorbes erkennbar.

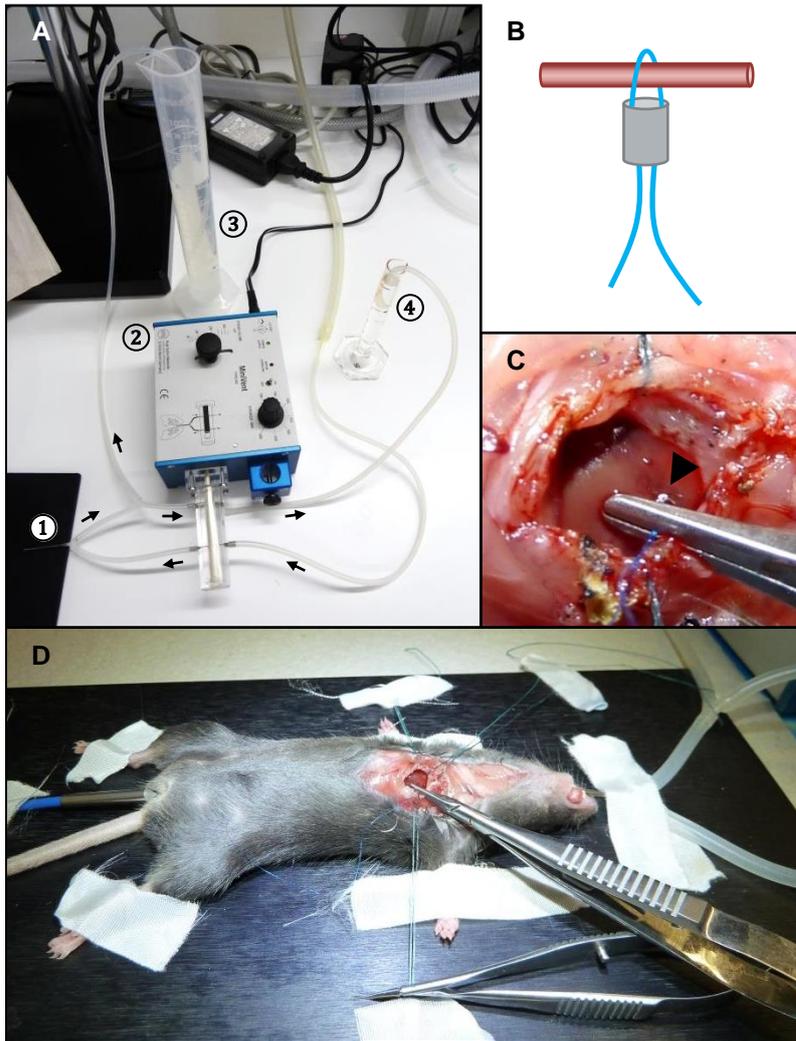


Abbildung 16: Durchführung des akuten Myokardinfarktmodells

(A) Aufbau der Beatmung mit der Intubationskanüle (1), dem Ventilator (2) und den zwei mit Wasser gefüllten Messzylindern zur Kontrolle des Inspirations- (3) und Expirationsdrucks (4). (B) Schematische Darstellung der Okklusion der LCA durch das Umstechen und Abdrücken der LCA mithilfe eines Polypropylenfadens (Prolene 7-0) und eines Kunststoffröhrchens. (C) Murines Herz während der Ischämie. Entfärbung des vom Infarkt betroffenen Gewebes, links der Ligatur (schwarzer Pfeilkopf). (D) Darstellung des Operationsplatzes während der 30-minütigen ischämischen Phase. LCA: linke Koronararterie

2.5.3.3 Ligatur der LCA und Reperfusion

Die Operation wurde mithilfe eines Stereomikroskops (LEICA M80) durchgeführt. Für die Thorakotomie wurde der für die Intubation gesetzte Hautschnitt am Sternum entlang verlängert und mithilfe zweier Pinzetten (Graefe Forceps, FST) die *Regio costalis* auf der linken Seite von Fell befreit. Mit einem Elektrokoagulator (Low Cost Cautery Kit, FST) wurden der große Brustmuskel (*Musculus pectoralis*) nach rechts und der darunterliegende, kleinere Brustmuskel nach links aufgetrennt. Punktuell wurde mit dem Koagulator interkostal (zwischen der dritten und vierten Rippe) ein kleiner Zugang zur Pleurahöhle gesetzt. Ein stumpfer Pinzettenarm wurde vorsichtig durch das Loch geführt und der Thorax mit dem Interkostalgewebe leicht angehoben. Mithilfe des Koagulators wurden die vierte und fünfte Rippe vorsichtig durchtrennt und somit der Thorax einseitig weiter eröffnet. Für die Thorakotomie wurde ein Koagulator verwendet, damit bei entstehenden Mikroblutungen alle Gefäße sofort wieder verschlossen werden konnten. Mit zwei Fäden aus Polyester (Ethibond Excel 6-0) wurden die aufgetrennten Rippenbögen leicht aufgespannt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass weder Blutgefäße

noch die Lunge verletzt wurden. Mit einer stumpfen Pinzette wurde das Perikard leicht angehoben und dadurch das Herz behutsam in die richtige Position gedreht, so dass die LCA gut sichtbar wurde. Die Okklusion wurde mithilfe eines Polypropylenfadens (Prolene 7-0) und einem ca. 1 mm breiten Stück eines Kunststoffröhrchens (Gel 20P, Art) durchgeführt. Hierfür wurde der Faden ein erstes Mal durch das Kunststoffröhrchen gefädelt, die LCA wurde umstochen und der Faden wurde ein weiteres Mal durch das Kunststoffröhrchen geführt (Abbildung 16B). Das Kunststoffröhrchen wurde nun fest auf die LCA gedrückt und mit einem Nadelhalter (Castroviejo Micro Needle Holder, FST) in Position gehalten. Die durch den LCA-Verschluss verursachte Ischämie war durch einen Wechsel der Herzfarbe von rot nach weiß erkennbar und wurde für 30 min aufrechterhalten (Abbildung 16C+D). Nach der Ischämiephase wurden der Nadelhalter und das Kunststoffröhrchen entfernt. Die erneute Durchblutung der Arterie war durch die wiederkehrende Rotfärbung des Herzens zu beobachten. Der geöffnete Thorax und die freigelegte Trachea wurden sowohl während der 30 min Ischämie als auch während der 120 min andauernden Reperfusionphase mit steriler 0,9%iger NaCl-Lösung befeuchteten Zellstoff (Pehazell, Hartmann) abgedeckt um eine Austrocknung zu verhindern. Um die Temperatur noch besser konstant zu halten, wurde die Maus mit einer aus Alufolie geformten Schutzhülle bedeckt. Für die Untersuchungen zur Proteinexpression (siehe Abschnitt 2.7.3) und ROS-Produktion (siehe Abschnitt 2.5.6) wurden die Herzen zum Teil bereits nach 10- bzw. 15-minütiger Reperfusionphase direkt entnommen. Während der gesamten Versuchsdauer war die Maus unter ständiger Beobachtung.

2.5.3.4 Blutentnahme aus der *Aorta abdominalis*

Um bekannte Myokardinfarktmarker wie beispielsweise kardiales Troponin im Serum nachweisen zu können, wurde im Anschluss an die Reperfusionphase (siehe Abschnitt 2.5.3.3) das Abdomen des Versuchstieres mit einer feinen Dissektionsschere eröffnet und die *Aorta abdominalis* freigelegt. Die Blutentnahme wurde mittels einer 25G Kanüle auf einer 1 ml-Spritze durchgeführt. Das entnommene Blut wurde sofort in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und für 30 min bei 4°C gelagert. Im Anschluss wurde das Reaktionsgefäß bei 4°C, 4000 U/min für 15 min zentrifugiert und daraufhin das klare Serum, welches sich nun im Überstand befand, abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2.5.3.5 Färbung des Herzens mit Evans Blue und TTC

Direkt nach der Blutentnahme sollte das Ausmaß des I/R-Schadens bestimmt werden. Hierfür wurde im ersten Färbeschritt das Herz retrograd über die Aorta mit Evans Blue-Lösung (Herstellung siehe Abschnitt 2.5.2) gespült. Die Evans Blue-Färbung ermöglicht

eine Unterscheidung zwischen Herzgewebe, welches sich blau färbt, da es sich oberhalb der Ligatur befindet und nicht von dem Infarkt betroffen war, und dem eigentlichen Risikoareal, welches von der ligierten LCA versorgt wird. Die anschließende Inkubation der Herzscheiben in 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)-Lösung ermöglicht außerdem die Differenzierung von infarziertem, nekrotischem Gewebe und dem Teil des Risikoareals, der vom Infarkt betroffen war, aber überlebt hat (Abbildung 17). Das TTC zählt strukturell zu den Redoxfarbstoffen und besitzt ein Tetrazolium-Kation, welches in vitalem Gewebe von Dehydrogenasen der Atmungskette (v.a. Komplex I) zu rotem Formazan reduziert wird (Rich et al. 2001).

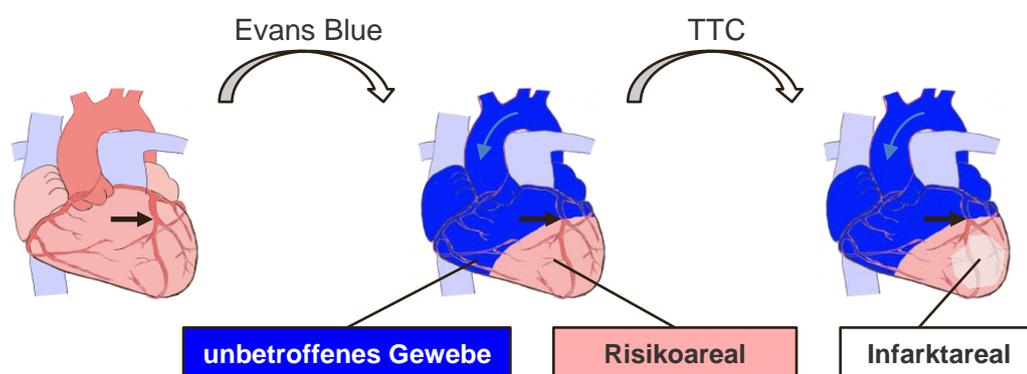


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Färbung mit Evans Blue und TTC

Die Evans Blue-Färbung erlaubt im ersten Schritt die Unterscheidung zwischen vom Myokardinfarkt unbetroffenem, vitalem Gewebe und dem Risikoareal. Die Inkubation in TTC-Lösung ermöglicht im zweiten Schritt das infarzierte, nekrotische Gewebe vom Risikoareal zu differenzieren. *schwarzer Pfeil*: Ligaturstelle; *hellblauer Pfeil*: Flussrichtung des Evans Blue; *TTC*: 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid.

Der Brustraum wurde hierfür ein weiteres Stück eröffnet und mithilfe der bereits verwendeten Polyesterfäden (siehe Abschnitt 2.5.3.3) weiter aufgespannt. Die thorakale Aorta wurde freigelegt, indem sie mithilfe einer Pinzette von Fett befreit und von der Wirbelsäule abgehoben wurde. Als nächstes wurde ein kurzes Stück dünner Faden (Perma Hand Seide 5-0) locker um die Aorta geknotet. Dieser Faden diente der späteren Fixierung des Katheters. Anschließend wurde die Aorta längsseitig vorsichtig mit einer Schere (Vannas-Tübingen Spring Scissors, FST) eröffnet. Ein Polyethylenschlauch (Innendurchmesser 0,4 mm, Außendurchmesser 0,8 mm) mit abgeschrägter Spitze wurde zur Katheterisierung der Aorta verwendet. Das andere Ende des Katheters wurde auf einer 25G Kanüle fixiert. Der Katheter wurde über die Punktion in das Lumen der Aorta eingeführt und mithilfe des vorbereiteten Haltefadens festgeknotet. Im ersten Schritt wurden die Aorta und die Koronargefäße durch eine retrograde Injektion mit steriler 0,9%iger NaCl-Lösung gespült (Abbildung 18A). Anschließend wurde der Polypropylenfaden, mit welchem die Ischämie verursacht wurde (siehe Abschnitt 2.5.3.3), fest zugeknotet um die LCA erneut zu verschließen. Nach dem LCA-Verschluss erfolgte

die Spülung des nicht betroffenen Gewebes mit Evans Blue-Lösung bis zur Blaufärbung (Abbildung 18B). Nach zervikaler Dislokation wurde das Herz entnommen, gewogen und zur weiteren Analytik für 20 min bei -20°C weggefroren (Abbildung 18C).

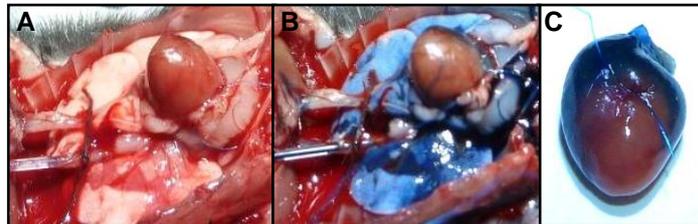
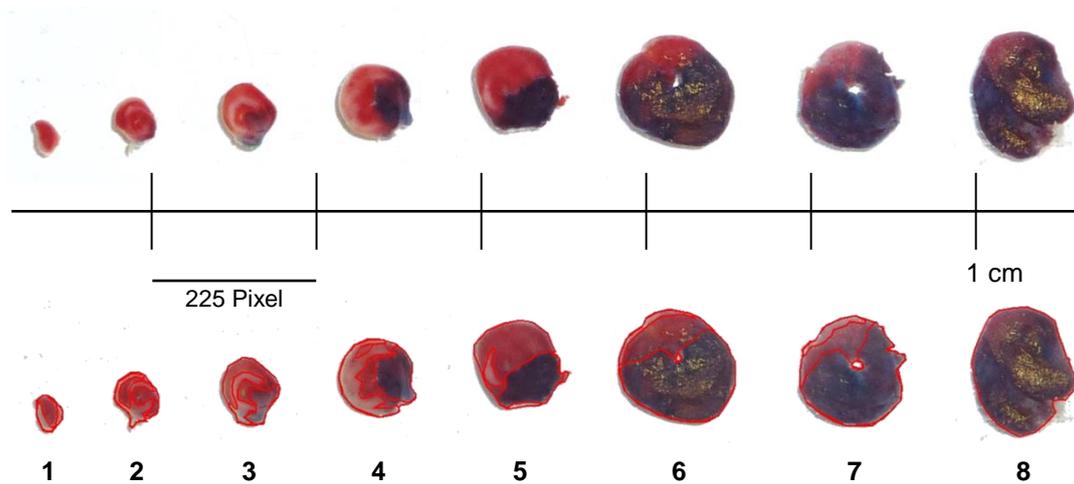


Abbildung 18: Evans Blue-Färbung im akuten Myokardinfarktmodell

(A) Weitere Eröffnung des Brustkorbs und retrograde Einführung des mit 0,9%iger NaCl-Lösung gefüllten Katheters in die Aorta. (B) Erneute Ligatur der LCA und Injektion der Evans Blue-Lösung über den Katheter, keine Blaufärbung des vom Infarkt betroffenen kardialen Gewebes. (C) Herz nach I/R und Evans Blue-Färbung. Risikoareal und blaugefärbte unbetreffene Herzmuskelareale sind gut unterscheidbar. LCA: linke Koronararterie

Das gefrorene Herz wurde zügig mit einer Rasierklinge in 1 mm dicke Scheiben geschnitten, welche in 37°C vorgewärmter TTC-Lösung (Herstellung siehe Abschnitt 2.5.2) auf dem Schüttler bei 37°C und 350 U/min für 30 min inkubiert wurden. Im Anschluss wurden die Herzscheiben der Reihe nach, mit der apikalen Seite nach unten auf einem Objektträger platziert. Ein zweiter Objektträger wurde von oben aufgelegt. Zur Fixierung der Herzscheiben wurden die beiden Objektträger mit Parafilm umwickelt. Nach einer 24-stündigen Inkubation in 10 % Formaldehydlösung bei RT erfolgte die Auswertung der Infarktareale. Hierfür wurden die Herzscheiben der Reihe nach in einer Petrischale, welche ca. 2-3 mm mit Wasser gefüllt war, platziert. Die Dokumentation erfolgte mit einer Panasonic Lumix TZ8. Für die Größenbestimmung wurde ein Maßstab bei identischer Vergrößerung mitfotografiert. Die Größe der einzelnen Bereiche wurde mithilfe der Software AxioVision Rel 4.8.1.0 planimetrisch für jede Herzscheibe einzeln bestimmt (Abbildung 19). Durch Addition der Einzelwerte bis hin zur Ligatur (*hier*: Scheibe 7) wurde für jedes Herz das Risikoareal in % zur Gesamtfläche (*hier*: 53,37 %) sowie die Infarktgröße in % zum Risikoareal (*hier*: 27,31 %) berechnet. Die Ermittlung der Absolutwerte erfolgte durch Umrechnung der Pixel in cm mithilfe des Maßstabbalkens. Die Auswertung wurde verblindet, indem die Herzscheiben einer Versuchskohorte von einer zweiten, unabhängigen Person kodiert wurden. Die Zuordnung der Infarkt- und Risikoareale zu den Genotypen und Setups erfolgte erst am Ende der Auswertung.



Herzscheibe	1	2	3	4	5	6	7	8
Gesamtfläche	1269,0	2943,5	4986,0	8342,0	10610,0	18146,5	15815,5	17644,5
Vitales Gewebe (blau)	0	185,5	781,5	2880,5	3267,0	11937,0	9913,5	17644,5
Risikoareal (rot+weiß)	1269,0	2758,0	4204,5	5461,5	7343,0	6209,5	5902,0	0
Infarktareal (weiß)	549,0	1419,5	1237,0	3463,5	590,5	859,0	934,5	0

Abbildung 19: Planimetrische Auswertung des Risikoareals und der Infarktgröße

Exemplarische Darstellung von Herzscheiben einer CMBK-Kontrollmaus nach I/R. Die Auswertung erfolgte durch planimetrische Bestimmung der Gesamtfläche, des unbetroffenen blaugefärbten Gewebes, des Risikoareals (rot+weiß) und des infarzierten, weißen Bereichs (Darstellung in Pixel). Für die Berechnung der Infarktgröße und des Risikoareals wurden die Herzscheiben distal der Ligatur (*hier: 1-7*) miteinbezogen.

2.5.3.6 Mechanische Konditionierung

In der Literatur ist mehrfach beschrieben, dass sowohl die mechanisch-induzierte Prä- als auch Postkonditionierung einen protektiven Einfluss beim akuten Myokardinfarkt im Tiermodell aufweisen (Schwanke et al. 2002, Costa et al. 2008, Jin et al. 2012). Hierfür wurde die LCA-Operation wie in den Abschnitten 2.5.3.1 bis 2.5.3.4 beschrieben durchgeführt und durch kurze ischämische Episoden vor der 30-minütigen Ischämiephase (iPre) bzw. danach (iPost) ergänzt.

Für die Präkonditionierung (Abbildung 20, ③) wurde die LCA wie in Abschnitt 2.5.3.3 beschrieben umstochen. Direkt vor der eigentlichen Ischämiephase wurde die Koronararterie für 5 min okkludiert. Daraufhin folgte eine 10-minütige Wiedereröffnung des Gefäßes (Schwanke et al. 2002), bei der der Nadelhalter, der auf die Koronararterie gedrückt war, wieder gelöst wurde. Anschließend erfolgten 30 min Ischämie (siehe Abschnitt 2.5.3.3) mit anschließender Reperfusion (120 min), Blutentnahme (siehe Abschnitt 2.5.3.4) und Färbung (siehe Abschnitt 2.5.3.5).

Bei der Postkonditionierung (Abbildung 20, ④) wurden direkt nach der ischämischen Phase sechs Zyklen mit jeweils 10 Sekunden Ischämie und 10 Sekunden Reperfusion durchgeführt (Methner et al. 2013b). Auch dies wurde durch das Wechselspiel zwischen Öffnen und Schließen der Koronararterie mithilfe des Kunststoffröhrchens erreicht. Die sechs Zyklen kurzer Ischämie und Reperfusion gingen direkt in die 120-minütige Reperusionsphase über, auf die die bereits dargestellten weiteren Versuchsschritte folgten.

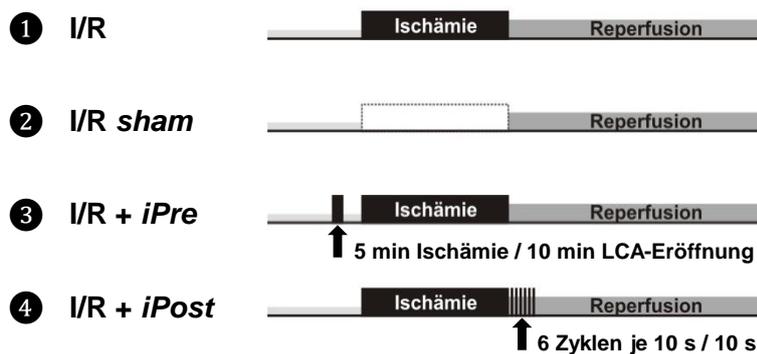


Abbildung 20: Operationsschemata für die mechanische Konditionierung im akuten Myokardinfarktmodell

I/R: 30 min Ischämie / 120 min Reperfusion; *I/R sham*: Scheinoperation; *iPost*: Postkonditionierung; *iPre*: Präkonditionierung; *LCA*: linke Koronararterie

2.5.3.7 Verabreichung pharmakologischer Substanzen

Pharmakologische Konditionierungen bilden die Grundlage für eine zukünftige Therapiemöglichkeit zur Reduktion des I/R-Schadens bei Myokardinfarkt. Die Gabe der im Folgenden beschriebenen Substanzen orientierte sich an bereits publizierten, d.h. etablierten Applikationsmethoden. Die Administrationen von NS11021 und L-NAME wurden modifiziert und an den Operationsablauf angepasst (siehe unten). In Kontrollexperimenten wurde das jeweilige Lösungsmittel ohne Wirkstoff auf dem entsprechenden Applikationsweg injiziert um damit seine potentiellen Einflüsse auf den I/R-Schaden untersuchen zu können. In Wasser schwerlösliche Substanzen wurden mit einer geringen Menge an DMSO in Lösung gebracht und im Folgenden mit steriler 0,9%ige NaCl-Lösung oder mit Wasser für Injektionszwecke (*Aqua ad iniectabilia*) auf die entsprechende Konzentration verdünnt. Eine Beschreibung zu den Kontrollexperimenten findet sich in den einzelnen Abschnitten der jeweiligen Substanz. Eine Übersicht über die durchgeführten pharmakologischen Konditionierungen mit Wirkstoffnamen, Dosierung und Applikationsroute ist in Abbildung 21 dargestellt.

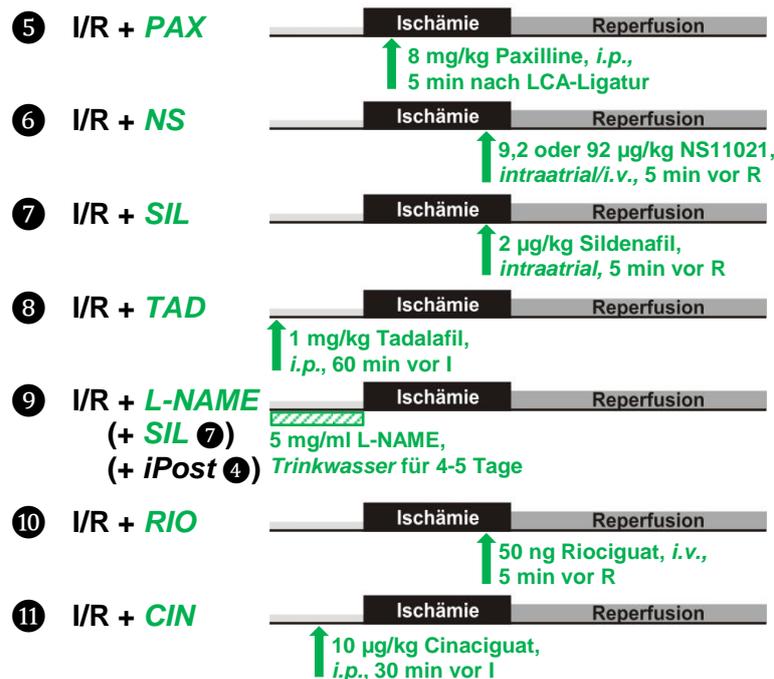


Abbildung 21: Operationsschemata für die Administrationen pharmakologischer Substanzen im akuten Myokardinfarktmodell

I/R: 30 min Ischämie / 120 min Reperfusion; PAX: Paxilline (BK-Kanalblocker); NS: NS11021 (BK-Kanalöffner); SIL: Sildenafil (PDE-Inhibitor); TAD: Tadalafil (PDE5-Inhibitor); L-NAME: N_ω-Nitro-L-Arginin-Methylester-Hydrochlorid (NO-Synthaseinhibitor); iPost: Postkonditionierung; RIO: Riociguat (sGC-Stimulator); CIN: Cinaciguat (sGC-Aktivator); LCA: linke Koronararterie

Paxilline (PAX, 5): Der BK-Kanalblocker Paxilline wurde 5 min nach dem Beginn der Ischämie in einer Konzentration von 3,2 mg/ml in einer Dosierung von 8 mg/kg intraperitoneal injiziert ((Imlach et al. 2008, Borchert et al. 2011, Lai et al. 2014), eigene Untersuchungen von Frau Friederike Steudel, Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und klinische Pharmazie, Universität Tübingen). Ausgehend von einem murinen Blutvolumen von 60 ml pro kg Körpergewicht (Wolfensohn and Lloyd 2003), entsprach diese Dosierung einer Konzentration von 306 µM bezogen auf das murine Blutvolumen ($M_w=435,6$ g/mol). Da Paxilline in wässrigen Lösungsmitteln nur schwer löslich ist, wurde als Lösungsmittel eine Mischung aus DMSO:H₂O (9:1) verwendet. Identische Mengen des DMSO:H₂O-Gemisches wurden in Kontrollkohorten (je 3 Tiere pro Genotyp) injiziert um sicherzugehen, dass der Einsatz von DMSO in dieser Konzentration nicht selbst einen Einfluss auf die Infarktgröße ausübt.

NS11021 (NS, 6): In der Literatur ist bisher nur sehr wenig über einen Einsatz des BK-Kanalöffners NS11021 *in vivo* und damit auch wenig über seine pharmakokinetischen und -dynamischen Eigenschaften bekannt. Die Substanz wurde, orientiert an den unveröffentlichten Daten des Herstellers in Zusammenarbeit mit dem Erfinder der Substanz Prof. Dr. Søren-Peter Oelsen (University of Copenhagen), sowie an der

veröffentlichten Arbeit von Bentzen et al. (2009), in Dosierungen von 9,2 µg/kg und 92 µg/kg Körpergewicht 5 min vor Beginn der Reperfusion appliziert. Diese Dosierungen entsprachen bei einem murinen Blutvolumen von 60 ml pro kg Körpergewicht (Wolfensohn and Lloyd 2003) Konzentrationen von 0,3 und 3,0 nM (bezogen auf das murine Blutvolumen, $M_w=511,3$ g/mol). Die Administration von NS11021 erfolgte im ersten Ansatz intravenös und in weiteren Ansätzen um entsprechend hohe Plasmaspiegel zu erhalten direkt in das linke Atrium. DMSO und sterile 0,9%ige NaCl-Lösung in einem Verhältnis von 1:150 wurden hierbei als Lösungsmittel verwendet und in dieser Konzentration auch in der Kontrollgruppe verwendet. Die Konzentrationen der Injektionslösungen betragen für die intravenöse Applikation 100 µmol/l und für die intraatriale (i.a.) Injektion 20 bzw. 200 µmol/l.

Sildenafil (SIL, 7): Der PDE5-Inhibitor Sildenafil wurde in steriler 0,9%iger NaCl-Lösung gelöst und in einer Dosis von 2 µg pro kg Körpergewicht 5 min vor Beginn der Reperfusion in das linke Atrium injiziert (Methner et al. 2013b). Diese Dosis entsprach einer Konzentration von 67 nM bezogen auf das murine Blutvolumen mit 60 ml pro kg Körpergewicht ((Wolfensohn and Lloyd 2003), $M_w=474,6$ g/mol). Die Applikation wurde durch intraatriale Injektion von steriler 0,9%iger NaCl-Lösung bei I/R in Wurfgeschwistermäusen der Behandlungskohorte kontrolliert.

Tadalafil (TAD, 8): Als alternativer PDE5-Inhibitor wurde Tadalafil nach Salloum et al. (2009) mit 1 mg pro kg Körpergewicht 60 min vor Beginn der ischämischen Phase intraperitoneal injiziert. Die Konzentration der Injektionslösung betrug hierbei 0,25 mg/ml. Als Lösungsmittel wurde hier 40 % DMSO/H₂O verwendet. Ein entsprechendes DMSO/H₂O-Gemisch wurde zu Kontrollzwecken appliziert.

L-NAME (9): Der NO-Synthaseinhibitor N_ω-Nitro-L-Arginin-Methylester-Hydrochlorid (L-NAME) wurde in einer Konzentration von 5 mg/ml dem Trinkwasser beigesetzt (modifiziert nach Groneberg et al. 2010 und Obst et al. 2006). Die Mäuse erhielten dieses Wasser für 4-5 Tage. Zu Beginn des 3. Tages wurde die Flasche erneuert, um möglichen Instabilitäten des Wirkstoffes in wässriger Lösung und damit Wirkungsverluste vorzubeugen.

Riociguat (RIO, 10): Riociguat wurde als Stimulator der löslichen Guanylatzyklase 5 min vor Beginn der Reperfusion in einem Volumina von 50 µl bei einer Konzentration von 1,2 µmol/l intravenös verabreicht (Methner et al. 2013a). Die Substanz konnte nach dem

Lösen in DMSO 1:2000 mit steriler 0,9%iger NaCl-Lösung verdünnt werden. Da die Injektion einer Mischung aus DMSO:H₂O (9:1) bereits keine Auswirkungen auf den I/R-Schaden zeigte (siehe **PAX**, ⑤), wurde hier auf eine eigenständige Kontrollgruppe, die nur das Lösungsmittel erhalten hätte, verzichtet.

Cinaciguat (CIN, ⑩): Als Aktivator der löslichen Guanylatzyklase wurde Cinaciguat in einer Konzentration von 2,5 µg/ml in einer Dosis von 10 µg/kg Körpergewicht 30 min vor Beginn der Ischämie intraperitoneal injiziert (Salloum et al. 2012). Es wurde ebenfalls auf die Lösungsmittelkontrollgruppe verzichtet, da auch hier das zum Lösen verwendete DMSO 1:400 mit steriler 0,9%iger Natriumchloridlösung verdünnt werden konnte und damit der DMSO-Anteil deutlich unter dem bei Paxilline (⑤) verwendeten Lösungsmittel lag.

Durchführung der Injektionen

Für die **intraperitoneale Applikation** wurde die Maus mit einem Nackengriff und an der Schwanzwurzel fixiert. Die Injektion der zu verabreichenden Lösung erfolgte über das Einführen einer 25G Kanüle in einem Winkel von ca. 30 Grad in die Bauchhöhle.

Die **intravenöse Injektion** von Substanzen wurde über das Legen eines Zugangs in eine der beiden großen Schwanzvenen durchgeführt. Hierbei wurde die Maus mit einer volatilen Isofluran-Inhalationsnarkose (0,5-2,0 %) narkotisiert und der Mausschwanz mehrere Minuten vor eine Wärmelampe gelegt, damit sich das Gefäß durch die Wärme weitete und besser sichtbar wurde. Als Zugang wurde die Hohlneedle einer 27G Kanüle verwendet, welche von der restlichen Kanüle abgetrennt und mit der abgetrennten Seite zur Hälfte in ein ca. 5 cm langes Stück des auch für die Färbung verwendeten Polyethylenschlauches (siehe Abschnitt 2.5.3.5) geschoben wurde. Das andere Ende des Schlauches wurde auf eine 25G Kanüle geschoben. Sobald die Vene gut erkennbar war, wurde ein Stück Faden fest um den Ansatz des Mausschwanzes geknotet und die Lampe entfernt. Von der Schwanzspitze an wurde das noch vorhandene Blut vorsichtig Richtung Schwanzansatz gepresst und ca. auf Höhe der Schwanzmitte wurde die Kanüle in Schwanzrichtung flach in die Vene eingeführt. Nachdem die richtige Position der Nadel überprüft wurde, wurde der Faden am Schwanzansatz aufgeschnitten und das entsprechende Volumen intravenös appliziert.

Die **Applikation ins linke Atrium** (intraatrial) erfolgte direkt mit einer 27G Kanüle flach ins linke Atrium der narkotisierten Maus, welches durch die bereits davor durchgeführte Thorakotomie gut zugänglich war.

2.5.4 Chronisches Model des Myokardinfarkts

Das chronische Modell des Myokardinfarkts bereitet die Möglichkeit Langzeitschäden und Überleben nach einem Myokardinfarkt genauer zu untersuchen. Hierfür wurde die LCA für 30 min okkludiert, gefolgt von einer vierwöchigen Reperfusionphase und anschließender Untersuchung der Herzens mittels Echokardiographie und Immunhistochemie. Der zeitliche Ablauf (Abbildung 22) sowie eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Schritte sind nachfolgend dargestellt.

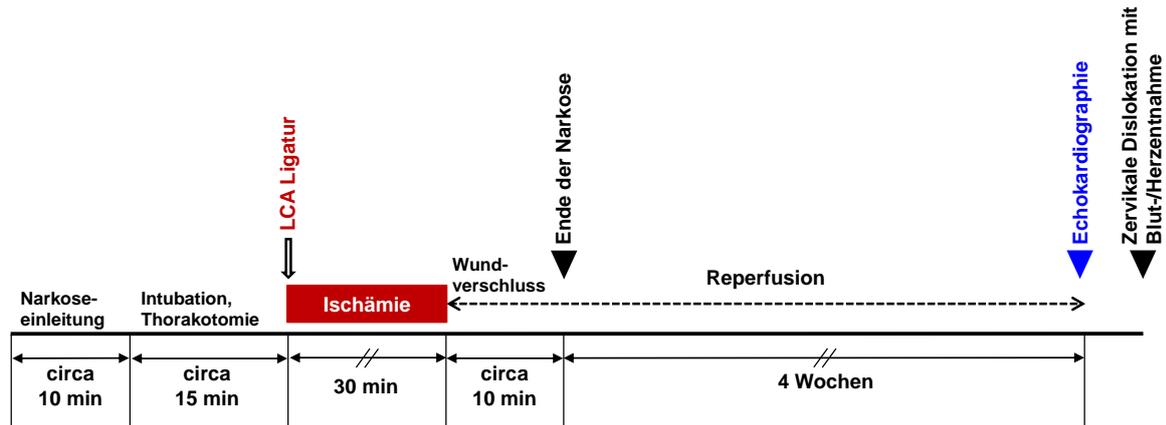


Abbildung 22: Zeitlicher Ablauf der Operation des chronischen Myokardinfarktmodells
LCA: linke Koronararterie

2.5.4.1 Anästhesie

Zu Beginn des Eingriffs erhielt die Maus eine intraperitoneale Injektion einer 16 % Ketamin/ 2,5 % Xylazin-Lösung (Herstellung siehe Abschnitt 2.5.2), die eine Analgesie für die Dauer des operativen Eingriffs sicherstellte. Sobald die Wirkung einsetzte, erfolgte eine Inhalationsnarkose bestehend aus einem Isofluran-Sauerstoff-Gemisch. Hiermit ist eine sehr gute Steuerung von Dauer und Tiefe der Narkose möglich. Als Anästhesieapparat wurde ein Narkosekreissystem (Völker GmbH) mit integriertem Ventilator und einem vorgeschalteten Vapor 19.3-Präzisionsverdampfer für Isofluran (Isoflurane CP 1ml/ml, cp-pharma) verwendet. Das Isofluran wurde über eine Maske der Maus appliziert, welche in Rückenlage auf einer Heizplatte mithilfe von Gewebeklebeband fixiert wurde. Die Maus wurde waagrecht zu dem Operateur mit dem Kopf nach rechts positioniert. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurde ein Isoflurananteil von 0,5-2,0 % verwendet und über die gesamte Dauer der Operation konstant gehalten. Für die Dauer des Eingriffes (ca. 60 min) wurde die Körpertemperatur der Maus über die Heizplatte konstant bei $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ gehalten. Die Körpertemperatur wurde dabei permanent mit einem Rektalthermometer überwacht, wodurch ein Auskühlen des narkotisierten Tieres verhindert werden konnte. Ein Austrocknen der Augen unter Narkose wurde durch das

Auftragen einer dünnen Schicht Dexpanthenol-haltiger Augensalbe (Bepanthen) verhindert.

2.5.4.2 Intubation

Nach Erreichen der erforderlichen Narkosetiefe (Aussetzen der Lid- und Zwischenzehreflexe) wurde der Maus im Brustbereich das Fell mit Enthaarungscreme großflächig entfernt. Die enthaarte Hautfläche wurde gründlich mit einem Antiseptikum (Octenisept) gereinigt. Für die Intubation wurde mit einer feinen Schere (Extra Fine Bonn Scissors, FST) ein ca. 1 cm langer medianer Hautschnitt am Hals längs gesetzt. Um die Trachea freizulegen wurden die sich in der Regio trachealis befindenden Speicheldrüsen und Muskeln (*Musculus sternohyoideus et musculus sternethyroideus* usw.) vorsichtig zu beiden Seiten so weit gespreizt, dass ein kleines Stück der Trachea sichtbar wurde, um im nächsten Schritt ein korrektes Platzieren der Intubationskanüle bestätigen zu können. Die darauffolgenden Schritte wurden sehr schnell ausgeführt, um ein Aufrechterhalten der Narkose gewährleisten zu können. Die Inhalationsmaske wurde ein Stück entfernt. Das Einführen der Intubationskanüle in die Trachea und die Beatmung wurden entsprechend wie unter Abschnitt 2.5.3.2 beschrieben durchgeführt. Lediglich die Atemfrequenz wurde im chronischen Modell auf 140 Atemzüge pro Minute leicht erhöht.

2.5.4.3 Ligatur der LCA

Die Operation wurde mithilfe eines Stereomikroskops (LEICA M80) durchgeführt. Für die Thorakotomie wurde ein ca. 2 cm langer Hautschnitt von der linken Achselhöhle Richtung Sternum gesetzt und mithilfe zweier Pinzetten (Graefe Forceps, FST) die *Regio costalis* auf der linken Seite vorsichtig von Fell befreit. Mit einer stumpfen Pinzette wurde der große Brustmuskel (*Musculus pectoralis*) leicht angehoben und mit einer zweiten stumpfen Pinzette vorsichtig der kleine Brustmuskel vom großen getrennt. Mithilfe zweier aus Draht geformter Retraktoren wurden dann sowohl der große Brustmuskel nach hinten/oben als auch der kleinere, darunterliegende Brustmuskel nach unten aufgespannt. Hierbei war darauf zu achten, dass die Muskeln nicht verletzt wurden. Im nächsten Schritt wurde mit einer spitzen Schere (Vannas-Tübingen Spring Scissors, FST) interkostal (zwischen der dritten und vierten Rippe) ein kleiner Schnitt zur Pleurahöhle gesetzt. Der Schnitt wurde vorsichtig nach oben und unten ein kleines Stück erweitert, jedoch nur so weit, dass weder Gefäße noch die Lunge verletzt wurden. Mit einer stumpfen Pinzette wurde die vierte Rippe vorsichtig leicht angehoben und ein steriler OP-Faden (Ethibond Excel 6-0) von rechts nach links durchgezogen. Analog wurde um die dritte Rippe ein Faden von rechts nach links durchgeführt. Die beiden Rippen wurden anschließend vorsichtig diagonal aufgespannt, in dem die Fäden mit Klebeband fixiert wurden. Wenn

möglich wurde der Schnitt nach oben und unten minimal erweitert. Dabei musste nach oben in Richtung Sternum vor allem auf die *Arteria thoracica interna* und nach unten in Richtung Flanke auf die Lunge geachtet werden. Die Okklusion der LCA und die ischämische Phase wurden wie im akuten Modell unter Abschnitt 2.5.3.3 detailliert beschrieben durchgeführt.

2.5.4.4 Eröffnung der LCA und Wundverschluss

Nach 30 min wurde der Nadelhalter entfernt und damit die Okklusion geöffnet. Der Polypropylenfaden wurde vorsichtig herausgezogen. Die Fäden, welche zum Aufspannen der Rippen verwendet worden waren, wurden gelöst. Der linke Faden um die vierte Rippe wurde entfernt und unterhalb des rechten Fadens unter der dritten und vierten Rippe von rechts nach links durchgezogen. Der rechte Faden wurde anschließend auch um die vierte Rippe geführt. Im nächsten Schritt wurden die dritte und vierte Rippe mit den beiden Fäden durch jeweils einen Doppel- und einen Einzelknoten fest zusammengeknotet. Hierbei wurde der Brustkorb vorsichtig nach unten gedrückt um die Luft aus dem Brustraum zu entfernen. Um zu überprüfen, ob der Thorax wieder luftdicht verschlossen war, wurden 2-3 Tropfen angewärmte sterile 0,9%ige NaCl-Lösung auf den zugeknoteten Schnitt getropft. Verblieb die NaCl-Lösung auf dem Schnitt und war keine Luftblasenbildung zu sehen, konnte von einem luftdichten Verschluss ausgegangen werden. Die Fadenenden wurden knapp abgeschnitten und die Retraktoren von den Brustmuskeln gelöst bevor diese wieder in ihre ursprüngliche Lage positioniert wurden. Um einen vollständigen Wundverschluss zu gewährleisten wurden bis zu 8 Einzelknopfnähte (Perma Hand Seide 5-0) gesetzt. Die Naht wurde mit steriler 0,9%iger NaCl-Lösung gereinigt und anschließend Octenisept zur Entzündungsprävention mit einem sterilen Tupfer aufgetragen. Analog wurde mit dem kleinen Hautschnitt über der Trachea verfahren.

2.5.4.5 Ausleitung der Narkose

Nach Beendigung der Operation wurde die Isofluranzufuhr gestoppt, die Intubation mit Sauerstoff blieb aber erhalten. Um den Flüssigkeitsverlust während der Operation auszugleichen, wurden der Maus 600 µl sterile, vorgewärmte 0,9%ige NaCl-Lösung intraperitoneal appliziert. Die Extremitäten wurden vom Klebeband gelöst. Die Beatmung wurde so lange beibehalten bis die Maus selbstständig anfangen gegen die Intubation zu atmen. Ein zu frühes Herausziehen der Intubationskanüle musste unbedingt vermieden werden, da ein selbstständiger Atembeginn in zu tiefer Narkose kaum möglich ist. Sobald eine Gegenatmung erfolgte, wurde die Kanüle herausgezogen und die Maus in Bauchlage gebracht. Die Maus verblieb auf der Heizplatte bis eine regelmäßige Atmung eingesetzt

hatte. Anschließend blieben die Tiere bis zum vollständigen Erwachen unter Beobachtung in einem über eine Wärme-Rotlichtlampe beheizten Käfig.

Vor der Extubation wurde der narkotisierten Maus zur postoperativen Analgesie Metamizol-Na⁺ (200 µg/kg KG) subkutan (s.c.) gespritzt. Hierfür wurde die Metamizol-Na⁺-Lösung 1:10 mit *Aqua ad iniectabilia* auf eine Konzentration von 50 mg/ml verdünnt. Die gleiche Dosis wurde in einem 48-stündigen Zeitraum alle 8 Stunden erneut appliziert. Im Anschluss wurde nach Bedarf dosiert.

2.5.5 Permanente Ligatur

Mithilfe der permanenten Ligatur können die Schäden, die durch die entstehende Unterversorgung des Gewebes bei einem Myokardinfarkt auftreten, genau untersucht werden. Dabei können die Auswirkung der Ischämie auf die Herzfunktion sowie die Größe des ischämischen Areals bestimmt werden. Bei der Durchführung wurde die LCA für 24 Stunden permanent okkludiert und anschließend das Ausmaß des Ischämieschadens mithilfe der Evans Blue/TTC-Färbung untersucht. Der zeitliche Ablauf ist nachfolgend in Abbildung 23 dargestellt.

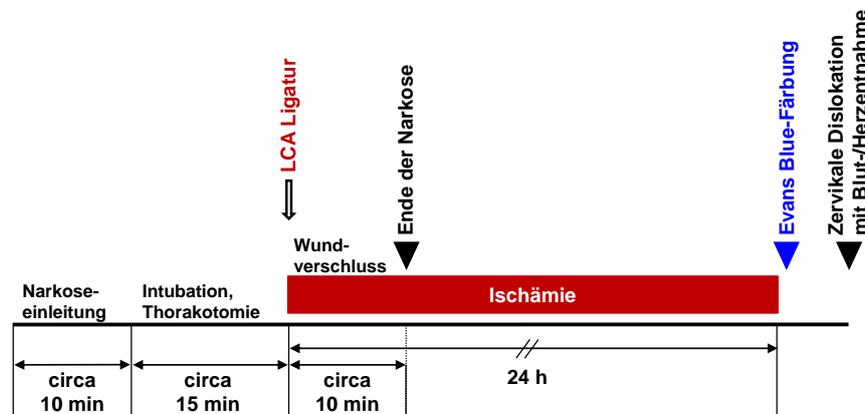


Abbildung 23: Zeitlicher Ablauf des Modells der permanenten Ligatur

LCA: linke Koronararterie

Die Durchführung der Operation für die permanente Ligatur entsprach der des chronischen Modells. Sowohl die Durchführung der Anästhesie, die Fixierung der Maus und die Durchführung der Intubation als auch die Thorakotomie und die Freipräparation des Herzens wurden wie unter Abschnitt 2.5.4 detailliert beschrieben ausgeführt.

Für die permanente Okklusion wurde die LCA mit einem Polypropylenfaden (Prolene 7-0) umstochen und dieser irreversibel verknotet. Durch den Knoten wurde die LCA

zugedrückt, was durch die Weißfärbung des distal der Ligatur gelegenen Gewebes zu erkennen war. Der Faden wurde knapp abgeschnitten.

Der Wundverschluss und die Beendigung der Narkose, sowie die Schmerztherapie verliefen wie unter den Abschnitten 2.5.4.4 und 2.5.4.5 aufgeführt.

2.5.6 Messung der ROS mittels MitoB-Injektion

Die *in-vivo*-Messung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) gestaltet sich aufgrund deren Flüchtigkeit und ihres schnellen Abbaus als schwierig. Im Jahr 2011 wurde in der Arbeitsgruppe von Michael P. Murphy eine Substanz entwickelt, welche die Quantifizierung der Bildung von H_2O_2 *in vivo* ermöglicht (Cocheme et al. 2011). Die Substanz MitoB (*MitoBoronic acid*) besteht aus einem Triphenylphosphonium (TPP)-Kation, welches an Arylboronsäure konjugiert ist (Abbildung 24A). Die Strategie hierbei ist, dass das lipophile TPP-Kation schnell biologische Membranen passieren kann und angetrieben durch das Membranpotential hundertfach in Mitochondrien akkumuliert (Murphy and Smith 2007). Arylboronsäure reagiert selektiv mit H_2O_2 zu dem Phenol MitoP (Miller et al. 2007, Dickinson and Chang 2008).

Die Kopplung des TPP-Kations an Arylboronsäure generiert somit einen Mitochondrien-spezifischen Marker für ROS, das sog. MitoB. Ein weiterer Vorteil ist, dass das Oxidationsmittel für die Arylboronsäure die konjugierte Base von H_2O_2 mit einem pKa-Wert von 11,62 ist. Dadurch sollte die Reaktion in den Mitochondrien, in welchen ein pH-Wert von ca. 8,0 vorherrscht, schneller ablaufen als im Zytosol (pH ~ 7,2), was die Mitochondrienspezifität des ROS-Nachweises weiter fördert. Da auch Peroxynitrit ($ONOO^-$), welches bei einem Aufeinandertreffen von Superoxiden mit Stickstoffmonoxid entstehen kann, Arylboronate in Phenole umwandelt, fungiert die Umwandlung von MitoB in MitoP als Marker für die H_2O_2 - und $ONOO^-$ -Konzentrationen in der Mitochondrienmatrix *in vivo*. (Cocheme et al. 2011)

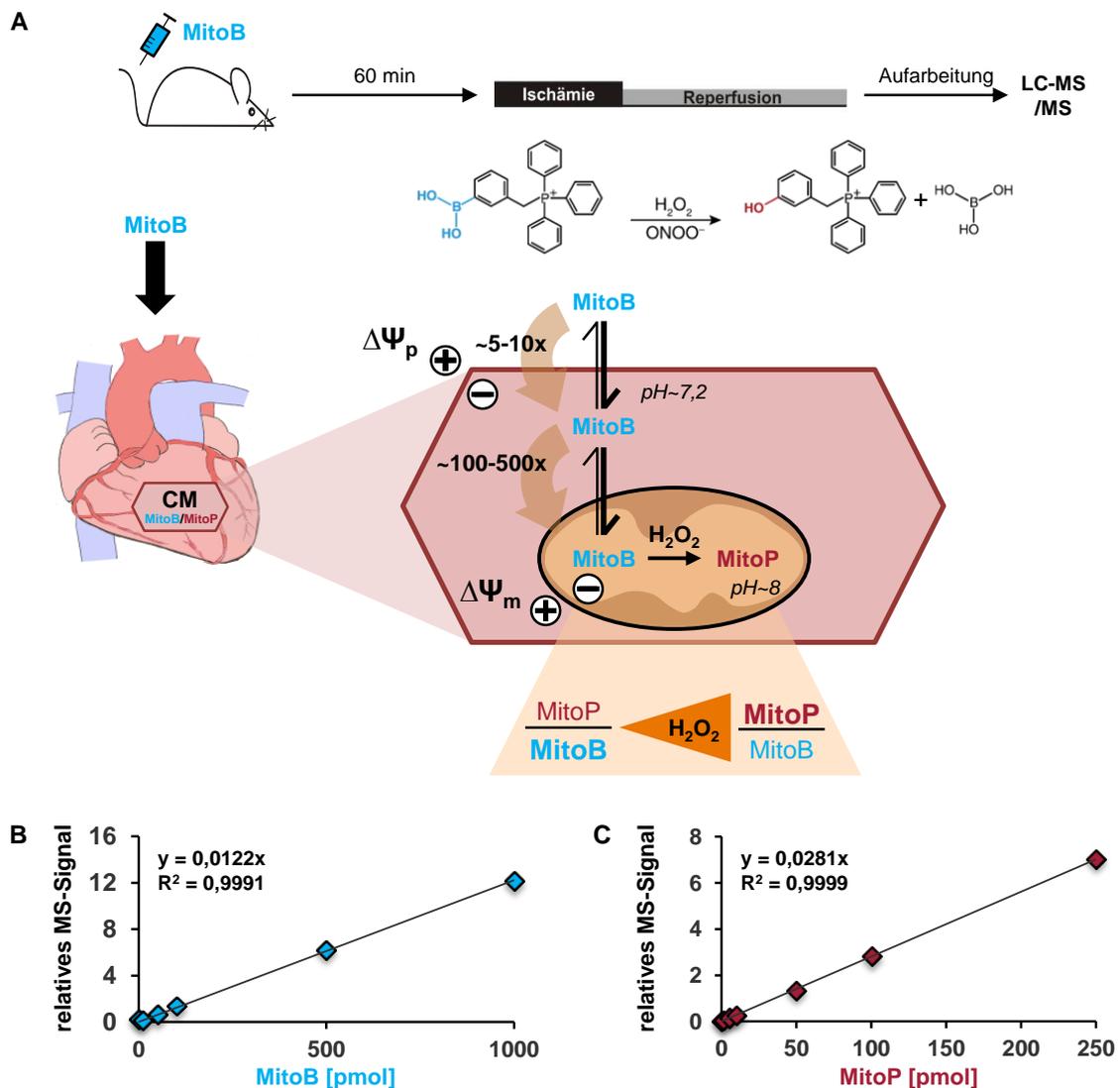


Abbildung 24: MitoB als Marker für mitochondriale ROS-Bildung *in vivo*

(A) Schematische Darstellung der ROS-Messung *in vivo*. Nach intraperitonealer (*i.p.*) Applikation akkumuliert MitoB in den Mitochondrien der Kardiomyozyten und wird proportional zur ROS-Menge in MitoP umgewandelt (modifiziert nach Cocheme et al. 2011). Der Quotient aus MitoP zu MitoB kann somit als Maß für die ROS-Bildung herangezogen werden. Standardkurven von MitoB (B) und MitoP (C). CM: Kardiomyozyt; H_2O_2 : Wasserstoffperoxid; LC-MS: Flüssig-Chromatographie-Massenspektrometrie; ONOO: Peroxynitrit; Ψ_m : Membranpotential

2.5.6.1 MitoB-Injektion

50 μ l MitoB (0,5 mM, gelöst in steriler 0,9%iger NaCl-Lösung) wurden 60 min vor Beginn der Ischämie intravenös verabreicht (Abbildung 24, Durchführung siehe Abschnitt 2.5.3.7). Es erfolgte die Operation des akuten Myokardinfarkts wie unter Abschnitt 2.5.3 beschrieben. Nach dem Ende der Reperfusion (120 min für I/R und 15 min für I₃₀/R₁₅) wurde das Herz entnommen und 53,0 \pm 2,0 mg des ischämischen Bereiches in flüssigen Stickstoff überführt. Die Lagerung der ischämischen Herzgewebe bis zu ihrer Aufarbeitung erfolgte bei -80°C. Cinaciguat wurde wie unter Abschnitt 2.5.3.7 beschrieben 30 min vor Beginn der Ischämie *i.p.* injiziert. Um die gleiche Equilibrierungszeit des MitoB

in vivo auch für die Basalwerte einzuhalten, wurden die Tiere 210 min nach MitoB-Injektion mittels zervikaler Dislokation getötet und das Herz entnommen.

Für die Herstellung der Standardkurven wurden die Substanzen MitoB, MitoP, d₁₅-MitoB und d₁₅-MitoP, die von Dr. Michael Murphy (MRC Mitochondrial Biology Unit, Cambridge, UK) im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt wurden, auf eine Konzentration von 10 mM in 100%igem Ethanol gelöst. Als interner Standard wurde eine Mischung von d₁₅-MitoB (10 µmol/l) und d₁₅-MitoP (5 µmol/l) verwendet. Für die Standardreihen von MitoB (Abbildung 24B) und MitoP (Abbildung 24C) wurden nachfolgende Konzentrationen durch Verdünnung mit Ethanol hergestellt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Standardreihe für MitoB und MitoP

MitoB [µmol/l]	100	50	10	5	1		
MitoP [µmol/l]	25	10	5	1	0,5	0,1	0

Im nächsten Schritt erfolgte die Entnahme einer Mausleber, die in 14 Gewebestücke zu je 55,0 ± 2,0 mg aufgeteilt und dann sofort in flüssigem Stickstoff weggefroren wurde. Die Leberproben wurden für die Herstellung der Standardreihe verwendet.

2.5.6.2 Aufarbeitung der Gewebeproben

Für die Vorbereitung der Aufarbeitung wurden der Puffer 1 (Herstellung siehe Abschnitt 2.5.2) bei 4°C und der interne Standard, sowie die Lösungen der Standardreihe von MitoB und P auf Eis gekühlt. Es wurden jeweils drei Proben gleichzeitig aufgearbeitet. Die Gewebeprobe wurde in ein PreCelly-Tube (Keramik; 1,4/2,8 mm) gegeben und 200 µl Puffer 1 zupipettiert und für zweimal 10 s bei 5000 U/min in einem Gewebehomogenisator (Minilys) homogenisiert. Im Anschluss wurde für 10 min bei 4°C / 16.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurden erneut 200 µl Puffer 1 in den PreCelly-Tube zupipettiert. Nach 10 s Vortexen und erneuter Zentrifugation mit identischen Einstellungen wurde der erhaltene Überstand mit dem ersten Überstand vereinigt. Die Probe wurde nun mit 10 µl des internen Standards gespiked. Bei den Proben für die Standardreihe wurden nun im nächsten Schritt 10 µl der entsprechenden Menge an MitoB bzw. MitoP (Tabelle 4) zugefügt. Nach 10 s Vortexen wurden die Proben für 40 min bei 4°C gelagert. Anschließend wurde erneut zentrifugiert und der Überstand in eine 1 ml-Spritze mit einer 20G Kanüle aufgezogen. Über ein Sterilfilter Millex-GV (Porendurchmesser: 0,22 µm) wurde der Überstand in ein Reaktionsgefäß filtriert und die Probe in einer SpeedVac bei 30°C für 120 min bis zur vollständigen Entfernung der Flüssigkeit getrocknet. Die Aufarbeitung der Herzgewebe erfolgte entsprechend der Aufreinigung der Proben für die Standardkurve, mit Ausnahme des Zupipettierens der entsprechenden MitoB- bzw. MitoP-Lösung der Standardreihe.

Die aufgearbeiteten Proben wurden für die LC-MS/MS-Analyse zu Frau Dr. Angela Logan (MRC Mitochondrial Biology Unit, Cambridge, UK) gesendet. Hierbei dienen die Flüssigchromatographie zur Auftrennung der Substanzen in dem Gemisch und die daran gekoppelte Massenspektrometrie zur Identifikation und Quantifizierung der Analyten.

2.5.7 Telemetrische Blutdruckmessung

Mithilfe telemetrischer *in-vivo*-Messungen wurden der Blutdruck, der Puls und die lokomotorische Aktivität gemessen werden. Hierfür wurde ein Telemetriesystem der Firma DataScience Int. verwendet. Der zeitliche Ablauf der Implantation der Transmitter und die sich anschließenden Messungen sind in Abbildung 25 schematisch dargestellt.

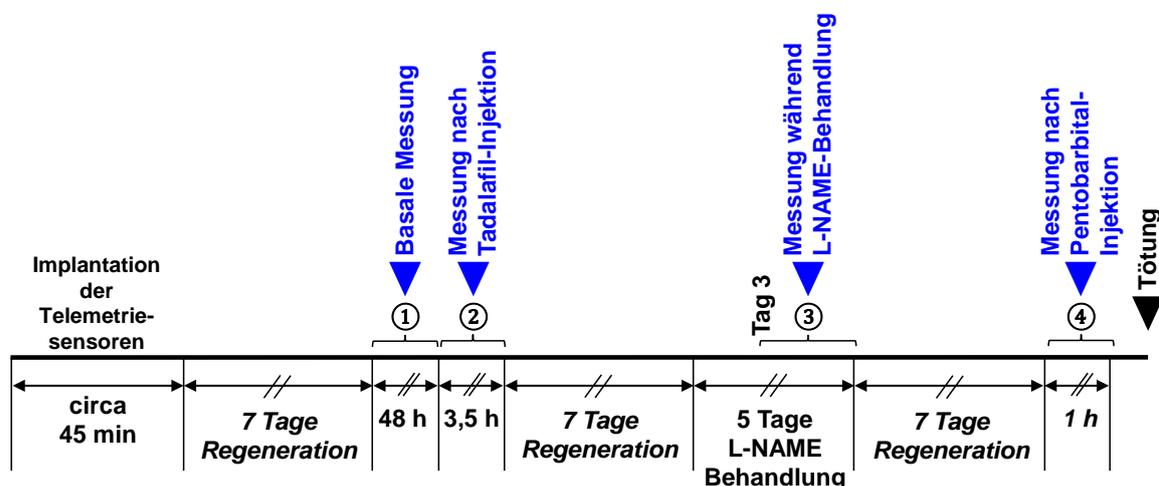


Abbildung 25: Zeitlicher Ablauf der Blutdruckmessung

2.5.7.1 Durchführung der Implantation

Das Narkoseregime erfolgte analog zur Anästhesie im chronischen Modell des Myokardinfarkts (intraperitoneale Injektion der Ketamin/Xylazin-Lösung, siehe Abschnitt 2.5.2, mit anschließender volatilen Isofluran-Inhalationsnarkose, siehe Abschnitt 2.5.4.1). Nach dem Feststellen der erforderlichen Narkosetiefe durch völliges Ausbleiben der Zwischenzeh- und Lidreflexe wurde das Fell im Brustbereich mit Enthaarungscreme entfernt und die Haut mit Octenisept desinfiziert. Die Augen der Maus wurden mit Bepanthen Augen- und Nasensalbe abgedeckt, um eine Austrocknung der Cornea zu verhindern. Die Temperaturkontrolle erfolgte über eine Rektalsonde auf einem beheizten OP-Tisch mit steriler Auflage bei 37°C. Anschließend wurde die ventrale Inzision (ca. 2,5 cm) submandibulär beginnend bis zum Sternum durchgeführt. Die linke *Arteria carotis communis* und *Arteria carotis externa* wurden im Bereich der Bifurkation vorsichtig von

umliegenden Gefäßen und Nervenbahnen insbesondere des *Nervus vagus* freipräpariert (verwendete Pinzetten: Vessel dilating forceps, FST). Der Zugang erfolgte nach vorsichtigem Separieren der beiden Hälften der Glandula mandibularis, zwischen dem *Musculus sternohyoideus* und dem *Musculus sternomastoideus*. Dies wurde durch vorsichtiges Schnippen mit einer atraumatischen Pinzette erreicht.

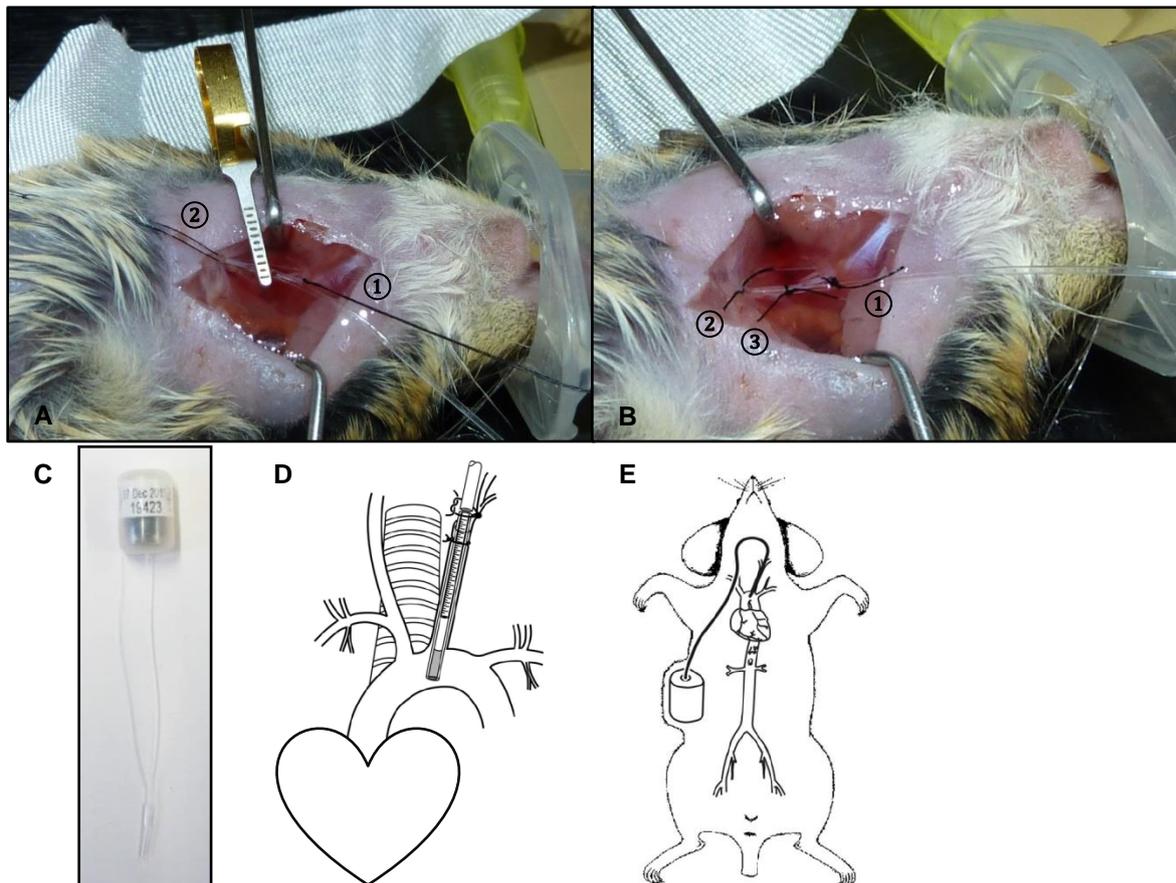


Abbildung 26: Durchführung der Implantation der Blutdrucktransmitter

(A) Druckkatheter, welcher in die *Arteria carotis communis* eingeführt und mit einer Gefäßklemme fixiert wird. Mit dem rechten Faden (①) wurde die *Arteria carotis communis* irreversibel unterhalb der Bifurkation ligiert. Der linke Faden (②) wurde reversibel angebracht um die Blutversorgung in dem sichtbaren Abschnitt zu unterbrechen und so ein Einführen des Katheters zu ermöglichen. (B) Druckkatheter in der *Arteria carotis communis* mit drei Halteknoten (①-③) fixiert. (C) Blutdruckkatheter mit Transmitter (DSI, Modell TA11PA-C10). (D) Darstellung der korrekten Positionierung des Druckkatheters im Aortenbogen. (E) Schematische Darstellung des implantierten Druckkatheters und die Platzierung des Transmitters im rechten Flankenbereich. Abbildungen (D) und (E) von (Huetteman and Bogie 2009).

Die Arterie wurde vorsichtig untertunnelt und zwei Fäden (Resorba-Seide 7/0) für Ligaturen gelegt. Die *Arteria carotis communis* wurde kaudal zur Bifurkation irreversibel mittels der Seide ligiert (Abbildung 26A, ①). Etwa 0,8 cm proximal zur ersten Ligatur wurde eine zweite, reversible Ligatur unter Verwendung einer atraumatischen Bulldogklemme (Bulldog Serrefine, FST) gesetzt (Abbildung 26A, ②). Nach einem medianen Schnitt in den vom Blutstrom abgetrennten Gefäßabschnitt der *Arteria carotis*

communis mit einer Schere (Vannas-Tübingen Spring Scissor), wurde der Druckkatheter des Transmitters (DSI, Modell TA11PA-C10, Abbildung 26C) vorsichtig eingeführt und mit einer Gefäßklemme (Micro Serrefine) in Position gehalten (Abbildung 26A). Der Katheter wurde bis zur Verjüngung in Richtung des Aortenbogens mithilfe eines Katheterhalters (Vessel Cannulation Forceps, FST) vorgeschoben (Abbildung 26D) und mit den beiden bereits gelegten Fäden (①, ②) und einem weiteren nicht-resorbierbaren Haltefaden (Resorba-Seide 7/0, ③) an der Verjüngung fixiert (Abbildung 26B). Durch die Haltefäden wurde das Gefäß auch zur Gefäßläsion hin abgedichtet. Die transient angebrachte Klemme wurde wieder entfernt.

Der Transmitter wurde im rechten Flankenbereich zwischen den Vorder- und Hinterläufen in einer seitlich geschaffenen Tasche subkutan platziert (Abbildung 26E). Diese Tasche wurde erneut durch vorsichtiges Schnippen mit einer atraumatischen Pinzette geschaffen. Die Wunde wurde mit bis zu 8 Einzelknopfnähten (Perma Hand Seide 5-0) verschlossen um einen vollständigen Wundverschluss zu gewährleisten. Die Naht wurde mit steriler 0,9%ige NaCl-Lösung gereinigt und anschließend Octenisept zur Entzündungsprävention mit einem sterilen Tupfer aufgetragen. Die Mäuse erhielten standardmäßig Metamizol-Na⁺ (200 µg/kg KG, s.c.) zur postoperativen Analgesie (siehe Abschnitt 2.5.4.5). Während der Aufwachphase blieben die Tiere unter Beobachtung in einem über eine Wärme-Rotlichtlampe beheizten Käfig. Nach einer mindestens siebentägigen Regenerationsphase und abgeschlossener Wundheilung konnten verlässliche Blutdruckdaten bestimmt werden. Die Käfige wurden hierfür auf Daten-Empfangsplatten positioniert, die mit einem PC-gesteuerten Receiver verbunden waren. Während der Messungen, die für die Tiere unbemerkt abliefen, wurden die Daten über den Sender kontinuierlich (60 Sekunden- bzw. 10 Sekunden-Intervalle) übertragen. Das Messintervall für die basale Messung lag bei alle 15 min für 60 Sekunden über 48 Stunden (Abbildung 25, ①).

2.5.7.2 Behandlung mit pharmakologischen Substanzen

Um den Einfluss einiger im akuten Modell verwendeter Substanzen auf den Blutdruck zu untersuchen, wurden drei Substanzen entsprechend ihrer Anwendung im akuten Modell den Tieren vor der Blutdruckmessung injiziert.

Tadalafil (Abbildung 25, ②). Nach dem Start der Messung (Messintervall: alle 30 s für 10 s) wurde den Tieren die cGMP-erhöhende Substanz Tadalafil in einer Konzentration von 1 mg/kg Körpergewicht (Salloum et al. 2009) intraperitoneal injiziert und anschließend für insgesamt 210 min gemessen (Abbildung 27A). Es schloss sich eine siebentägige

Regenerationsphase an, in welcher sich der Blutdruck normalisieren konnte. Vor Beginn einer neuen Messung wurde jeweils die Normalisierung des Blutdrucks überprüft.

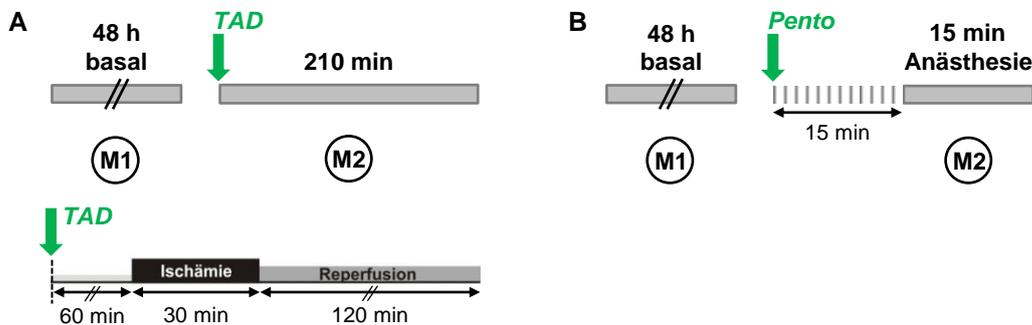


Abbildung 27: Zeitlicher Ablauf der Blutdruckmessung nach Tadalafil bzw. Pentobarbitalgabe
 (A) Tadalafilinjektion (TAD, 1 mg/kg, *i.p.*); die Messung erfolgte für 210 min (*oben*), entsprechend der Gesamtdauer der TAD-Applikation im akuten Myokardinfarktmodell (*unten*). (B) Pentobarbitalinjektion (Pento, 70 mg/kg, *i.p.*); die Messung wurde 15 min später für eine Zeitspanne von 15 min unter Anästhesie durchgeführt; M1: basale Messung, M2: Messung nach Wirkstoffinjektion

L-NAME (Abbildung 25, ③). Der NO-Synthase-Inhibitor L-NAME wurde an Tag 1 in einer Konzentration von 5 mg/ml in das Trinkwasser gemischt (modifiziert nach Groneberg et al. 2010 und Obst et al. 2006). Nach 48 Stunden wurde das mit L-NAME versetzte Trinkwasser erneuert und die Messung (Messintervall: alle 15 min für 60 s) gestartet. Nach weiteren 72 Stunden wurde die Messung beendet und den Tieren wieder unbehandeltes Trinkwasser gegeben. Es schloss sich erneut eine siebentägige Regenerationsphase an, in welcher sich der Blutdruck normalisieren konnte (Abbildung 25).

Pentobarbital-Natrium (Abbildung 25, ④). Den Tieren wurde Pentobarbital-Natrium in einer Konzentration von 70 mg/kg Körpergewicht (Eckle et al. 2006, Methner et al. 2013b) intraperitoneal injiziert. Nach Narkoseeintritt wurden die Tiere auf einer Heizplatte fixiert und die Temperatur mittels eines Rektalthermometers konstant auf 37°C gehalten. Für die Überwachung der Anästhesietiefe wurden die Zwischenzehen- sowie die Lidreflexe kontrolliert und gegebenenfalls wurde Pentobarbital-Natrium nachdosiert ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; Eckle et al. 2006). Die Messung wurde 15 min nach Pentobarbitalinjektion gestartet (Messintervall: alle 30 s für 10 s; Abbildung 27B) und nach insgesamt 30 Minuten gestoppt. Die noch narkotisierten Tiere wurden mittels zervikaler Dislokation getötet.

2.5.7.3 Entfernung des Katheters

Der Transmitter mit Druckkatheter wurde vorsichtig aus der Maus herausgeschnitten und für 24 Stunden in 1%ige Tergazymlösung (Herstellung siehe Abschnitt 2.5.2) gelegt. Im

Anschluss wurde er mehrmals unter Wasser abgespült und anhaftende Gewebereste entfernt. Die Sterilisation des Transmitters erfolgte in 2%iger Glutaraldehydlösung (Herstellung siehe Abschnitt 2.5.2) für weitere 24 Stunden. Nach der Reinigung unter Wasser wurde wenn notwendig das Gel im Druckkatheter aufgefüllt. Anschließend wurde der Transmitter in steriler 0,9%ige NaCl-Lösung bis zur weiteren Verwendung gelagert. Je nach Abnutzung konnte ein Transmitter 3-4 Mal eingebaut werden bevor die Auffrischung erfolgen musste.

2.5.8 Echokardiographie

2.5.8.1 Durchführung

Um den kardiovaskulären Phänotyp zu studieren, sind neben Blutdruckmessungen (siehe Abschnitt 2.5.7) echokardiographische Messungen zur Bestimmung der Auswurfraction (EF, *ejection fraction*), der Verkürzung des Herzmuskels (FS, *fractional shortening*) und der Wanddicken unabdingbar. Langfristige negative Auswirkungen eines akuten Myokardinfarkts lassen sich gut an einer veränderten Herzfunktion erkennen. Vorteil hierbei ist die nichtinvasive Untersuchungsmethode.

Das Echokardiographie-System für Kleintiere (Vevo 2100) wurde von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Meinrad Gawaz an der Medizinischen Klinik (Abteilung Innere Medizin III / Kardiologie und Kreislauferkrankungen des Universitätsklinikums Tübingen) zur Verfügung gestellt. Bei der Durchführung der Ultraschalluntersuchungen unterstützte Frau Dr. Julia Straubinger. Hierbei bekamen die Tiere ebenfalls eine volatile Isoflurannarkose (siehe Abschnitt 2.5.4.1). Das Fell wurde im Brustbereich mit einer Enthaarungscreme entfernt und die Tiere auf einem beheizten OP-Tisch bei 37°C fixiert. Die Aufrechterhaltung der Temperatur wurde mithilfe eines Rektalthermometers sichergestellt. Nach dem Auftragen des Ultraschallkontaktgels wurde der 30-MHz-Schallkopf in Position gebracht. Es wurde ausschließlich in der Längsachse gemessen, da Veränderungen der Herzfunktion nach einem Myokardinfarkt in dieser Achse sichtbar werden. Im zweidimensionalen B-Mode (*brightness mode*) wurden der Schallkopf sowie der Tisch, auf welchem die Maus platziert war, so ausgerichtet, dass sowohl der Apex also auch die Aortenklappe deutlich zu erkennen waren und in einer waagrechten Linie zueinander lagen. Der M-Mode (*time motion*) wurde über die Mitte zwischen Apex und Aortenklappe ermittelt (Abbildung 31B). Nach den Messungen wurde die Maus von dem Kontaktgel gereinigt und bis zum vollständigen Erwachen unter eine Rotlichtlampe gesetzt.

2.5.8.2 Auswertung mit der „Vevo Strain 2100“-Methode

Für die Auswertung mit der Software „Vevo Strain 2100“ wurde der B-Mode bei möglichst hohem Puls (>400 Schläge pro Minute) bestimmt. Es wurden zwei B-Modes in unterschiedlichen Tischpositionen aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit der Software „Vevo Strain 2100“. Es wurden nur Sequenzen ausgewertet, bei denen das Programm selbstständig die Peaks der Systole erkannt hatte.

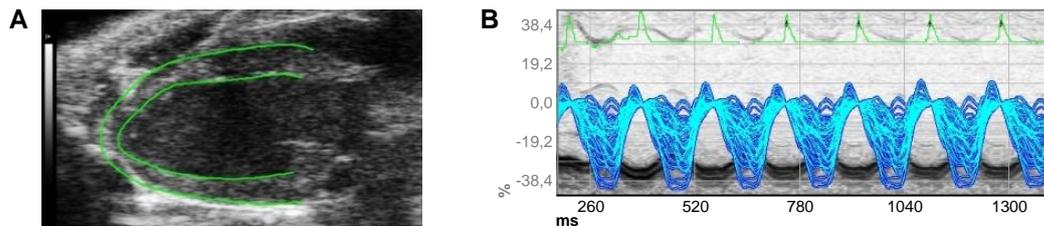


Abbildung 28: Auswertung der Verformung des Herzens mit „Vevo Strain 2100“

(A) Echokardiographische Aufnahme der kardialen Längsachse einer CMBK-CTR unter basalen Bedingungen. Die grünen Linien beschreiben Endokard und Epikard. (B) Longitudinale Verformung dieses Herzens während Systole und Diastole. Die Enddiastole entspricht hierbei 0 % Verformung.

Für die Bestimmung des Endokards wurden manuell 8-10 Punkte am Endokard entlang gesetzt und durch das Programm zu einer Endokard- und einer Epikardlinie extrapoliert, welche wenn nötig noch angepasst werden konnte (Abbildung 28A). Es erfolgte eine selbstständige Berechnung der Auswurfraction durch die Software, sowie eine Darstellung der Verformung des Herzens, der Verformung pro Zeit (Verformungsrate) und der Verformungsgeschwindigkeit. Die Parameter wurden dabei als 48 Wellen dargestellt, welche die zweidimensionale Bewegung von 48 Punkten gleichmäßig verteilt entlang des ermittelten Endokards repräsentierten. In Abbildung 28B ist dies exemplarisch für die longitudinale Verformung des Endokards einer Kontrollmaus unter basalen Bedingungen gezeigt. Die Berechnung der Verformung (Abbildung 29B) erfolgte dabei sowohl in longitudinaler als auch in radialer Richtung (Abbildung 29A).

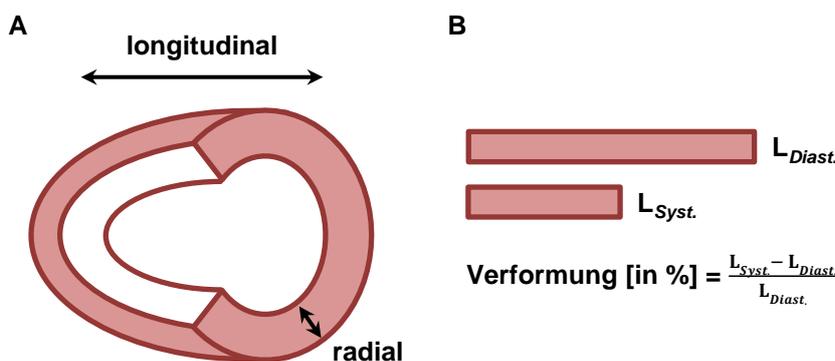


Abbildung 29: Berechnung der Verformung des Herzens (A) Darstellung der Verformungsrichtungen des Herzens. (B) Formel zur Berechnung der prozentualen Verformung während Systole und Diastole.

Im nächsten Schritt erfolgte die Einteilung des Herzens in sechs verschiedene Segmente, wobei jeweils 8 der 48 Punkte als ein Punkt zusammengefasst wurden (Abbildung 30A). Die Lokalisation der einzelnen Segmente ist in Abbildung 30B dargestellt (Bauer et al. 2011). Die Peakwerte der einzelnen Parameter (*hier*: longitudinale Verformung) in den verschiedenen Segmenten wurden zusätzlich von dem Programm berechnet (Abbildung 30C).

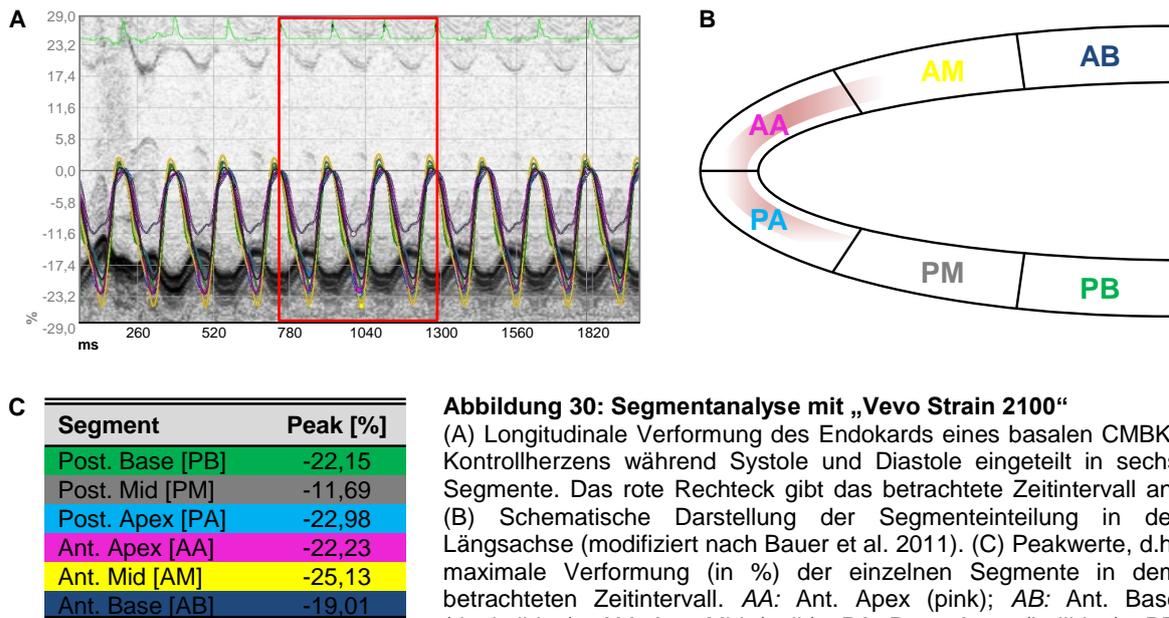


Abbildung 30: Segmentanalyse mit „Vevo Strain 2100“
 (A) Longitudinale Verformung des Endokards eines basalen CMBK-Kontrollherzens während Systole und Diastole eingeteilt in sechs Segmente. Das rote Rechteck gibt das betrachtete Zeitintervall an. (B) Schematische Darstellung der Segmenteinteilung in der Längsachse (modifiziert nach Bauer et al. 2011). (C) Peakwerte, d.h. maximale Verformung (in %) der einzelnen Segmente in dem betrachteten Zeitintervall. AA: Ant. Apex (pink); AB: Ant. Base (dunkelblau); AM: Ant. Mid (gelb); PA: Post. Apex (hellblau); PB: Post. Base (grün); PM: Post. Mid (grau).

2.5.8.3 Auswertung mit der konventionellen Methode

Für die konventionelle Messung wurden die Tiere anschließend auf einen Puls von ca. 300-330 Schlägen pro Minute gebracht. Bei jeder Maus wurden in drei verschiedenen Tischpositionen B- und M-Mode bestimmt (Abbildung 31). Im M-Mode wurden anschließend die Standardparameter wie die Interventrikularseptum (IVS)- und Hinterwanddicken (LVPW) sowie die Diameter (LVID) des linken Ventrikels während Systole und Diastole bestimmt. Hierbei wurden in jedem M-Mode drei Werte pro Parameter für Systole und Diastole gemessen, woraus eine Neunfachbestimmung jedes Parameters resultierte. Aus den Mittelwerten dieser Parameter wurden die Auswurfraction, die Verkürzung des Herzmuskels, der totale enddiastolische Durchmesser sowie die Masse und das Volumen des linken Ventrikels berechnet. Die Formeln für die Berechnung finden sich im Anhang (Annex-Formel 1).

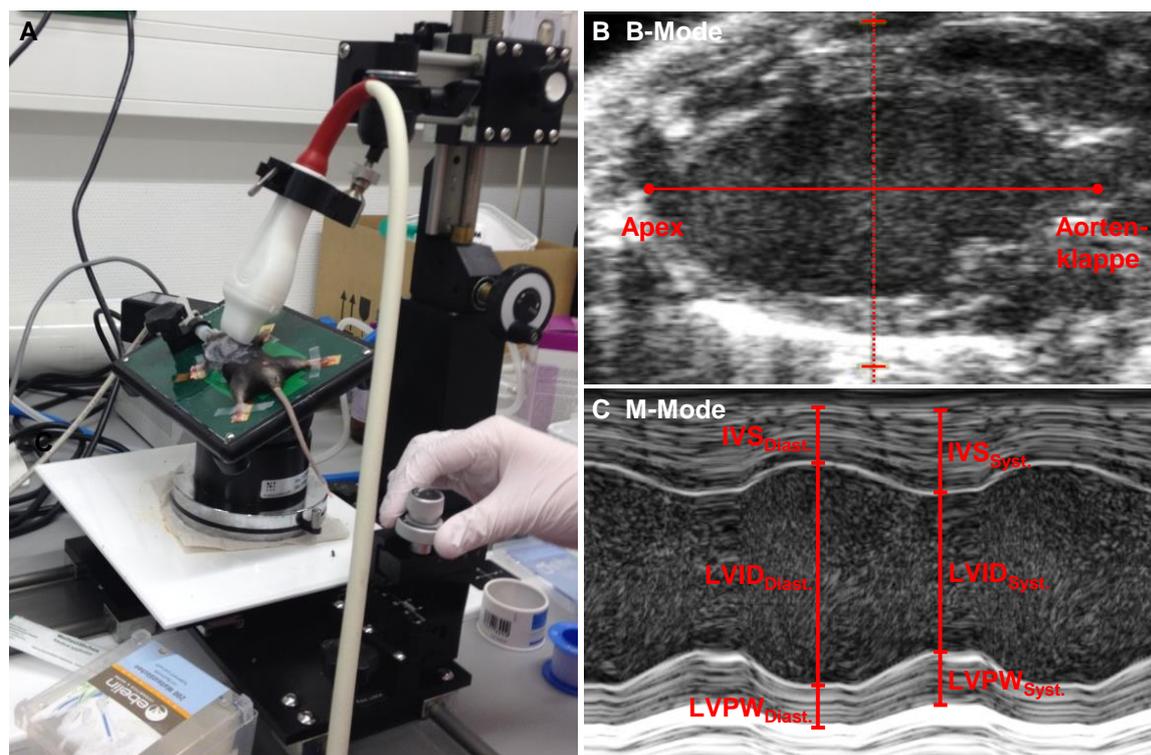


Abbildung 31: Durchführung der Echokardiographie und konventionelle Auswertung
 (A) Aufbau der echokardiographischen Messung mit der Ultraschallsonde. (B) B-Mode für die konventionelle Auswertung. Die vertikale, gestrichelte Linie teilt die horizontale Strecke zwischen Aortenklappe und Apex in zwei Hälften und gibt die Position der M-Mode-Aufnahme an. (C) M-Mode für die Messung der Parameter zur Bestimmung der Herzfunktion. *Diast.*: Diastole; *IVS*: Interventrikularseptumdicke; *LVID*: Durchmesser des linken Ventrikels; *LVPW*: Hinterwanddicke des linken Ventrikels; *Syst.*: Systole.

2.6 Histologische Methoden

2.6.1 Material und Substanzen

Material/Substanz/Kit	Bestellnummer	Hersteller
1N Salzsäure-Maßlösung	K025.1	Carl Roth
Aceton	9372.4	Carl Roth
Ammoniak	P093.2	Carl Roth
ApopTag® Plus Peroxidase <i>in Situ</i> , Apoptosis Detection Kit	S7101	Merck Millipore
Aquatex Eindeckmedium	1.08562.0050	Merck Millipore
Bouin-Lösung	HT101128	Sigma-Aldrich
Deckgläser 20x60 High Precision	LH26.1	Carl Roth
DePeX Eindeckmedium	HX069485	VWR
Direct Red 80	365548	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	1008.0025	Gerbu Biotechnik
DNase I	04716728001	Roche
Einbettmedium NEG50	6502	Thermo Scientific
Eosin Y-Lösung (0,5 %)	HT110232	Sigma-Aldrich
Essigsäure (100 %)	3738.5	Carl Roth
Ethanol (100 %)	32205	Sigma-Aldrich
Feste Pikrinsäure	239801	Sigma-Aldrich
Fettstift	H-4000	Vector Laboratories

Gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung	P6744	Sigma-Aldrich
Hämatoxylin nach Harris	X903.2	Carl Roth
Hoechst 33258	861405	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($MgCl_2 \times 6 H_2O$)	1.05833.1000	Merck Millipore
Objektträger (Superfrost Plus)	H.867.1	Carl Roth
Paraformaldehyd (PFA)	0335.2	Carl Roth
PBS	14190094	Life technologies
PermaFluor	TA-030-FM	Thermo Scientific
Saccharose	4621.2	Carl Roth
Salzsäure (37 %)	4625.2	Carl Roth
Schneideklingen (Kryotom)	MX35	Thermo Scientific
Toluol	7115.1	Carl Roth
TRIS	5429.3	Carl Roth
Triton X-100	3051.2	Carl Roth
Wasserstoffperoxid (H_2O_2)	8070.2	Carl Roth
Xylol	9713.3	Carl Roth

2.6.2 Puffer und Lösungen

4 % PFA	
PFA	30 g
1 x PBS	ad 750 ml
▶ auf 60°C erhitzen und rühren bis eine klare Lösung entsteht	

PermaFluor/Hoechst	
PermaFluor	7,5 ml
Hoechst 33258	7,5 µl
▶ in Alufolie einwickeln, bei 4°C lagern	

Saure Eosin Y-Lösung	
Eosin Y-Lösung (0,5 %)	25 ml
dH ₂ O	ad 50 ml
▶ mit 2 Tropfen Essigsäure ansäuern	

Stopp-/Waschpuffer (TUNEL)	
Stopp-/Waschpuffer	2,42 g
dH ₂ O	16 ml

1 M TRIS-HCl pH 7,2	
TRIS	2,42 g
dH ₂ O	16 ml

Sirius Rot-Lösung	
Direct Red 80	250 mg
dH ₂ O	25 ml
Gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung	225 ml
Feste Pikrinsäure	ca. 50 mg
▶ Direct Red in dH ₂ O lösen, filtrieren	
▶ gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung über Filter hinzugeben	
▶ für Saturierung einige mg feste Pikrinsäure zugeben	

TdT-Enzymlösung (TUNEL)	
Reaktionspuffer	77 µl
TdT -Enzym	33 µl

Peroxidasesubstrat (TUNEL)	
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	2,03 g
dH ₂ O	10 ml

1 M MgCl ₂	
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	2,03 g
dH ₂ O	10 ml

DN-Puffer		DNase I-Lösung (2.000 U/ml)	
1 M TRIS-HCl pH 7,2	3 ml	DNase I	200 µl
1 M MgCl ₂	400 µl	DN-Puffer	800 µl
DTT	1,54 mg		
dH ₂ O	<i>ad</i> 100 ml		

2.6.3 Anfertigung von Kryoschnitten

2.6.3.1 Gewebeentnahme und Einbettung

Für die Gewebeentnahme wurde die Maus mittels zervikaler Dislokation getötet und in Rückenlage positioniert. Nach der Thoraxeröffnung wurde das Herz mit einer stumpfen, gebogenen Pinzette leicht angehoben und die verbundenen Gewebe und Gefäße getrennt. Das Herz wurde sofort in eine Petrischale mit eisgekühltem 1x PBS überführt und das Blut vorsichtig aus den Kammern gedrückt. Perikard, Binde- und Fettgewebe sowie Reste der Aorta wurden entfernt. Das Herz wurde gewogen bevor es in ein Reaktionsgefäß mit 4 % PFA (siehe Abschnitt 2.6.2) überführt wurde. Mit den Herzen, die direkt nach der Myokardinfarktoperation eingebettet wurden, wurde analog verfahren. Hier musste der Thorax nicht extra geöffnet werden, sondern das Herz konnte direkt entnommen werden (siehe auch Evans Blue/TTC-Färbung, 2.5.3.5). Das Herz wurde in der PFA-Lösung für vier Stunden auf dem Schüttler bei RT inkubiert bevor es nach einem fünfminütigen Waschschrift mit 1x PBS in eine 5%ige Saccharoselösung (5 g in 100 ml 1x PBS) überführt wurde. Nach einer Stunde erfolgte die Umbettung in eine 10%ige Saccharoselösung (10 g in 100 ml 1x PBS). Nach der Inkubation über Nacht wurde das Herz für 24 Stunden in eine 20%ige Saccharoselösung (20 g in 100 ml 1x PBS) gelegt. Der Saccharosegradient dient zur schonenden Entfernung des im Gewebe enthaltenen Wassers ohne dabei die Gewebestruktur zu zerstören. Im Anschluss wurde das Herz mit dem Apex nach oben senkrecht in ein vorgeformtes Förmchen aus Alufolie, welches zuvor mit Einbettmedium NEG50 gefüllt worden war, eingebettet und sofort bei -80°C weggefroren.

Für die zusätzliche Entnahme der Aorta wurde ebenfalls der Brustkorb geöffnet und das Herz mit der Pinzette leicht angehoben. Nun wurde die spitze Schere von oben her unter dem Herz platziert und auf das Rückgrat gedrückt. Während des Schneidens Richtung Zwerchfell entlang der Aorta war die Schere einem ständigen Druck nach unten auf das Rückgrat ausgesetzt. Das Herz mit der Aorta wurde daraufhin direkt in eisgekühltes 1x PBS überführt. Nachdem das störende Gewebe entfernt wurde, wurden das Herz und die Aorta vorsichtig auseinandergezogen und getrennt. Die Einbettung der Aorta erfolgte analog zum Herzen (siehe oben), auch sie wurde senkrecht eingebettet.

Für die unter Abschnitt 2.2.2.4 beschriebenen fluoreszierenden Gewebe der ROSA26 Cre-Reportermäuse wurde so schnell wie möglich im Dunkeln gearbeitet und versucht die Lichtexposition so gering wie möglich zu halten. Dies wurde realisiert, indem lichtgeschützte Gefäße für alle Schritte ab der Inkubation in 4 % PFA-Lösung verwendet wurden.

2.6.3.2 Schneiden am Kryotom

Das Kryotom bietet die Möglichkeit hauchdünne Gewebeschnitte anzufertigen und diese für weitere Untersuchungen beispielsweise histochemische Färbungen auf Objektträger aufzunehmen. Die Einstellungen der im Rahmen dieser Arbeit angefertigten Gewebeschnitte sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Kryotomeinstellungen

Schnittdicke	10 µm
Objekttemperatur	-21°C bis -23°C
Messertemperatur	-23°C bis -24°C
Vakutom	6 - 9

Die Herzen, welche anschließend für die histochemischen Färbungen verwendet wurden, wurden nach einem vorbestimmten Muster geschnitten. Der von der Ligatur distal gelegene Bereich wurde hierfür in 8 äquidistante Sektionen eingeteilt (siehe hierfür auch Abbildung 42A). Sobald der Apex im Einbettmedium sichtbar wurde, wurden 250 µm der Herzspitze entfernt. Ausgehend von der neuen Schnittebene erfolgte die Aufnahme der Schnitte aus Sektion 1. Hierfür wurden auf 3 Objektträgern jeweils 2 aufeinanderfolgende Schnitte mit je 10 µm aufgenommen. Im Anschluss wurden erneut 250 µm verworfen, bevor die Schnitte in Sektion 2 analog zur Sektion 1 aufgenommen wurde. In diesem Schema wurde bis zur 8. Sektion verfahren, so dass aus einem eingebetteten Herzen insgesamt 8 x 3 Objektträger mit je 2 Schnitten gewonnen wurden.

2.6.4 Sirius Rot-Färbung

Mithilfe der Sirius Rot-Färbung kann das Ausmaß einer Fibrosierung bestimmt werden, da der Farbstoff Direct Red 80 selektiv an Kollagenfasern bindet. Fibrotische Bereiche färben sich hierbei in den Kryoschnitten rot, während das restliche Gewebe gelb erscheint (De Heer et al. 2000). Vor dem Beginn der Färbung wurden die unter Abschnitt 2.6.3 beschriebenen Kryoschnitte für mindestens 30 min bei RT aufgetaut. Anschließend wurden die zu färbenden Schnitte in Bouin-Lösung für 24 Stunden fixiert. Hierfür wurden

die Objektträger in einen Färbetrog gestellt, welcher bis zur entsprechenden Höhe mit der Bouin-Lösung gefüllt war. Dieser wurde mit Parafilm luftdicht abgeschlossen. Im Anschluss wurden die Schnitte für eine Stunde in der Sirius Rot-Lösung (Herstellung siehe Abschnitt 2.6.2) im Färbetrog inkubiert. Nachdem die Schnitte zweimal kurz in 0,01 N HCl getaucht wurden, wurden sie für zweimal 2 min in 0,01 N HCl gewaschen. Die Objektträger wurden für 2 min in deionisiertem Wasser gespült bevor das Wasser über einen Ethanolgradienten entfernt wurde. Für die Dehydrierung wurden die Objektträger nacheinander für je 2 min in 50%igen, 70%igen und 90%igen Ethanol und anschließend für dreimal 2 min in 100%igen Ethanol gestellt. Zum Abschluss wurden die Schnitte nochmals für zweimal 2 min in Xylol dehydriert bevor sie mit DePeX eingedeckelt wurden. Hierfür wurde ein Deckgläschen mit DePeX bestrichen und dieses luftblasenfrei auf den Objektträger gedrückt. Die Schnitte wurden bis zur Betrachtung unter dem Mikroskop bei RT gelagert. Da die Größe der Herzschnitte den Bildausschnitt der Kamera des verwendeten Mikroskops (Axiovert 200M) überstieg, wurden die Herzscheiben in Abschnitten unter identischen Einstellungen fotografiert und anschließend am PC zusammengefügt.

2.6.5 Hämatoxylin- und Eosin- (H&E) Färbung

Die Hämatoxylin- und Eosin-Färbung wird genutzt um die morphologischen Strukturen einer Zelle darstellen zu können. Dabei werden Zellkerne und ribosomale Strukturen durch die hohe Affinität des basischen Hämatoxylins zu negativ geladenen Nukleinsäuren blau/lila gefärbt, wohingegen das saure Eosin zu einer Rot/Pinkfärbung von zytoplasmatischen Proteinen, Mitochondrien und Kollagen führt (Fischer et al. 2008). Zu Beginn wurden die Kryoschnitte für 30 min bei RT aufgetaut und im Anschluss über einen Ethanolgradienten (100 %, 90 %, 70 %, 50 % für jeweils 2 min) rehydriert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 2 min in deionisiertem Wasser erfolgte das Eintauchen des Objektträgers in die Hämatoxylinlösung nach Harris für 5 Sekunden. Der Objektträger wurde für zweimal 2 min mit Leitungswasser gewaschen und anschließend zum Entwickeln der Blaufärbung kurz in 0,1 % Ammoniaklösung getaucht um dann für 5 min in Leitungswasser überführt zu werden. Es folgte die Inkubation des Objektträgers in der sauren Eosin Y-Lösung für 10 min. Nachdem für fünfmal 2 min mit Leitungswasser gewaschen wurde, erfolgte die Ausdifferenzierung der Farbe mit Ethanol 80 % für 2 min, gefolgt von Ethanol 100 % für 3 min. Zum vollständigen Dehydrieren wurden die Objektträger zum Abschluss für 5 min in Toluol getaucht bevor sie wie bereits unter Abschnitt 2.6.4 beschrieben mit DePeX eingedeckelt und am Mikroskop (Axiovert 200M) ausgewertet wurden. Für die Visualisierung der Zellkerne in den Folgeschnitten der mit

der TUNEL-Methode gefärbten Kryoschnitte (siehe Abschnitt 2.6.6) wurde die Inkubation in der Eosin Y-Lösung weggelassen.

2.6.6 TUNEL-Färbung

Eine Methode für den Nachweis der DNA-Fragmentierung und damit apoptotischer Zellen stellt die TUNEL (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*)-Färbung dar. Sie basiert auf der ApopTag-Technology und ermöglicht es sowohl Einzel- als auch Doppelstrangbrüche zu detektieren. Hierbei werden enzymatisch unkonjugierte und an Digoxigenin-konjugierte Nukleotide an freie 3'-OH-Enden gebunden. DNA-Fragmente, die an Digoxigenin-konjugierte Nukleotide gebunden haben, können im nächsten Schritt Anti-Digoxigeninantikörper, welche an Reportermoleküle für die Peroxidase gekoppelt sind, binden. Die Detektion erfolgt mittels Peroxidase-Farbsubstrat.

Vor Beginn der Färbung wurden die unter Abschnitt 2.6.2 beschriebenen Lösungen hergestellt. Gefärbt wurden Objektträger mit Kryoschnitten der Sektionen 1-8 (siehe Abschnitt 2.6.3). Nachdem diese für 30 min bei RT aufgetaut wurden, wurden die Schnitte mit einem Fettstift umrandet und für zweimal zwei Minuten in 1x PBS im Färbetrog gewaschen. Die Permeabilisierung erfolgte in einem vorgekühlten (-20°C) Ethanol-Essigsäure-Gemisch für 5 min bei -20°C. Nach zwei weiteren fünfminütigen Waschschritten in 1x PBS, erfolgte das Quenching der endogenen Peroxidase mittels direkter Zugabe der 3%igen Wasserstoffperoxidlösung (in 1x PBS) für 5 min um eine unspezifische Farbentwicklung zu vermeiden. Es wurde erneut für zweimal fünf Minuten mit 1x PBS gewaschen. Die überschüssige Flüssigkeit wurde vorsichtig abgesaugt und 75 µl des Equilibrierungspuffers für 5 Minuten auf jeden Objektträger gegeben. Nachdem die überschüssige Flüssigkeit entfernt wurde, wurden die Schnitte für 60 min bei 37°C in der Feuchtkammer in 55 µl TdT (*terminal desoxynucleotidyl transferase*)-Enzymlösung (siehe Abschnitt 2.6.2) pro Objektträger inkubiert. In der Enzymlösung waren neben des TdT-Enzyms Nukleotide enthalten, welche zum Teil an Digoxigenin gekoppelt waren. Mithilfe des TdT-Enzyms wurden diese wie oben beschrieben an die freien 3'-OH-Ende der fragmentierten DNA gebunden. Diese Reaktion wurde durch Zugabe des Stopp-/Waschpuffers (1:35 in dH₂O verdünnt) abgestoppt. Nach 10 min wurden drei Waschschrritte für je 1 min in 1x PBS durchgeführt, bevor 65 µl des Anti-Digoxigenin-Peroxidasekonjugats pro Objektträger zugegeben und für 30 min in der Feuchtkammer bei RT inkubiert wurden. Im Anschluss wurde erneut vier Mal für je 2 min gewaschen. Die Farbentwicklung wurde durch Zugabe von 75 µl des Peroxidasesubstrats (siehe Abschnitt 2.6.2) pro Objektträger gestartet. Nach 8 min wurde die Färbung durch dreimaliges

Waschen mit demineralisiertem Wasser gestoppt und anschließend die Objektträger in Aquatex eingedeckelt. Bei jeder Färbung wurde eine eigens frisch hergestellte Positivkontrolle aus Herzgewebe mitgeführt. Für die Herstellung der Positivkontrolle wurden aufgetaute Kryoschnitte für 5 min in DN-Puffer (Herstellung siehe Abschnitt 2.6.2) bei RT vorinkubiert. Die Fragmentierung der DNA erfolgte durch Zugabe von DNase I-Lösung (Aktivität von 2.000 U / ml, siehe Abschnitt 2.6.2) für 10 min. Anschließend wurde die Positivkontrolle fünfmal für jeweils 3 min in demineralisiertem Wasser gewaschen und bis zur TUNEL-Färbung mit 1x PBS überschichtet.

Die Auswertung erfolgte am Mikroskop (Axiovert 200M), wobei TUNEL-positiv gefärbte Kerne in 6 repräsentativen Bildern (3x Rand, 3x Zentrum der Herzsektion) pro Maus gezählt wurden. Die Gesamtzahl an Zellkernen wurde durch Färbung des jeweiligen Folgeschnittes mit Hämatoxylin (siehe Abschnitt 2.6.5) im identischen Ausschnitt ermittelt.

2.6.7 Kernfärbung mit PermaFluor/Hoechst

Mithilfe der unter Abschnitt 2.2.2.4 beschriebenen, fluoreszierenden ROSA26 Cre-Reportermausen konnte die Spezifität und Effizienz der Rekombination im Herzen visualisiert werden. Die Durchführung der Gewebeentnahme, die Einbettung und die Anfertigung von Kryoschnitten sind unter Abschnitt 2.6.3.1 detailliert beschrieben. Um unter dem Fluoreszenzmikroskop die Zellnuklei sichtbar zu machen, wurde eine Kernfärbung mit PermaFluor/Hoechst lichtgeschützt durchgeführt. Zuerst wurden die Kryoschnitte für 30 min bei RT aufgetaut und dann für zweimal 5 min in 1x PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Objektträger mit 150 µl der PermaFluor/Hoechst-Lösung (Herstellung siehe Abschnitt 2.6.2) auf einem Deckgläschen luftblasenfrei eingedeckelt. Die Objektträger wurden für 24 Stunden bei RT im Dunkeln gelagert. Die Visualisierung der Schnitte erfolgte am ApoTome in den Kanälen FITC (λ_{Ex} 495 nm / λ_{Em} 517 nm), DAPI (λ_{Ex} 358 nm / λ_{Em} 463 nm) und Cy3 (λ_{Ex} 549 nm / λ_{Em} 562 nm).

2.7 Proteinanalytische Methoden

2.7.1 Material und Substanzen

Material/Substanz/Kit	Bestellnummer	Hersteller
Acrylamid (Rotiphorese)	3029.2	Carl Roth
Ammoniumperoxosulfat (APS)	9592.2	Carl Roth
Bromphenolblau	15375	Serva
Coomassie-Brilliant-Blue	3862.2	Carl Roth

Dithiothreitol (DTT)	6908.1	Carl Roth
Ethanol, absolut	32205	Sigma-Aldrich
Filterpapiere (0,35 mm, Western Blot)	CL67.1	Carl Roth
Glycerin	3783.1	Carl Roth
Glycin	3908.3	Carl Roth
High sensivity mouse cTnI ELISA Kit	2010-1-HS	Life diagnostics
Isopropanol	6752.3	Carl Roth
Methanol	4627.5	Carl Roth
Milchpulver	T145.3	Carl Roth
Natriumazid (NaN ₃)	K305	Carl Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	6367.2	Carl Roth
Phosphataseinhibitor Cocktail 2	P5726-5	Sigma-Aldrich
Phosphataseinhibitor Cocktail 3	P0044-5	Sigma-Aldrich
Phosphorsäure (84,5 %)	6366.1	Carl Roth
Polysorbat 20 (Tween 20)	9127.1	Carl Roth
Proteinmarker IV	27-2110	VWR PeqLab
PVDF-Membran (Immobilion Millipore)	T831.1	Carl Roth
Rinderserumalbumin (BSA)	8076.2	Carl Roth
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	5136.2	Carl Roth
Sterilfilter	BT25	Sarstedt
Tetramethylethylendiamid (TEMED)	263.3	Carl Roth
TRIS	5429.3	Carl Roth
UV-Küvetten	0030106300	Eppendorf
β-Mercaptoethanol	4227.1	Carl Roth
ε-Aminocaprinsäure	A2504	Sigma-Aldrich

Primärantikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller (Bestellnummer)
Anti-cGKI _{α/β}	Rabbit	1:500	Prof. Franz Hofmann, TU München
Anti-MnSOD	Rabbit	1:2000	Enzo Life Sciences (ADISOD110J)
Anti-CuZnSOD	Rabbit	1:2000	Enzo Life Sciences (ADISOD101J)
Anti-HSP60	Rabbit	1:200	Santa Cruz (sc-13966)
Anti-p44/42 MAPK (ERK)	Rabbit	1:1000	Cell Signaling (#9102)
Anti-p-p44/42 MAPK (p-ERK) (Thr ₂₀₂ /Tyr ₂₀₄)	Rabbit	1:1000	Cell Signaling (#9101)
Anti-Akt	Rabbit	1:1000	Cell Signaling (#9272)
Anti-p-Akt (Ser ₄₇₃) XP	Rabbit	1:1000	Cell Signaling (#4060)
Anti-VASP	Rabbit	1:500	Cell Signaling (#3132)
Anti-p-VASP (Ser ₂₃₉)	Maus	1:500	Enzo Life Sciences (ALX804240C100)

Sekundärantikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller (Bestellnummer)
Anti-Maus Cy3 ECL Plex	Ziege	1:2500	GE Healthcare (PA43009)
Anti-Rabbit Cy5 ECL Plex	Ziege	1:2500	GE Healthcare (PA40511)

2.7.2 Puffer und Lösungen

1 M TRIS-HCl pH 8,3	
TRIS	121,14 g
dH ₂ O	ad 1000 ml
▶ auf pH 8,3 einstellen	

200 mM PMSF	
PMSF	348,4 mg
Ethanol (100 %)	10 ml
▶ Lagerung bei -20°C	

MATERIAL UND METHODEN

0,6 M TRIS-HCl pH 6,8

TRIS	121,14 g
dH ₂ O	<i>ad</i> 1000 ml

▶ auf pH 6,8 einstellen

SDS-Lysepuffer

1 M TRIS-HCl pH 8,3	210 µl
SDS (10 %)	670 µl
β-Mercaptoethanol	170 µl
PMSF (200 mM)	20 µl
Phosphataseinhibitor Cocktail 2	100 µl
Phosphataseinhibitor Cocktail 3	100 µl
dH ₂ O	<i>ad</i> 10 ml

Bradford-Lösung

Coomassie-Brilliant-Blue	100 mg
Phosphorsäure (84,5 %)	100 ml
Ethanol (100 %)	50 ml
dH ₂ O	<i>ad</i> 1000 ml

SDS (10 %)

SDS	10 g
dH ₂ O	<i>ad</i> 100 ml

Trenngel 12,5 %

Acrylamid (Rotiphorese)	3,55 ml
1,8 M TRIS-HCl pH 6,8	1,80 ml
dH ₂ O	3,15 ml
SDS (10 %)	83,5 µl
TEMED	10,0 µl
APS (30 %)	33,3 µl

Für 2 Gele

10x Elphor

TRIS	30 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
dH ₂ O	<i>ad</i> 1000 ml

▶ auf pH 8,3 einstellen

▶ 1:10 Verdünnung für 1x Elphor

1,8 M TRIS-HCl pH 8,8

TRIS	121,14 g
dH ₂ O	<i>ad</i> 1000 ml

▶ auf pH 8,8 einstellen

4x Laemmli

SDS	2,25 g
TRIS	1,20 g
Glycerin	20 ml
Bromphenolblau	6 mg
dH ₂ O	<i>ad</i> 50 ml

▶ auf pH 6,7 einstellen

4x Laemmli mit DTT

4x Laemmli	1,5 ml
DTT (1 M)	75 µl

APS (30 %)

APS	3 g
dH ₂ O	<i>ad</i> 10 ml

Sammelgel 5 %

Acrylamid (Rotiphorese)	0,83 ml
0,6 M TRIS-HCl pH 6,8	0,50 ml
dH ₂ O	3,60 ml
SDS (10 %)	50,0 µl
TEMED	10,0 µl
APS (30 %)	16,6 µl

10x TBST

TRIS	12,1 g
NaCl	82,3 g
Tween 20	5 ml
dH ₂ O	<i>ad</i> 1000 ml

▶ auf pH 8,0 einstellen

▶ 1:10 Verdünnung für 1x TBST

▶ steril filtrieren

Anodenpuffer I	
TRIS	36,3 g
Methanol	200 ml
dH ₂ O	<i>ad</i> 1000 ml
▶ auf pH 10,4 einstellen	

Anodenpuffer II	
TRIS	3,6 g
Methanol	200 ml
dH ₂ O	<i>ad</i> 1000 ml
▶ auf pH 10,4 einstellen	

Kathodenpuffer	
TRIS	3,0 g
6-Aminocaprinsäure	5,8 g
Methanol	200 ml
dH ₂ O	<i>ad</i> 1000 ml
▶ auf pH 7,6 einstellen	

Antikörperverdünnungslösung	
NaN ₃	0,05 g
BSA	5 g
1x TBST	<i>ad</i> 100 ml

Blockierlösung	
Milchpulver	5 g
1x TBST	<i>ad</i> 100 ml

2.7.3 Proteinisolation aus Herzlysat

Für die Proteinisolation aus Herzgewebe wurde direkt nach der Herzentnahme der ischämische Teil unterhalb der Ligatur vom restlichen Herzen separiert und mit 400 µl SDS (Natriumdodecylsulfat)-Lysepuffer (siehe Abschnitt 2.7.2) versetzt. Das SDS sorgt für die Denaturierung der Proteine, in dem es die Quartär- und Tertiärstrukturen zerstört. Das enthaltene β-Mercaptoethanol reduziert Disulfidbrücken zu freien Thiolen und unterstützt damit den Denaturierungsprozess. Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) verhindert als unspezifischer Inhibitor von Serinproteasen die Proteindegradation. Die Isolation für die Proteinbestimmung nach basaler Herzentnahme wurde entsprechend durchgeführt. Das Herz wurde direkt mit einem Homogenisator für 90 s homogenisiert und anschließend für 1 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 95°C zur vollständigen Denaturierung erhitzt. Nach kurzem Vortexen wurde für 5 min bei 13.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bis zu weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.7.4 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Methode der Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford 1976) beruht auf den hydrophoben und ionischen Wechselwirkungen des Triphenylmethanfarbstoffes Coomassie-Brilliant-Blau mit kationischen Aminogruppen basischer Proteinseitenketten.

Die photometrische Erfassung gelingt durch die Verschiebung des Absorptionsmaximums von 479 nm (rot) zu 595 nm (blau) bei sauren pH-Werten. Für die Messung wurden die Herzlysate 1:100 mit deionisiertem Wasser vorverdünnt. 100 µl dieser Verdünnung wurden mit 1 ml Bradford Lösung (siehe Abschnitt 2.7.2) in einer Messküvette vereinigt und für 5 min lichtgeschützt stehen gelassen. Die Vermessung erfolgte in Triplets am Nanodrop bei 595 nm gegen eine mit BSA erstellte, nicht lineare Eichkurve. Als Leerwert wurde statt der Probenlösung 100 µl deionisiertes Wasser eingesetzt. Mit den erhaltenen Werten an Gesamtprotein konnte sichergestellt werden, dass im Nachfolgenden ein gleichmäßiger Proteinauftrag erfolgte.

Die Probenvorbereitung erfolgte durch Verdünnung des Proteinlysats auf eine Proteingesamtmenge von 75 µg pro Geltasche (20 µl). Bei der Berechnung wurde die Zugabe des Probenpuffers 4x Laemmli (siehe Abschnitt 2.7.2) berücksichtigt. Der Probenpuffer enthielt neben dem Farbstoff Bromphenolblau, welcher im Acrylamidgel die Lauffront der Proteine markiert, Glycerin, das durch Erhöhung der Probendichte ein Absinken der Probe in die Geltasche ermöglicht. Zudem wurde der Probenpuffer mit Dithiothreitol (DTT) 1:20 versetzt, welches Proteinstrukturen durch Reduktion der Disulfidbrücken instabilisiert. Zur vollständigen Zerstörung der Sekundär- und Tertiärstrukturen wurden die Proben vor dem Gelauftrag 5 min bei 95°C inkubiert.

2.7.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichts wird mit der Durchführung einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ermöglicht (Laemmli 1970). Die Herstellung der Polyacrylamidgele erfolgt durch radikalische Polymerisation von Acrylamid und Bisacrylamid. Dabei fungiert letzteres als Quervernetzer der linearen Polyacrylamidketten. Als Radikalstarter wird Ammoniumperoxodisulfatlösung (APS) eingesetzt. Das zugegebene Tetramethyldiamin (TEMED) wirkt als Polymerisierungskatalysator. Durch die Zugabe von SDS wird die Eigenladung der Proteine maskiert, so dass die Proteine entsprechend ihrer Molekülmasse aufgetrennt werden. Die Auftrennung erfolgt dabei nach dem Molekularsiebeffekt, d.h. kleinere Moleküle wandern schneller durch die Gelmatrix als große. Die Herstellung eines Polyacrylamidgels erfolgte durch Gießen des noch flüssigen Trenngels (Zusammensetzung siehe Abschnitt 2.7.2) zwischen zwei Glasplatten, gefolgt von einer Überschichtung mit Isopropanol, durch welche eine gerade Oberfläche des Trenngels erreicht wurde. Nach erfolgter Auspolymerisation (ca. 60 min) wurde das Isopropanol entfernt und das Trenngel mit dem 5%igen Sammelgel (siehe Abschnitt 2.7.2)

überschichtet. In das noch flüssige Sammelgel wurde der Kamm für die Aussparung der Probenaschen platziert. Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels (ca. 60 min) wurden die Gele entweder direkt verwendet oder über Nacht bei 4°C feucht gelagert.

Die Gele wurde in die Laufkammer eingebaut und die Proben (siehe Abschnitt 2.7.4) mithilfe einer Hamiltonspritze aufgetragen. Als Längenstandard mit definierten, gefärbten Proteinfragmenten wurde Proteinmarker IV eingesetzt. Die Kammer wurde bis zur Markierung mit Laufpuffer (1x Elphor, Zusammensetzung siehe Abschnitt 2.7.2) gefüllt und die Elektrophorese bei einer Spannung von 80 V gestartet. Nachdem die Proben das Sammelgel, welches eine Fokussierung der Proteine ermöglicht, durchlaufen hatten, wurde die Spannung auf 120 V erhöht.

2.7.6 Semi-Dry Western Blot

Das Semi-Dry Western Blot-Verfahren dient zur exakten Übertragung der Proteinbanden von einer SDS-Page auf eine Trägermembran. Hierfür wurden die platinbeschichteten Trägerelektroden der Western Blot-Apparatur befeuchtet. Drei in Anodenpuffer I und zwei in Anodenpuffer II getränkte Filterpapiere wurden auf der Anodenplatte geschichtet. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen sind unter Abschnitt 2.7.2 aufgeführt. Die hydrophobe Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran wurde kurz in Methanol aktiviert und auf den Filterpapieren platziert. Das Gel wurde aus den Glasplatten ausgebaut und auf der Membran positioniert. Es folgte die Überschichtung mit fünf in Kathodenpuffer (siehe Abschnitt 2.7.2) getränkten Filterpapieren. Bei dieser Prozedur entstandene Luftblasen wurden direkt entfernt. Die Kathodenplatte wurde auf dem Stapel ausgerichtet und beschwert. Der Proteintransfer erfolgte für 60 min bei 60 mA pro Gel, gefolgt von 20 min bei 90 mA pro Gel. Im Anschluss wurde die Membran kurz in 1x TBST gelegt bevor sie für 60 min in Blockierlösung (siehe Abschnitt 2.7.2) auf einem Schüttler inkubiert wurde um unspezifische Bindungen zu verhindern. Nachdem dreimal für jeweils 10 min mit 1x TBST gewaschen wurde, wurde die Membran über Nacht bei 4°C in der primären Antikörperlösung (Verdünnung der primären Antikörper siehe Abschnitt 2.7.1, Herstellung der Antikörperverdünnungslösung siehe Abschnitt 2.7.2) inkubiert. Um auf der gleichen Membran mehrere Proteine gleichzeitig detektieren zu können, wurden einige Membranen mit einem Skalpell geteilt und die Membranstücke in verschiedenen primären Antikörperlösungen inkubiert. Es folgten drei Waschschrte von je 10 min in 1x TBST bevor die Membran lichtgeschützt in der sekundären Antikörperlösung (Cy3 bzw. Cy5 1:2500 in 1x TBST, siehe Abschnitt 2.7.1) für 60 min bei RT inkubiert wurde. Nach dreimaligem fünfminütigen Waschen wurde die Membran unter Vermeidung einer

Lichtexposition zwischen Tüchern getrocknet. Die Detektion der Banden erfolgte am EttanDige Imager und am Amersham Imager 600. Für die Quantifizierung der Proteinbanden wurde die Software ImageQuant TL 7 verwendet.

2.7.7 ELISA zur Bestimmung von kardialem Troponin I

Die Bestimmung von kardialem Troponin I (cTnI) aus dem Serum dient in der Diagnostik als weiterer, unabhängiger Marker für einen Myokardinfarkt. Es wurde ein speziell für Mausserum entwickeltes ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)-Kit von Life Diagnostics verwendet. Das Prinzip dieses Sandwich-ELISAs beruht auf der Verwendung zweier Antikörper. Der Fangantikörper bindet cTnI an die 96 Wellplatte, wohingegen der Detektionsantikörper an das Enzym der Meerrettichperoxidase (HRP, *horseradish peroxidase*) konjugiert ist. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) stellt ein Substrat der HRP dar und färbt sich nach Aktivierung bei einem Absorptionsmaximum von 650 nm blau. Die Stopplösung des ELISA-Kits enthält Schwefelsäure, welche das TMB bei 450 nm in ein gelbes Chromogen umwandelt.

Da in Vorversuchen festgestellt werden konnte, dass cTnI Matrix-abhängig abgebaut wird, wurde als Verdünnung des Standards ein Pool aus basalem Mäuseserum verwendet, welches zuvor 8-10 Wochen alten, gesunden Tieren abgenommen und aufbereitet wurde. Für die Messung wurden die Serumproben am Vorabend von -80°C auf -20°C gestellt (Gewinnung der Proben und Durchführung der Serumherstellung siehe Abschnitt 2.5.3.4). Der 20-fach konzentrierte Waschpuffer wurde entsprechend 1:20 mit deionisiertem Wasser verdünnt. Die Serumproben wurden bei 4°C aufgetaut, alle Verdünnungsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Bei den Serumproben etablierte sich eine 1:5 Verdünnung mit dem Diluent. Für die Standardreihe wurde der zuvor gewonnene Serumpool entsprechend den Serumproben 1:5 mit dem Diluent verdünnt und diente zu Verdünnung der Standardreihe. Eine Verdünnung von 77,8 µl der cTnI-Stocklösung mit 422,2 µl der Serum-/Diluent-Lösung entsprach einer Konzentration von 10 ng/ml (Standard 1). Für die Herstellung von Standard 2 (5 ng/ml) wurden 250 µl des Standards 1 in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 250 µl der Serum-/Diluent-Lösung zupipettiert. Entsprechend wurde die Verdünnungsreihe für Standard 3 (2,5 ng/ml) bis 7 (0,156 ng/ml) durchgeführt. Als Leerwert wurde die Serum-/Diluent-Lösung ohne Zugabe von cTnI verwendet. Mit einer Multikanalpipette wurden je 100 µl des HRP-Konjugats pro Well der 96-Wellplatte vorgelegt. Dann wurden die verdünnten Serumproben, die Standardreihe und der Leerwert mit jeweils 100 µl schnell zupipettiert und im Well kurz gemischt. Hierbei wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Wells der Platte wurden mit

einer selbstklebenden Folie luftdicht verschlossen und für 60 min auf dem Schüttler bei RT inkubiert. Anschließend wurde mithilfe der Multikanalpipette fünfmal mit je 300 μ l Waschpuffer pro Well gewaschen. Zum Starten der Farbreaktion wurden in jedes Well 100 μ l TMB-Substrat pipettiert und die Platte für 15 s am ELISA-Reader (Tecan Infinite F200) geschüttelt. Die Platte wurde sofort mit Alufolie abgedunkelt und auf dem Schüttler inkubiert. Die Farbreaktion wurde nach ca. 12 min in Abhängigkeit vom Gelbton des Standards 1 mit je 100 μ l Stopplösung abgestoppt und sofort am ELISA-Reader bei 450 nm vermessen.

2.8 Statistik

Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Für die statistische Auswertung zweier Wertegruppen (Genotypen: CTR *versus* KO; Setups: I/R *versus* I/R + Konditionierung) wurde ein zweiseitiger Student-t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Wurden mehr als zwei Wertegruppen untereinander verglichen, wurde zusätzliche eine einfaktorielle Varianzanalyse (one-way ANOVA) mit nachfolgendem Tukey-Test angewendet. Genotypspezifische Differenzen nach Pharmakongabe in der Überlebenszeit (Kaplan-Meier-Kurve, Abbildung 46B) wurden mittels Log-Rang-Test/Chi-Quadrat analysiert. Für alle Testarten wurden P-Werte $< 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet. Es wurde zwischen */ \dagger $p < 0,05$, **/ \S $p < 0,01$ und ***/ $\#$ $p < 0,001$ differenziert. In den Abbildungen sind die Signifikanzlevel für den zweiseitigen Student-t-Test dargestellt. Sofern nicht anders gekennzeichnet, unterschieden sich die Gruppen nicht signifikant. Die einfaktorielle Varianzanalyse führte mit wenigen Ausnahmen zu identischen Signifikanzlevel. Unterschiede in den Signifikanzniveaus zwischen dem Student-t-Test und der einfaktoriellen Varianzanalyse ergaben sich nur für die Abbildung 32C+41D: cTnI-Messungen für BK^{+/+} und CMBK^{+fl}, jeweils I/R vs. I/R *sham*; Abbildung 45A+46B+49A,B: Applikationen der Lösungsmittel bei I/R (*ctr*¹⁻⁴), jeweils CMBK^{+fl} vs. CMBK^{-fl}; Abbildung 46C+50A: CMBK^{-fl} bei I/R vs. I/R + NS 0,3 μ M *i.a.*, I/R vs. I/R + RIO; Abbildung 48B: p-VASP bei CMBK^{-fl}, I₃₀/R₁₀ vs. basal; Abbildung 53: MitoB bei CMBK^{+fl}, I/R vs. basal, I/R vs. I/R + CIN. Diese Stichproben erreichten mit der einfaktoriellen Varianzanalyse knapp nicht das Signifikanzniveau.

3. Ergebnisse

3.1 Bestimmung der Infarktgröße und des cTnI-Serumspiegels nach akutem Myokardinfarkt in globalen BK-KO (BK^{-/-})-Mäusen

Um den Einfluss einer globalen Ausschaltung des BK-Kanals auf den I/R-Schaden *in vivo* zu untersuchen, wurden globale BK-Knockouttiere (BK-KO, BK^{-/-}) und die entsprechenden Wurfgeschwisterkontrollen (BK-WT; BK^{+/+}) dem akuten Myokardinfarktmodell von 30 min Ischämie, gefolgt von einer 120-minütigen Reperfusionphase (I/R) bzw. einer Scheinoperation (I/R *sham*) unterzogen (Durchführung siehe Abschnitt 2.5.3). Die Scheinoperation entsprach der Operationsdurchführung der I/R-Variante jedoch ohne die 30-minütige Okklusion der linken Koronararterie (LCA) und diente zum Ausschluss von genotyp- und behandlungsbedingten Gewebeschäden durch die Operationstechnik. Es wurden Mäuse beider Geschlechter im Alter von 9 bis 17 Wochen den Operationen unterzogen, wobei in keiner der untersuchten Kohorten alters- oder geschlechtsspezifische Unterschiede festgestellt werden konnten (*Daten nicht gezeigt*). Als weitere Parameter der Basalcharakteristiken sind im Anhang (Annex-Tabelle 2) die Absolutwerte der Gesamtherzfläche, des Risikoareals und der Infarktgröße in cm², sowie die Herzgewichte (HG) in Relation zu den Körpergewichten (KG) aufgelistet. Die Quotienten aus HG/KG zeigten dabei keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen und Setups. Leichte Schwankungen der Absolutwerte der untersuchten Herzareale im Vergleich zu den prozentualen Werten begründen sich zum einen durch das generell reduzierte Körpergewicht der globalen BK-KO im Vergleich zu ihren Wurfgeschwisterkontrollen (Illison et al. 2016). Zum anderen können sie durch eine ungleichmäßige Verteilung von männlichen und weiblichen Tieren in den Versuchsgruppen erklärt werden.

Eine Darstellung zur Gesamtzahl aller operierten Tiere, die nachfolgend beschrieben werden, findet sich im Anhang (Annex-Tabelle 1).

Die Größe des Risikoareals (bezogen auf die Gesamtfläche), welches den während der ischämischen Phase unterversorgten Bereich aufzeigt, wies keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Kohorten und Genotypen auf (I/R: 55,25 ± 3,44 % für BK^{+/+}, n=8; 52,36 ± 2,31 % für BK^{-/-}, n=11; I/R *sham*: 54,22 ± 2,08 % für BK^{+/+}, n=6; 50,50 ± 1,92 % für BK^{-/-}, n=6; Abbildung 32A). Somit konnten auch Unterschiede in den Infarktgrößen aufgrund einer ungleichen Lokalisation der Ligatur ausgeschlossen werden.

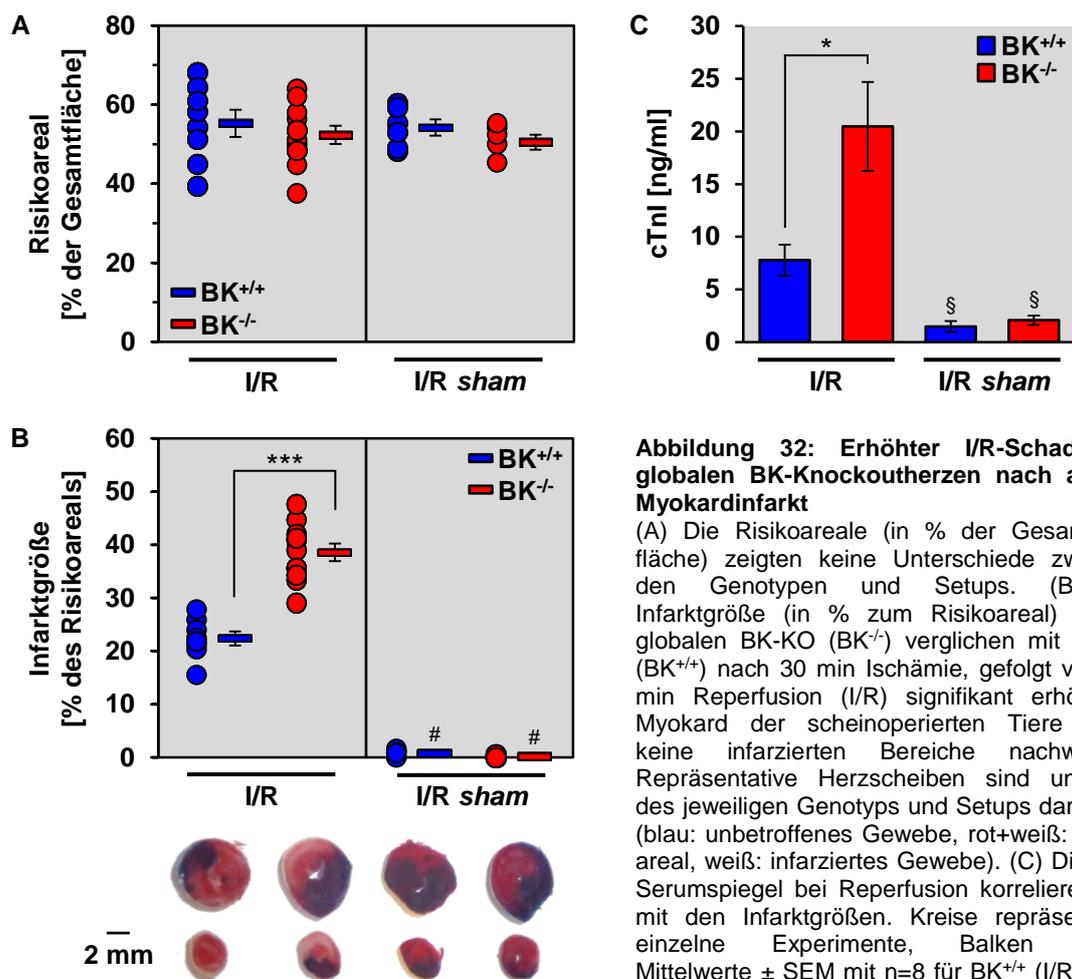


Abbildung 32: Erhöhter I/R-Schaden in globalen BK-Knockouterzen nach akutem Myokardinfarkt
 (A) Die Risikoareale (in % der Gesamtfläche) zeigten keine Unterschiede zwischen den Genotypen und Setups. (B) Die Infarktgröße (in % zum Risikoareal) war in globalen BK-KO (BK^{-/-}) verglichen mit BK-WT (BK^{+/+}) nach 30 min Ischämie, gefolgt von 120 min Reperfusion (I/R) signifikant erhöht. Im Myokard der scheinoperierten Tiere waren keine infarzierten Bereiche nachweisbar. Repräsentative Herzscheiben sind unterhalb des jeweiligen Genotyps und Setups dargestellt (blau: unbetreffenes Gewebe, rot+weiß: Risikoareal, weiß: infarziertes Gewebe). (C) Die cTnI-Serumspiegel bei Reperfusion korrelieren gut mit den Infarktgrößen. Kreise repräsentieren einzelne Experimente, Balken zeigen Mittelwerte ± SEM mit n=8 für BK^{+/+} (I/R), n=11 für BK^{-/-} (I/R) und je n=6 für I/R sham; *p<0,05, ***p<0,001 BK^{+/+} vs. BK^{-/-}; §: p<0,01, #: p<0,001 zu I/R.

In Abbildung 32B sind die Infarktgrößen bezogen auf die Größe des Risikoareals nach I/R bzw. I/R sham dargestellt. Interessanterweise zeigten die BK-KO mit $38,56 \pm 1,65$ % bereits nach I/R ohne weiteren konditionierenden Stimulus signifikant höhere Infarktgrößen verglichen mit den BK-Wildtypherzen ($22,39 \pm 1,32$ %). Die ausgeprägte Infarzierung ist zudem deutlich an der Weißfärbung der in Abbildung 32B gezeigten Herzscheiben zu erkennen. Dass durch die Operationstechnik selbst kein Gewebetod verursacht wurde, konnte durch die geringen Infarktgrößen (<1 %) in den scheinoperierten Tieren bestätigt werden (Abbildung 32B). Als unabhängiger Parameter für das Ausmaß des Myokardinfarkts wurden die Serumspiegel des kardialen Troponins I (cTnI) durch Blutabnahme der Mäuse direkt im Anschluss an die Reperfusionsphase bestimmt. Die cTnI-Serumspiegel der BK-KO waren im Vergleich zu den scheinoperierten Mäusen sowie zu den Serumtroponinwerten der BK-WT deutlich erhöht (I/R: $7,78 \pm 1,48$ ng/ml für BK^{+/+}, $20,47 \pm 4,23$ ng/ml für BK^{-/-}; I/R sham: $1,47 \pm 0,51$ ng/ml für BK^{+/+}, $2,08 \pm$

0,45 ng/ml für BK^{-/-}; Abbildung 32C), wodurch die negativen Auswirkungen der globalen BK-Kanaldeletion auf die Myokardinfarktgröße weiter bestätigt wurden.

3.2 Einfluss von Konditionierung auf das Infarktareal in globalen BK-KO

3.2.1 Mechanische Postkonditionierung (iPost)

Die ischämische Postkonditionierung (iPost) stellt im Mausmodell eine effiziente Methode zur Reduktion des I/R-Schadens dar. Die kurzen, repetitiven Episoden von Ischämie und Reperfusion unmittelbar nach dem Ende der ischämischen Phase zeigten auch hier einen überzeugenden Benefit in den BK-WT, der mit Werten aus der Literatur von Wildtypmäusen vergleichbar ist (Methner et al. 2013b). Eine iPost-stimulierte Kardioprotektion war dagegen in den BK-KO nicht erkennbar. Sie wiesen ca. 3-fach erhöhte Infarktgrößen im Vergleich zu den BK-WT auf ($11,41 \pm 0,89$ % für BK^{+/+}, n=8; $34,13 \pm 1,29$ % für BK^{-/-}, n=9; Abbildung 33A). Erneut zeigten sich weder für die Risikoareale (Annex-Abbildung 1) noch für die basalen Parameter (Annex-Tabelle 2) der Versuchsgruppen beider Genotypen nennenswerte Unterschiede nach iPost.

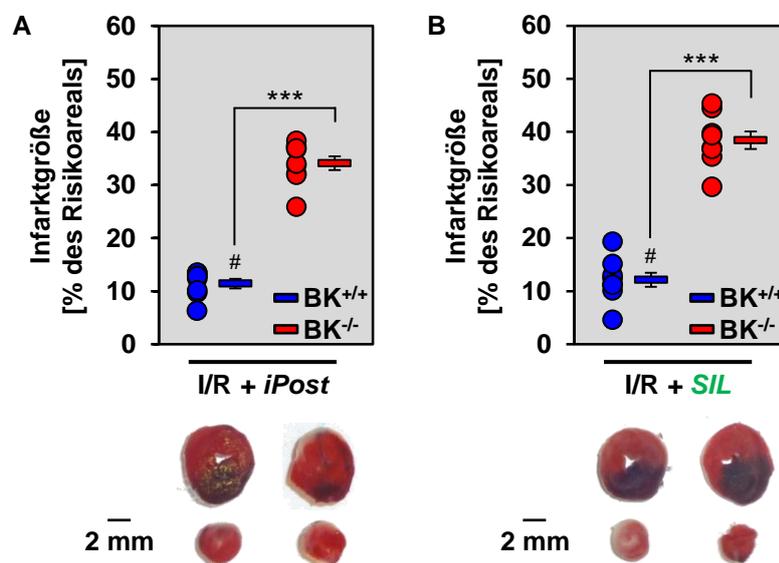


Abbildung 33: Fehlende Kardioprotektion nach iPost und nach pharmakologischer Kardioprotektion mit Sildenafil in BK-KO

(A) Die Postkonditionierung (iPost) zeigte eine signifikante Reduktion der Infarktgröße (in % zum Risikoareal) in BK-WT (BK^{+/+}, n=8), nicht aber in BK-KO (BK^{-/-}, n=9). (B) Eine Kardioprotektion durch Gabe des PDE5-Inhibitors Sildenafil (2 µg/kg KG, i.a., 5 min vor Beginn der Reperfusion) war ebenfalls nur in BK-WT möglich (je n=8). Repräsentative Herzscheiben sind unterhalb des jeweiligen Genotyps und Setups dargestellt (blau: unbeeinträchtigtes Gewebe, rot+weiß: Risikoareal, weiß: infarziertes Gewebe). Kreise repräsentieren einzelne Experimente, Balken zeigen Mittelwerte ± SEM; ***p<0,001 BK^{+/+} vs. BK^{-/-}; #: p<0,001 zu I/R.

3.2.2 Pharmakologische Konditionierung durch Sildenafilgabe

Die Möglichkeit den I/R-Schaden durch die Gabe pharmakologischer Substanzen zu reduzieren, birgt im Gegensatz zu den mechanischen Konditionierungen vermutlich größeres klinisches Potential. Aufgrund der vielen Hinweise, dass der NO/cGMP/PKG I-Signalweg in kardioprotektive Prozesse involviert ist, liegt es nahe, Pharmaka zu untersuchen, die diesen Signalweg modulieren. Sildenafil (SIL) stellt dabei einen seit vielen Jahren auf dem deutschen Arzneimittelmarkt etablierten Wirkstoff dar, dessen Infarkt-reduzierende Wirkung bei einer intraatrialen Gabe (2 µg/kg KG) 5 min vor Beginn der Reperfusion (siehe Abschnitt 2.5.3.7) im Tiermodell gezeigt wurde (Methner et al. 2013b). Diese kardioprotektiven Effekte konnten im Rahmen dieser Arbeit in den BK-WT bestätigt werden ($12,12 \pm 1,48$ % für BK^{+/+}, n=8; Abbildung 33B). Im Gegensatz dazu war in den BK-Knockouttieren kein schützender Einfluss durch die Sildenafilinjektion erkennbar. Die Infarktgrößen waren in diesen Tieren signifikant erhöht ($38,43 \pm 1,79$ % für BK^{-/-}, n=8; Abbildung 33B). Aus der Analyse der Risikoareale (Annex-Abbildung 1) und basalen Parameter (Annex-Tabelle 2) der Behandlungsgruppen ergaben sich dagegen keine Auffälligkeiten.

3.3 Folgen der kardialen I/R nach gewebespezifischer Deletion des BK-Kanals in Glattmuskelzellen (SMBK^{-fl})

Um der Frage nachzugehen, inwiefern glattmuskuläre BK-Kanäle für den offensichtlichen Verlust der Kardioprotektion verantwortlich sind, wurden Mäuse mit einer spezifischen Deletion des BK-Kanals in (vaskulären) Glattmuskelzellen generiert (SMMHC-CreER^{T2}; BK^{-fl}; SMBK^{-fl}). Die gewebe- und zeitspezifische Expression der Cre-Rekombinase erfolgte dabei mithilfe des Promotors für das Gen *Myh11*, der nur in Glattmuskelzellen aktiv ist. In diesem Mausmodell wird das vom transgenen *Myh11*-Promotor gebildete Cre-Fusionsprotein (SMMHC-CreER^{T2}) außerdem posttranslational durch einen synthetischen Liganden (*hier*: Tamoxifen) aktiviert (Wirth et al. 2008). Das SM-Knockoutallel für BK (-) wurde dabei durch Kreuzung von SMMHC-CreER^{T2}-Tieren mit Mäusen, die ein konditionales BK-Allel (fl) tragen, und anschließender Induktion der Cre-Rekombinase mit Tamoxifen (TAM) generiert (siehe Abschnitt 2.2.2.3). Nach fünftägiger Tamoxifengabe wurde ein Zeitintervall von sieben Tagen abgewartet bevor die Tiere für die Versuche verwendet wurden. Dies sollte die effiziente Deletion des glattmuskulären BK-Kanals gewährleisten (Sprossmann et al. 2009). Wie bereits unter Abschnitt 2.2.2.3 beschrieben, konnten aufgrund der Y-chromosomalen Lokalisation des Transgens hierfür nur männliche Tiere verwendet werden. Die Spezifität der SMMHC-CreER^{T2}-vermittelten

ERGEBNISSE

Rekombination wurde mittels PCR-Analyse mit den entsprechenden BK-Primern in verschiedenen Geweben überprüft (Durchführung siehe Abschnitt 2.3.5). Korrespondierende Gewebe von Mäusen, die nicht mit TAM induziert wurden, wurden zu Kontrollzwecken parallel analysiert. Wie erwartet erfolgte die Rekombination ausschließlich in der Aorta der TAM-injizierten Mäuse (132 bp; roter Pfeil, Abbildung 34). In allen anderen untersuchten Geweben wie dem Gehirn, der Leber und Skelettmuskulatur, sowie dem Herzen und weißem Fettgewebe blieb neben dem Wildtypallel (466 bp) auch das konditionale BK-Allel (577 bp) unverändert. Die in Abbildung 34 erkennbare Doppelbande für das gefloخته BK-Allel ist auf eine palindromische Abfolge der DNA der loxP-Sequenz zurückzuführen. Diese kann einen sog. „Hairpin“ ausbilden. Die im Rahmen dieser Arbeit für die PCR-Analyse verwendeten Primer lagern sich über die loxP-Sequenz an die DNA an, wodurch zum einen der längere DNA-Abschnitt ohne Hairpin sowie zum anderen die durch den Hairpin verkürzte Sequenz amplifiziert werden.

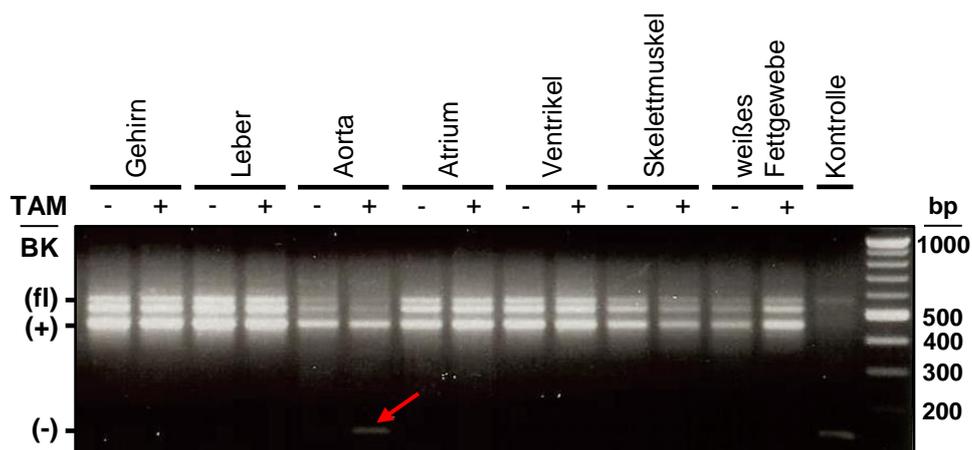


Abbildung 34: PCR-Analyse der SMMHC-CreER^{T2}-induzierten Deletion des BK-Kanals in glattmuskulären Geweben

Die PCR-Analyse verschiedener Gewebe in SMMHC-CreER^{T2}; BK^{+fl} ± Tamoxifen (TAM)-Injektion zeigte, dass die Rekombination des gefloخته Allels (fl) in ein KO-Allel (-) exklusiv in der Aorta in TAM-injizierten Tieren erfolgte (roter Pfeil); BK (+): 466 bp, BK (-): 132 bp, BK (fl): 577 bp.

Im akuten Myokardinfarktmodell zeigte sich in den 9 bis 12 Wochen alten gewebespezifischen Mutanten sowie deren Wurfgeschwisterkontrollen weder für die Risikoareale (I/R: 61,12 ± 2,65 % für SMBK^{+fl}; 59,10 ± 1,77 % für SMBK^{-fl}; I/R + *iPost*. 55,57 ± 1,72 % für SMBK^{+fl}; 61,77 ± 2,99 % für SMBK^{-fl}; je n=6; Abbildung 35A) noch in den Basalcharakteristiken (Annex-Tabelle 3) ein Unterschied zwischen den Genotypen und Setups.

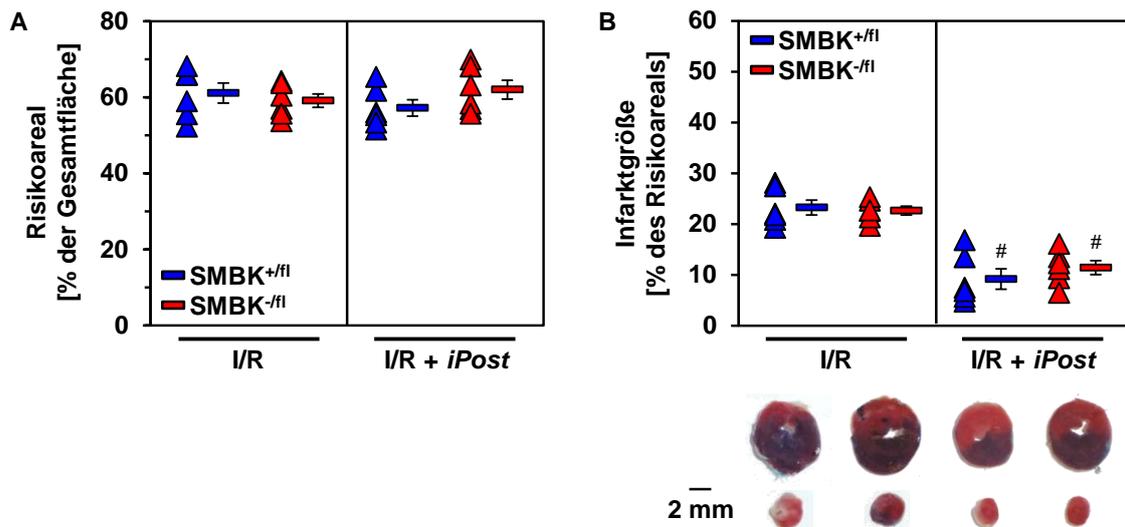


Abbildung 35: Unbeeinflusste Infarktgröße nach Ausschaltung des BK-Kanals in Glattmuskelzellen
 (A) Die Risikoareale (in % zur Gesamttherzfläche) waren unverändert zwischen den Genotypen und Setups. (B) Die Größen der infarzierten Bereiche (in % zum Risikoareal) wiesen zwischen SMBK-KO (SMBK^{-fl}) und ihren Wurfgeschwisterkontrollen (SMBK^{+fl}) keine Unterschiede nach I/R auf. Eine Kardioprotektion durch iPost war ebenfalls in beiden Genotypen möglich. Repräsentative Herzscheiben sind unterhalb des jeweiligen Genotyps und Setups dargestellt (blau: unbeeinträchtigtes Gewebe, rot+weiß: Risikoareal, weiß: infarziertes Gewebe). Dreiecke stehen für einzelne Experimente, Balken zeigen Mittelwerte ± SEM mit je n=6; #: p<0,001 zu I/R.

Der in Glattmuskelzellen lokalisierte BK-Kanal, dem sowohl eine große Bedeutung bei der Blutdruckregulation als auch bei der durch mechanische Konditionierung induzierten Hyperämie während der Reperfusionphase zugeschrieben wird (Sausbier et al. 2005, Soltysinska et al. 2014), scheint beim akuten Myokardinfarkt keine Rolle zu spielen. So wiesen SMBK-KO unter I/R die gleiche Infarktgröße wie die Wurfgeschwisterkontrollen auf (23,27 ± 1,49 % für SMBK^{+fl}; 22,68 ± 0,85 % für SMBK^{-fl}; Abbildung 35B). Auch die Kardioprotektion durch die iPost war von einer Deletion des SM-BKs unbeeinflusst, da in beiden Genotypen eine effiziente Reduktion der infarzierten Areale zu beobachten war (9,21 ± 1,98 % für SMBK^{+fl}; 11,46 ± 1,36 % für SMBK^{-fl}; Abbildung 35B).

3.4 Spezifität und Effizienz der αMHC-Cre-Rekombinase

Der Einsatz von αMHC-Cre-transgenen Mäuse stellt eine verbreitete und vielversprechende Strategie dar um gezielt die Ausschaltung von Genen (*hier*: BK) in Kardiomyozyten zu erreichen (Agah et al. 1997). Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete αMHC-Cre-Rekombinase ist konstitutiv aktiv und benötigt im Gegensatz zur SMMHC-CreER^{T2} (siehe Abschnitt 2.2.2.3) keine Aktivierung durch einen Liganden. Die Spezifität der αMHC-Cre-Rekombinase wurde durch Verpaarung mit Reporterlinien (ROSA^{mTg/+}, siehe Abschnitt 2.2.2.4) verifiziert. Als Nachweis für die Kardiomyozyten-

spezifische Expression der Cre-Rekombinase diente die Exzision eines geflochten DNA-Abschnitts, der für das rot fluoreszierende, membranständige Protein (mT) kodiert. Dies sollte zur Expression eines grün fluoreszierenden Proteins (mG) exklusiv in den Kardiomyozyten führen (siehe auch Abbildung 13). Hierfür wurden wie unter Abschnitt 2.6.3 beschrieben Kryoschnitte von ROSA^{mTG/+}; αMHC-Cre^{Tg/+} bzw. ROSA^{mTG/+}; αMHC-Cre^{+/+}-Herzen angefertigt und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

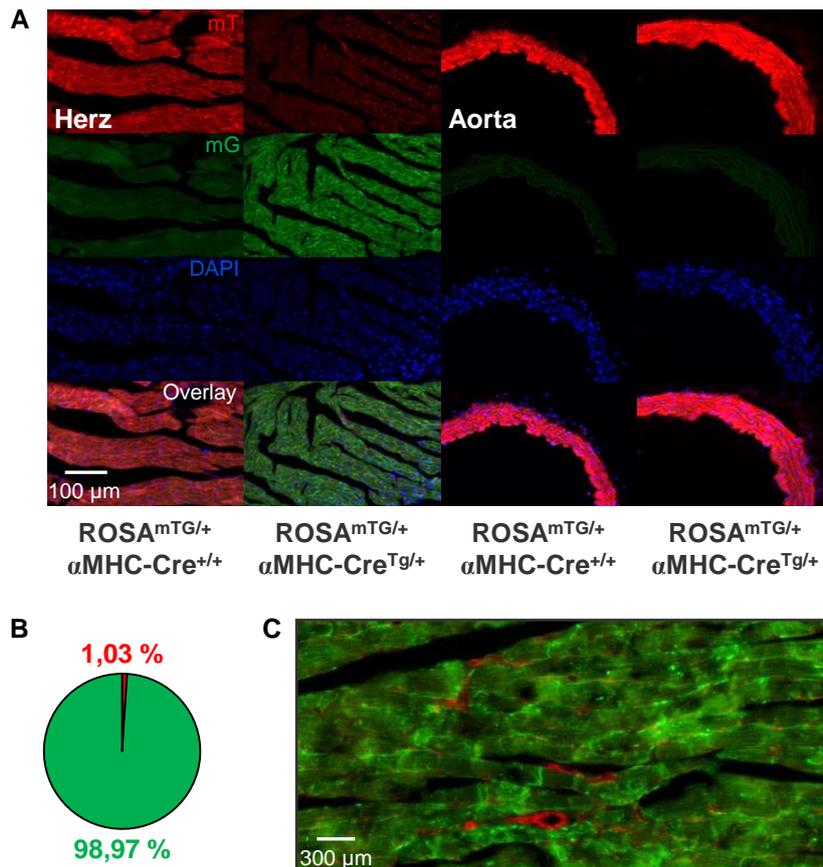


Abbildung 36: Hohe Spezifität und Effizienz der αMHC-Cre-Rekombinase
 (A) Die Kreuzung von αMHC-Cre^{Tg/+}-Tieren mit doppel-fluoreszenten ROSA26-Reportermäusen (ROSA^{mTG/+}) belegt die spezifische Aktivität der Cre-Rekombinase in den Kardiomyozyten der doppeltransgenen Tiere (Grünfärbung). In den Glattmuskelzellen der Aorta war dagegen keine Rekombinationsaktivität nachweisbar. (B) Die Effizienz der Rekombination war mit ca. 99 % sehr hoch (n=4; 1652 gesamt gezählte Kardiomyozyten). (C) Repräsentativer Ausschnitt, der die durch Rekombination grünen Kardiomyozyten und die rotgefärbt verbleibenden nicht-kardiomyozytären Zellen u.a. Glattmuskelzellen kardialer Blutgefäße, sowie eventuell auch Fibroblasten darstellt.

Die Erwartungen wurden in Abbildung 36A bestätigt. Herz und Aorta von Reporter-mäusen, die keine αMHC-Cre-Rekombinase (ROSA^{mTG/+}; αMHC-Cre^{+/+}) exprimieren, präsentierten sich mit einer persistierenden roten Fluoreszenz. Kryoschnitte der Aorta dienten hier als Kontrollgewebe für die αMHC-Cre-vermittelte Rekombination im kardiovaskulären System. Doppeltransgene Tiere (ROSA^{mTG/+}; αMHC-Cre^{Tg/+}) zeigten dagegen eine eindrucksvolle Grünfärbung im Herzen, wohingegen die rote Fluoreszenz in der Aorta erwartungsgemäß erhalten blieb. Die schwach erkennbare Grünfärbung aller Gewebe ist auf die Autofluoreszenz der Gewebe zurückzuführen, da sie auch in ROSA^{+/+}-Tieren zu beobachten war (*Daten nicht gezeigt*). Die parallel durchgeführte Kernfärbung mittels DAPI verdeutlicht zusätzlich die vergleichbare Gewebestruktur zwischen den Genotypen. Letztlich ließ sich mit einem rekombinanten Anteil von ca. 99 %

bei 1652 gezählten Kardiomyozyten eine hohe Rekombinationseffizienz der α MHC-Cre in den Kardiomyozyten ermitteln (Abbildung 36B). Die Rekombination war dabei spezifisch und auf die Kardiomyozyten beschränkt, da nicht-kardiomyozytäre Zellen wie beispielsweise Blutgefäße, welche das Herzgewebe durchzogen, eine deutliche Rotfärbung aufwiesen (Abbildung 36C).

Die Analyse der Reportermäuse (Abbildung 36) wurde durch PCR-Analysen der α MHC-Cre-induzierten Deletion des BK-Kanals im Herzen und in Kontrollgeweben ergänzt. Sowohl im Atrium und Ventrikel als auch in isolierten Kardiomyozyten (CM) ließ sich die erfolgreiche Generierung des BK-Knockoutallels in den α MHC-Cre^{Tg/+}-Mäusen zeigen (132 bp, roter Pfeil, Abbildung 37). Als Kontrollen wurden Gewebeproben vom Skelettmuskel und weißes Fettgewebe (Abbildung 37), sowie von Gehirn, Leber und der Aorta (*Daten nicht gezeigt*) entnommen. Diese wiesen neben dem BK-Wildtypallel (466 bp) nur das unveränderte geflochte BK-Allel (577 bp) auf.

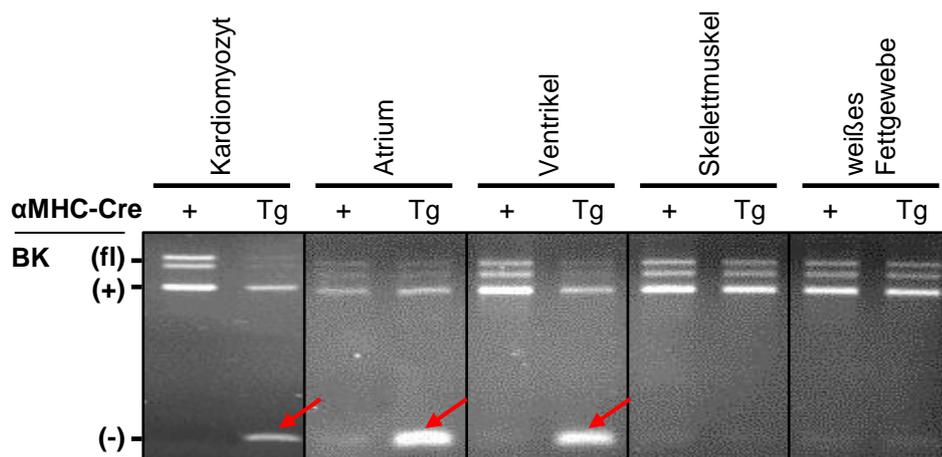


Abbildung 37: PCR-Analyse der α MHC-Cre-induzierten Deletion des BK-Kanals in verschiedenen Geweben

Amplifikate der geflochten (fl)-, WT (+)- und KO (-)-BK-Allele verdeutlichen die erfolgreiche Generierung des Knockouts in Atrium, Ventrikel und in isolierten adulten Kardiomyozyten (rote Pfeile). Im Gegensatz dazu ist im Skelettmuskel und weißen Fettgewebe der α MHC-Cre^{Tg/+}-Tieren keine Rekombination erkennbar; Tg: Transgen; BK (+): 466 bp, BK (-): 132 bp, BK (fl): 577 bp.

3.5 Charakterisierung des kardiovaskulären Phänotyps des CMBK-KO (CMBK^{-fl})

Die Kardiomyozyten-spezifischen BK-Knockouttiere (CMBK-KO, CMBK^{-fl}) zeigten gegenüber ihren Wurfgeschwistern (CMBK-CTR, CMBK^{+fl}) zunächst keinen auffälligen Phänotyp. Auch die Analyse der Körper- (KG) und Herzgewichte (HG) sowie der Tibialängen (TL) ergab zwischen den Genotypen im Alter von 11 bis 13 Wochen keine

signifikanten Unterschiede. Die entsprechenden Mittelwerte der Parameter für die männlichen Mäuse sind in Tabelle 6 dargestellt, die Daten der Weibchen sind im Anhang (Annex-Tabelle 7) zu finden.

Tabelle 6: Basale Herzgewichte der männlichen CMBK-CTR (CMBK^{+fl}) und CMBK-KO (CMBK^{-fl})

	KG [g]	HG [mg]	TL [mm]	HG/KG [mg/g]	HG/TL [mg/mm]
CMBK ^{+fl} (n=9)	25,3 ± 0,5	117,8 ± 2,4	17,04 ± 0,18	4,67 ± 0,07	6,91 ± 0,12
CMBK ^{-fl} (n=10)	24,8 ± 0,6	116,7 ± 2,7	16,83 ± 0,16	4,71 ± 0,09	6,93 ± 0,11

Auch in Vergleichskohorten älterer Tiere (>45 Wochen) zeigten sich keine unterschiedlichen Entwicklungen dieser Parameter (Annex-Tabelle 8). Interessanterweise lag die Überlebenszeit der α MHC-Cre-transgenen Mäuse nur bei ca. einem Jahr (*Daten nicht gezeigt*). Dieses Phänomen trat unabhängig von der Deletion des BK-Kanals sowohl in den Versuchstieren als auch in der Elterngeneration auf, was klar für eine toxische Wirkung der chronischen Cre-Expression per se spricht. Unterstützend kommt hinzu, dass globale BK-Knockoutmäuse und ihre Wurfgeschwisterkontrollen keine verkürzte Lebenszeit aufweisen (*Daten nicht gezeigt*). Ein Einfluss auf die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Myokardinfarktstudien war nicht zu befürchten, da das Höchstalter der CMBK-Tiere in den Experimenten 17 Wochen betrug.

Globale BK-Knockoutmäuse entwickeln einen Hypertonus (Sausbier et al. 2005). Im Rahmen der kardiovaskulären Charakterisierung der CMBK-Mutanten wurden daher zunächst die Blutdruckwerte der Tiere telemetrisch über 48 Stunden bestimmt (Durchführung siehe Abschnitt 2.5.7). Für die direkte Vergleichbarkeit der Werte wurden ausschließlich männliche Tiere im Alter von 10 bis 15 Wochen verwendet. Überraschenderweise zeigten die CMBK-KO einen um 7,3 mmHg reduzierten arteriellen Blutdruck (MAP) im Vergleich zu ihren Wurfgeschwistern (108,21 ± 2,62 mmHg für CMBK^{+fl}, n=7; 100,93 ± 1,33 mmHg für CMBK^{-fl}, n=10; Abbildung 38C). Dabei erreichte die Reduktion des diastolischen Drucks (97,33 ± 1,67 mmHg für CMBK^{+fl}; 89,86 ± 0,86 mmHg für CMBK^{-fl}; p<0,001; Abbildung 38B) im Vergleich zum systolischen Blutdruck (118,57 ± 3,67 mmHg für CMBK^{+fl}; 112,22 ± 2,61 mmHg für CMBK^{-fl}; Abbildung 38A) das Signifikanzniveau. Dies war vermutlich größeren Abweichungen in den Einzelwerten der Systole geschuldet, da der Pulsdruck, welcher die Differenz aus Systole und Diastole darstellt, nur geringe Unterschiede zwischen den Genotypen aufwies (21,21 ± 2,51 mmHg für CMBK^{+fl}; 22,26 ± 2,94 mmHg für CMBK^{-fl}; Abbildung 38E). Beide Genotypen zeigten ein fast identisches Aktivitätsprofil (10,79 ± 2,44 cpm für CMBK^{+fl}; 11,94 ± 2,15 cpm für

CMBK^{-fl}; Abbildung 38F), welches dem Tag-Nacht-Rhythmus angepasst war. Die durchschnittliche Herzfrequenz war in den CMBK-KO mit 594 ± 5 Schlägen pro Minute leicht vermindert gegenüber den Kontrolltieren mit 616 ± 7 Schlägen pro Minute (Abbildung 38D).

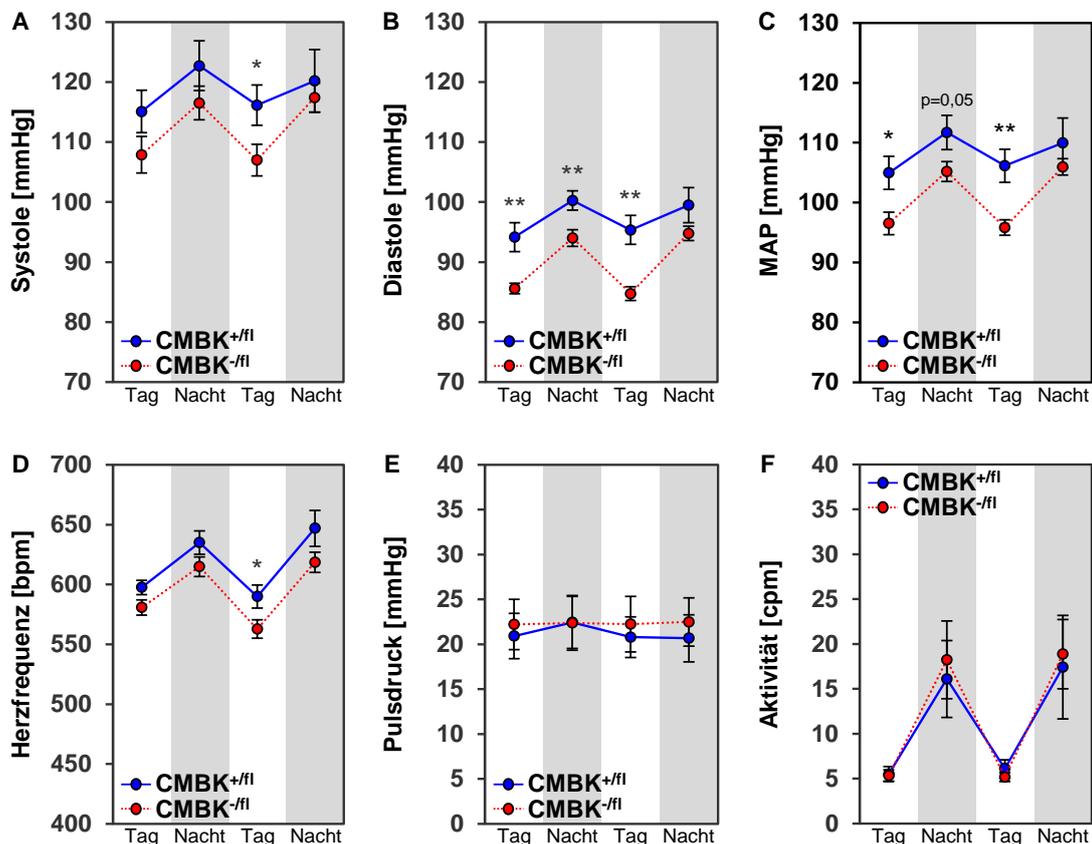


Abbildung 38: Reduzierter arterieller Blutdruck in CMBK-Knockoutmäusen

Die telemetrische Blutdruckmessung über 48 Stunden zeigte sowohl eine Verminderung des systolischen (A) als auch des diastolischen Blutdruckwertes (B) in CMBK-KO (CMBK^{-fl}) verglichen mit CMBK-CTR (CMBK^{+fl}). Dies äußerte sich in einem signifikant reduzierten mittleren arteriellen Blutdruck (MAP, C) und wurde von einer leichten Verringerung der Herzfrequenz (D) begleitet. Pulsdruck (E) und Aktivität (F) waren hingegen in beiden Genotypen vergleichbar. Kreise zeigen Mittelwerte \pm SEM mit $n=7$ für CMBK^{+fl} und $n=10$ für CMBK^{-fl}; * $p<0,05$, ** $p<0,01$ CMBK^{+fl} vs. CMBK^{-fl}.

Die echokardiographischen Messungen in der Längsachse demonstrierten (Durchführung siehe Abschnitt 2.5.8, konventionelle Auswertung), dass der reduzierte arterielle Blutdruck der CMBK-KO mit einer allgemein reduzierten Herzfunktion einherging. So wiesen die Knockouttiere sowohl eine verminderte Verkürzungsfraction (FS, *fractional shortening*) als auch eine um 9 % reduzierte Auswurffraction (EF, *ejection fraction*) auf (FS: $35,14 \pm 1,38$ %; EF: $64,63 \pm 1,83$ % für CMBK^{+fl}, $n=8$; FS: $30,99 \pm 1,07$ %; EF: $58,97 \pm 1,56$ % für CMBK^{-fl}, $n=9$; Abbildung 39A+B). Die echokardiographisch bestimmte Masse des linken Ventrikels (m_{LV}) bestätigte dabei die Bestimmung der Herzgewichte (Tabelle 6) und zeigte keine Unterschiede zwischen den Genotypen (Abbildung 39C).

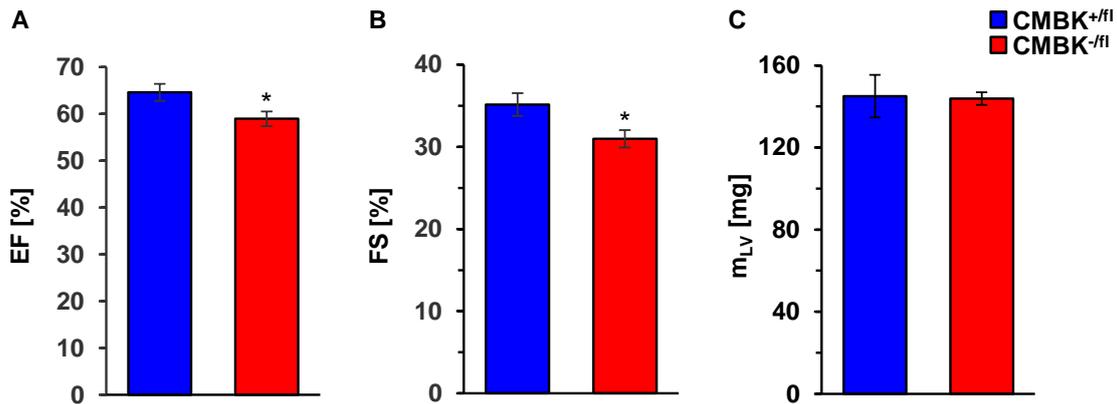


Abbildung 39: Eingeschränkte Herzfunktion der CMBK-KO

(A) Reduzierte Auswurffraktion (EF) der CMBK-KO (CMBK^{-fl}) unter basalen Bedingungen. (B) Verminderte Verkürzungsfraction (FS) der CMBK-KO im Vergleich zu CMBK-CTR (CMBK^{+fl}). (C) Vergleichbare linksventrikuläre Massen zwischen den beiden Genotypen. Balken repräsentieren Mittelwerte ± SEM mit n=8 für CMBK^{+fl} und n=9 für CMBK^{-fl}; *p<0,05 CMBK^{+fl} vs. CMBK^{-fl}.

Bei der Bestimmung weiterer linksventrikulärer Parameter zeigten sich keine Unterschiede in der Interventrikularseptumdicke (IVS; Abbildung 40A+D), den diastolischen Werten der Hinterwanddicke (LVPW, *left ventricular posterior wall*; Abbildung 40E) und des linken Kammervolumens (Vol.; Abbildung 40F), sowie des totalen enddiastolischen Durchmessers (TEDD, *total end diastolic diameter*; Abbildung 40G). Weitere Hinweise für eine beeinträchtigte Pumpfunktion der CMBK-KO lieferten jedoch die ebenfalls signifikant reduzierte Hinterwanddicke des linken Ventrikels (Abbildung 40B), sowie das knapp nicht signifikante (p=0,07), vergrößerte linksventrikuläre Restvolumen während der Systole (Abbildung 40C). Die Absolutwerte der einzelnen Parameter sind im Anhang (Annex-Tabelle 9) zu finden.

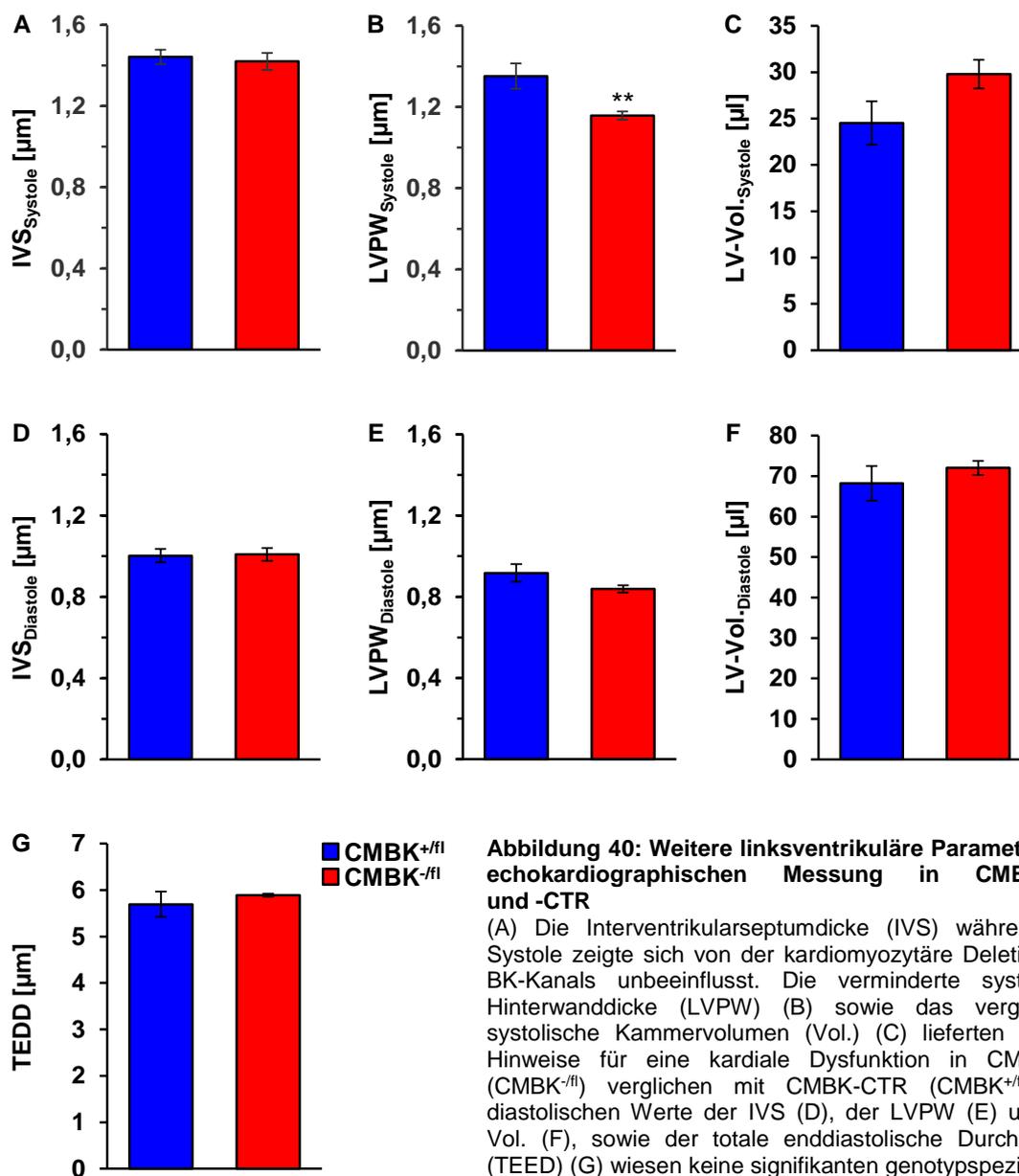


Abbildung 40: Weitere linksventrikuläre Parameter der echokardiographischen Messung in CMBK-KO und -CTR

(A) Die Interventrikularseptumdicke (IVS) während der Systole zeigte sich von der kardiomyozytäre Deletion des BK-Kanals unbeeinflusst. Die verminderte systolische Hinterwanddicke (LVPW) (B) sowie das vergrößerte systolische Kammervolumen (Vol.) (C) lieferten weitere Hinweise für eine kardiale Dysfunktion in CMBK-KO (CMBK^{-fl}) verglichen mit CMBK-CTR (CMBK^{+fl}). Die diastolischen Werte der IVS (D), der LVPW (E) und des Vol. (F), sowie der totale enddiastolische Durchmesser (TEDD) (G) wiesen keine signifikanten genotypspezifischen Unterschiede auf. Balken repräsentieren Mittelwerte ± SEM mit n=8 für CMBK^{+fl} und n=9 für CMBK^{-fl}; **p<0,01 CMBK^{+fl} vs. CMBK^{-fl}.

3.6 Bestimmung des I/R-Schadens nach akutem Myokardinfarkt in CMBK-KO

3.6.1 Infarktgrößen- und cTnI-Spiegelbestimmung

Die Durchführung des akuten Myokardinfarktmodells in den CMBK-KO und -CTR demonstrierte, dass die selektive Ausschaltung des mitoBKs in Kardiomyozyten zu identischen Infarktgrößen nach I/R führt wie eine globale BK-Kanaldeletion (Abbildung 32B: 38,56 ± 1,65 %). So konnte nach I/R in den CMBK-KO (38,26 ± 1,55 %) verglichen

mit den CMBK-CTR ($27,19 \pm 1,25$ %; je $n=8$; Abbildung 41B) ein signifikant erhöhter Infarktbereich festgestellt werden. Dies ist zudem deutlich an den weißen Arealen der dargestellten Herzscheiben zu erkennen. Die Infarktgrößen der scheinoperierten Tiere waren in beiden Genotypen vernachlässigbar ($0,91 \pm 0,21$ % für CMBK^{+fl}; $1,07 \pm 0,62$ % für CMBK^{-fl}, je $n=5$). Die geringen Schwankungen in den Risikoarealen repräsentieren die Reproduzierbarkeit der Methode über die Genotypen und Behandlungskohorten hinweg (I/R: $48,74 \pm 2,08$ % für CMBK^{+fl}; $51,30 \pm 2,00$ % für CMBK^{-fl}; I/R sham: $51,60 \pm 2,27$ % für CMBK^{+fl}; $52,37 \pm 4,96$ % für CMBK^{-fl}; Abbildung 41A).

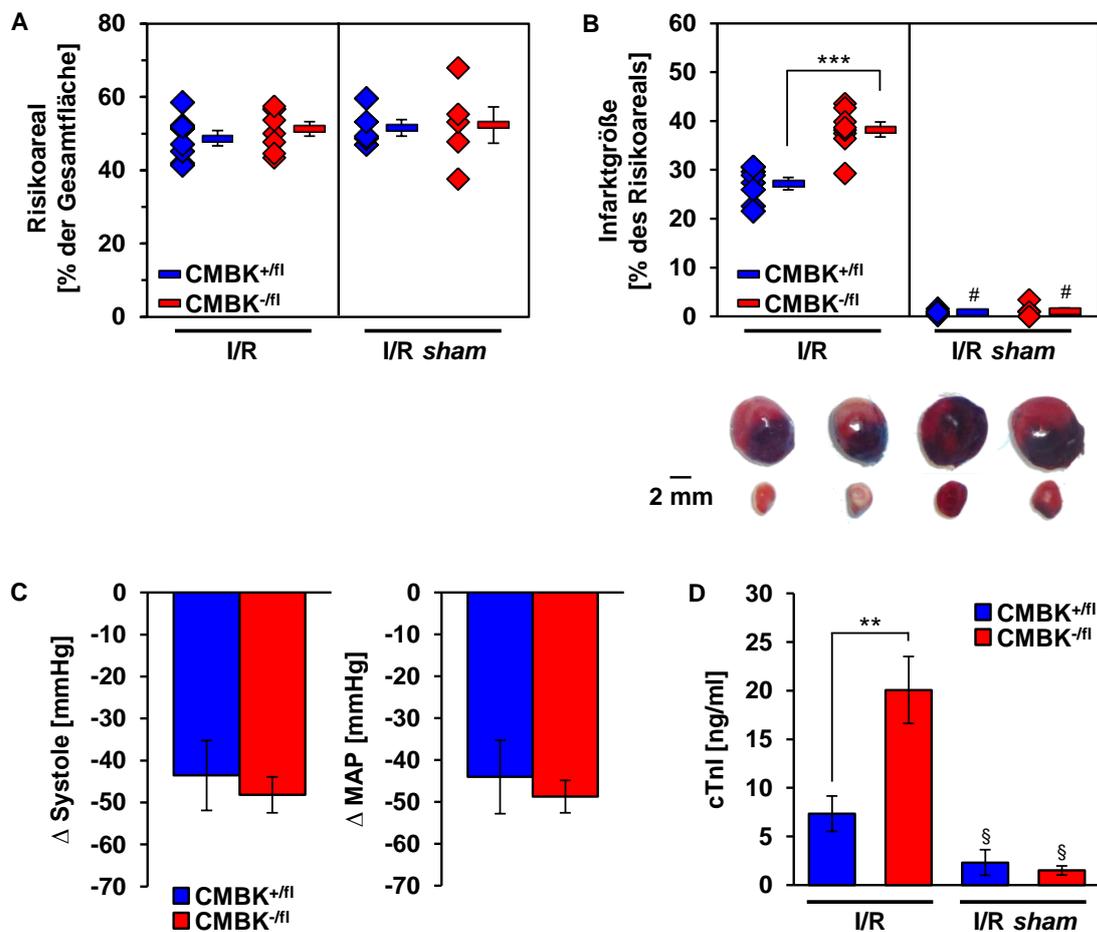


Abbildung 41: Bestimmung der Infarktgröße und des cTnI-Spiegels in CMBK-KO

(A) Die Risikoareale (in % zur Gesamtherzfläche) zeigten keine Unterschiede zwischen den Genotypen und Setups. (B) Die Infarktgröße (in % zum Risikoareal) war nach 30 min Ischämie, gefolgt von 120 min Reperfusion (I/R) in CMBK-KO (CMBK^{-fl}) signifikant erhöht verglichen mit CMBK-CTR (CMBK^{+fl}). Die scheinoperierten Tiere wiesen keine infarzierten Herzmuskeln auf. Repräsentative Herzscheiben sind unterhalb des jeweiligen Genotyps und Setups dargestellt (blau: unbeeinträchtigtes Gewebe, rot+weiß: Risikoareal, weiß: infarziertes Gewebe). (C) Unter Anästhesie waren in beiden Genotypen deutliche Reduktionen des systolischen und des arteriellen Drucks (MAP) um vergleichbare Werte erkennbar. Balken repräsentieren Mittelwerte \pm SEM mit $n=5$ für CMBK^{+fl} und $n=6$ für CMBK^{-fl}. (D) cTnI-Spiegel, welche unmittelbar nach der Reperfusion im Serum bestimmt wurden korrelieren mit den Infarktgrößen. (A), (B) und (D): Rauten stellen einzelne Experimente dar, Balken zeigen Mittelwerte \pm SEM mit je $n=8$ für I/R und je $n=5$ für I/R sham; ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ CMBK^{+fl} vs. CMBK^{-fl}; §: $p<0,01$, #: $p<0,001$ zu I/R.

Um mögliche Anästhesie-vermittelte Unterschiede in der Hämodynamik ausschließen zu können, wurden die Blutdruckwerte unter Narkose bestimmt. Es wurden die Veränderungen der Parameter von den Mittelwerten der basalen, 24-stündigen Blutdruckmessungen (M1) und den durchschnittlichen Werten eines 15-minütigen Messintervalls (M2) 15 min nach der Pentobarbitalinjektion verglichen (Abbildung 27B; Durchführung siehe Abschnitt 2.5.7.2). In Abbildung 41C ist eine drastische, jedoch genotypunabhängige Reduktion des arteriellen Blutdrucks während der Narkose zu sehen. Hierbei sank in den CMBK-KO der MAP um durchschnittlich $48,75 \pm 3,82$ mmHg (n=6) verglichen mit dem 24-stündigen Basalwert, in den Kontrolltieren um $44,05 \pm 8,77$ mmHg (n=5). Die Bestimmung der Serumspiegel des kardialen Marker cTnI nach I/R unterstützen die mittels Evans Blue/TTC-Färbung erhaltenen Ergebnisse, denn auch sie waren in den CMBK-KO signifikant erhöht (I/R: $7,34 \pm 1,82$ ng/ml für CMBK^{+fl}; $20,06 \pm 3,45$ ng/ml für CMBK^{-fl}; I/R sham: $2,32 \pm 1,32$ ng/ml für CMBK^{+fl}; $1,51 \pm 0,47$ ng/ml für CMBK^{-fl}; Abbildung 41D).

Die Basalcharakteristiken der operierten Tiere sind im Anhang (Annex-Tabelle 4) aufgeführt.

3.6.2 Ausmaß der Apoptose

Der Zelltod, der durch den I/R-Schaden auftritt, wird einerseits durch nekrotische und andererseits durch apoptotische Prozesse eingeleitet (Ferdinandy et al. 2007). Um das Ausmaß der Apoptose nach I/R zu bestimmen, wurden im Rahmen einer Masterarbeit von Eva Mohr (Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und klinische Pharmazie, Universität Tübingen, (Mohr 2015)) Kryoschnitte von CMBK-KO und -CTR nach akutem Myokardinfarkt, sowie von direkt entnommenen Kontrollherzen angefertigt (Abschnitt 2.6.3) und mit der TUNEL-Methode angefärbt (Abschnitt 2.6.6). Die Herzen wurden in acht äquidistante Sektionen vom Apex bis zur Ligatur unterteilt (Abbildung 42A). Von jeder Sektion wurden dabei zwei aufeinanderfolgende Schnitte für die nachfolgenden Färbungen verwendet. Pro Sektion wurde das Ausmaß der DNA-Fragmentierung als Determinante der Apoptose in einem repräsentativen Schnitt untersucht. In Abbildung 42B ist eine Herzscheibe der Sektion 6 einer CMBK-CTR nach akutem Myokardinfarkt dargestellt. Diese zeigt eine deutliche Braunfärbung der apoptotischen Zellkerne. In den CMBK-KO war die korrespondierende Färbung nach I/R deutlich intensiver ausgeprägt (Abbildung 42C). Im jeweiligen Folgeschnitt wurde eine Kernfärbung mit Hämatoxylin durchgeführt um die Prozentzahl der apoptotischen Zellen zur Gesamtnukleuszahl bestimmten zu können (Abbildung 42D+E).

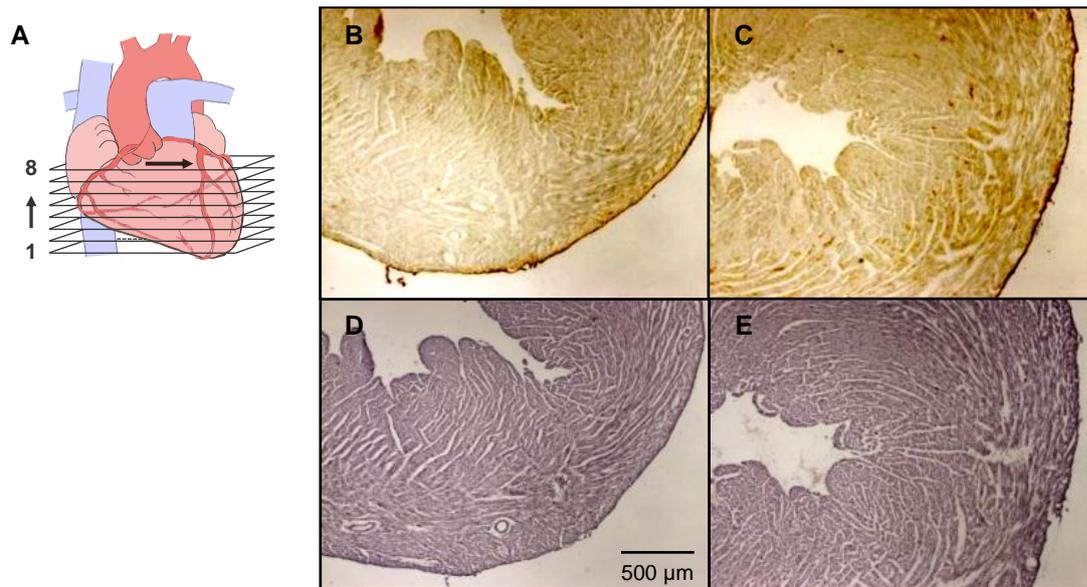


Abbildung 42: Erhöhte Apoptose in CMBK-Knockout Herzen nach I/R

(A) Schematische Darstellung der 8 Herzsektionen vom Apex bis zur Ligatur (schwarzer Pfeil). Repräsentative Ausschnitte der Sektion 6 von CMBK-CTR- (B) und CMBK-KO- Herzen (C) nach I/R und anschließender TUNEL-Färbung. Braungefärbte Zellkerne markieren apoptotische Zellen. Die jeweiligen Folgeschnitte von CMBK-CTR (D) und CMBK-KO (E) wurden für die Visualisierung der Zellkerne mit Hämatoxylin angefärbt. 5x Vergrößerung, Schnittdicke: 10 µm (Masterarbeit, Mohr 2015).

Die Quantifizierung erfolgte an charakteristischen Ausschnitten von jeweils drei zentralen und drei peripheren Bereichen pro Herzsektion. Im Rahmen der Quantifizierung wurden pro Genotyp über 27.000 Nuklei erfasst. Während in Herzen ohne I/R-Exposition kaum TUNEL-positive Zellkerne zu sehen waren (*Daten nicht gezeigt*), war insbesondere in den mitoBK-defizienten Tieren ein deutlicher, infarktbedingter Anstieg der Apoptose zu erkennen ($2,64 \pm 0,52$ % für CMBK^{+fl}, $3,99 \pm 0,81$ % für CMBK^{-fl}, je n=3; Abbildung 43A-C). Abbildung 43A zeigt dabei den Randbereich der Sektion 3 eines CMBK-CTR- Herzschnittes nach I/R. Hier sind deutlich weniger apoptotische Zellkerne als in dem entsprechenden Herzmuskelgewebe einer CMBK-Knockoutmaus zu sehen (Abbildung 43B). Dabei trat eine verstärkte Braunfärbung sowohl in den peripheren als auch in den zentralen Bereichen des Herzens meist lokal auf, was gesteigerte apoptotische Prozesse in den vom I/R-Schaden am stärksten betroffenen Regionen des Herzens vermuten lässt. Die Quantifizierung ergab eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen insbesondere in den Sektionen 3 bis 5, die sich in diesem Bereich auch signifikant zwischen den Genotypen unterschied (Abbildung 43C). Die allgemein sehr niedrigen Prozentzahlen der Apoptose begründen sich dadurch, dass hier im Gegensatz zu einigen Darstellungen in der Literatur (Nakamura et al. 2000, Zhao et al. 2000b, Suzuki et al. 2001), in denen ausschließlich Zellkerne im infarzierten Bereich berücksichtigt werden, die Anzahl der apoptotischen Zellkerne auf die Gesamtnukleuszahl der jeweiligen Herzscheibe bezogen wurde.

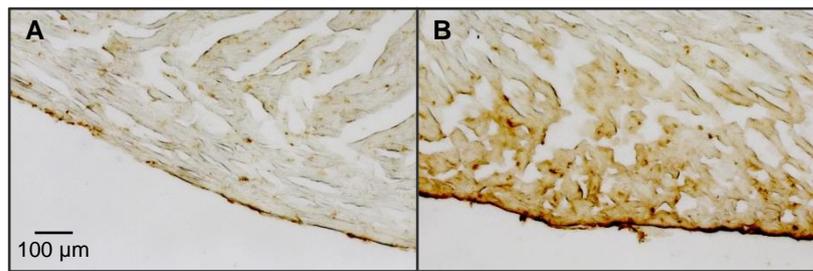
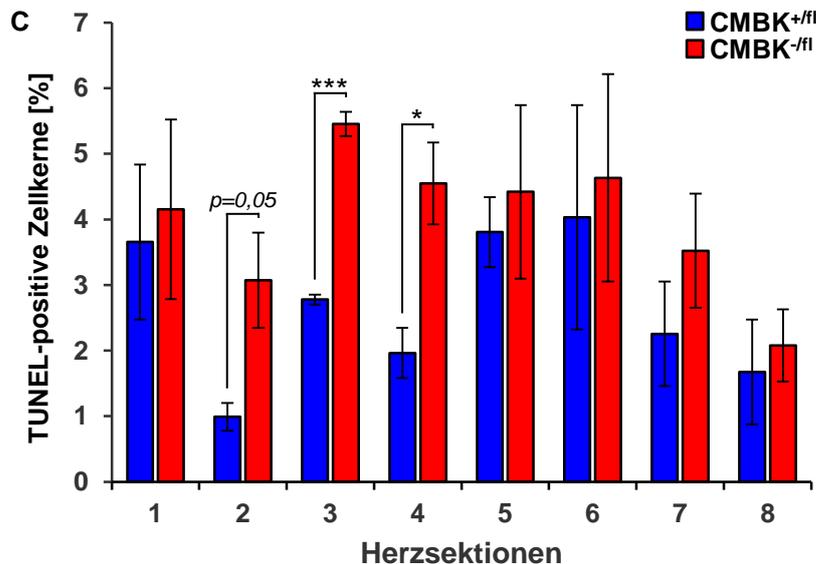


Abbildung 43:
Quantifizierung apoptotischer Zellen nach I/R

Repräsentative Ausschnitte der peripheren Herzbereiche der Sektion 3 von CMBK-CTR (A) und CMBK-KO (B) nach I/R und TUNEL-Färbung als Marker für apoptotische Zellen (20x Vergrößerung, 10 µm Schnittdicke). (C) Die quantitative Auswertung der Kryoschnitte zeigte eine erhöhte Prozentzahl TUNEL-positiver Zellen in den 8 Herzsektionen der CMBK-KO (CMBK^{-fl}) verglichen mit CMBK-CTR (CMBK^{+fl}). Balken zeigen Mittelwerte ± SEM; >27.000 gesamt gezählte Zellkerne pro Genotyp mit je n=3; *p<0,05, ***p<0,001 CMBK^{+fl} vs. CMBK^{-fl}, (Masterarbeit, Mohr 2015).



Die Ergebnisse der TUNEL-Färbung bestätigten die Infarktgrößenbestimmung nach I/R, da auch diese Herzschnitte in den Sektionen 3 bis 5 im Durchschnitt die ausgeprägteste Infarzierung aufwiesen.

3.7 Auswirkungen einer mechanischen Konditionierung in CMBK-KO

Die globale Deletion des BK-Kanals führte zu einem massiven Verlust der protektiven Wirkung der Postkonditionierung (siehe Abschnitt 3.2.1). Da ein Einfluss des glattmuskulären BK-Kanals ausgeschlossen werden konnte (siehe Abschnitt 3.3), lag der Fokus im Folgenden auf dem mitoBK in den Kardiomyozyten. So zeigten auch die CMBK-KO ein reduziertes Ansprechen auf die mechanische Konditionierung ($11,27 \pm 0,62$ % für CMBK^{+fl}; $28,26 \pm 1,52$ % für CMBK^{-fl}, je n=8; Abbildung 44A, links). Im Gegensatz zu den globalen BK-KO (Abbildung 33A) war in den CMBK-KO verglichen mit I/R ohne Konditionierung durch iPost eine signifikante Reduktion der Infarktgröße zu beobachten. Ein Vergleich der prozentualen Abnahmen der Infarktgrößen von I/R ± iPost ist in Abbildung 44B dargestellt. Die Reduktion des infarzierten Bereichs betrug in den

globalen BK-KO $11,5 \pm 3,4$ % und in den CMBK-KO $26,1 \pm 4,0$ %. Die von der iPost ausgehenden kardioprotektiven Effekte lagen in den entsprechenden Kontrollgruppen CMBK-CTR und BK-WT deutlich höher. Dass auch bereits zwischen den CMBK-CTR ($-58,6 \pm 2,3$ %) und BK-WT ($-49,0 \pm 4,0$ %) leichte, wenn auch nicht signifikante Unterschiede in der Infarktgrößenreduktion nach iPost zu erkennen waren, unterstreicht die Bedeutung der Auswahl korrekter Kontrolltiere.

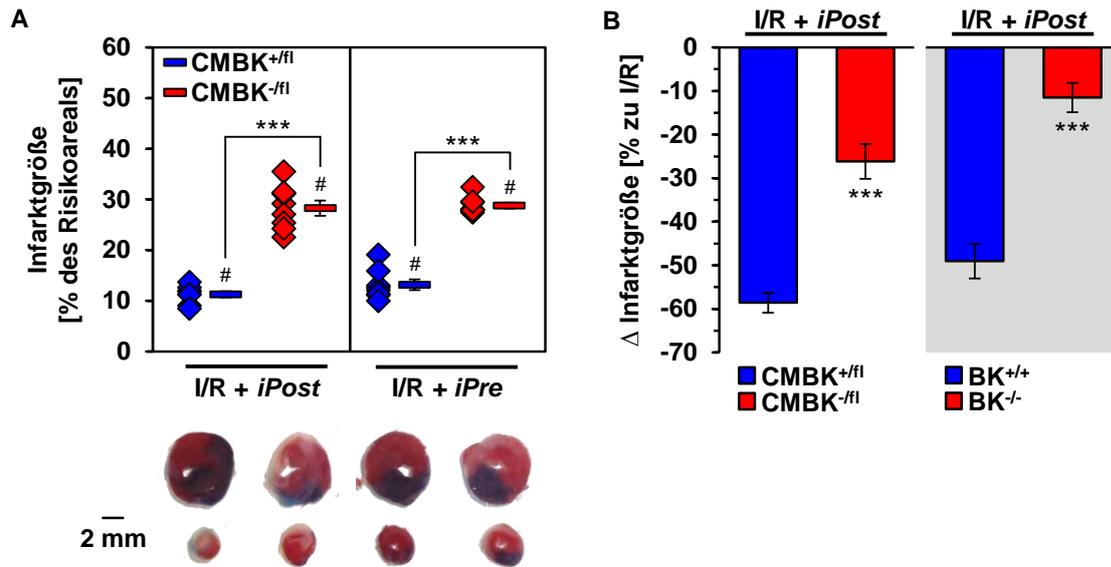


Abbildung 44: Vermindertes Ansprechen der CMBK-KO auf mechanische Konditionierung

(A) Sowohl die Durchführung der Postkonditionierung (*iPost*) als auch der Präkonditionierung (*iPre*) konnte die Infarktgröße (in % zum Risikoareal) in den Kontrolltieren (CMBK^{+fl}, je n=8) signifikant reduzieren. Die Protektion durch mechanische Konditionierung war in CMBK-KO (CMBK^{-fl}, je n=8) deutlich vermindert. Repräsentative Herzscheiben sind unterhalb des jeweiligen Genotyps und Setups dargestellt (blau: unbeeinträchtigtes Gewebe, rot+weiß: Risikoareal, weiß: infarziertes Gewebe). (B) Vergleich der Reduktionen der Infarktgröße (in % zu I/R (Abbildung 32B+41B)) durch iPost von CMBK-KO/-CTR mit globalen BK-KO (BK^{-/-}) und -WT (BK^{+/+}). Rauten repräsentieren einzelne Experimente, Balken zeigen Mittelwerte \pm SEM; ***p<0,001 CMBK^{+fl} vs. BK^{-fl}; #: p<0,001 zu I/R.

Soltysinska et al. konnten 2014 in globalen BK-Knockouttieren im Langendorffmodell zeigen, dass der BK-Kanal essentiell für die kardioprotektive Wirkung der ischämischen Präkonditionierung (*iPre*) ist (Soltysinska et al. 2014). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde dieser interessante Befund in dem *in-vivo*-Myokardinfarktmodell überprüft. Dabei sprachen die CMBK-KO und Kontrollherzen grundsätzlich auf das *iPre*-Protokoll an ($13,13 \pm 1,05$ % für CMBK^{+fl}; $28,77 \pm 0,58$ % für CMBK^{-fl}, je n=8; Abbildung 44A, rechts). Es zeigte sich jedoch erneut, dass das Ausmaß der Kardioprotektion durch die mechanische Konditionierung in den CMBK-KO signifikant geringer war.

Der kardiomyozytäre mitoBK scheint demnach einen Hauptteil der kardioprotektiven Wirkung durch *iPost* und *iPre* zu vermitteln. Die geringen verbleibenden Schutzwirkungen, welche nach Cre-vermittelter Ausschaltung des Kanals noch beobachtet werden, lassen

aber weitere, mitoBK-unabhängige Signalwege bei der mechanischen Konditionierung vermuten. Letztlich ist auch unklar, ob das Ausmaß der erfolgten Rekombination noch einen zusätzlichen Einfluss auf die iPost hat. Die Werte der Risikoareale und der Basalcharakteristiken sind im Anhang (Annex-Abbildung 2, Annex-Tabelle 4) aufgeführt.

3.8 Beeinflussung der Infarktgröße durch pharmakologische Modulation des BK-Kanals

Im Anhang sind sowohl die Risikoareale (Annex-Abbildung 2) als auch die Basalcharakteristiken (Annex-Tabelle 4) für die Untersuchung der Einflüsse der BK-Kanalmodulatoren Paxilline und NS11021 auf den I/R-Schaden im akuten Myokardinfarktmodell aufgeführt. Es wurden Tiere beider Geschlechter im Alter von 9 bis 13 Wochen verwendet. Signifikante Unterschiede hinsichtlich der Größe des Risikoareals, des Geschlechts, des Verhältnisses Herzgewicht zu Körpergewicht oder des Alters konnten nicht festgestellt werden.

3.8.1 Auswirkungen der pharmakologischen BK-Kanalblockade auf den kardialen I/R-Schaden

In isolierten kardialen Mitoplasten konnte unter normoxischen Bedingungen mittels planarer Patch-Clamp-Experimente bereits eine Blockade des mitoBKs durch den BK-Kanalinhibitor Paxilline gezeigt werden (Soltysinska et al. 2014). Um den Effekt der genetischen Ausschaltung des mitoBKs auf das Infarktareal anhand einer pharmakologischen Inhibition des Kanals weiter zu bestätigen, wurden CMBK-Knockoutmäuse und -Kontrolltiere mit Paxilline (8 mg/kg *i.p.* fünf Minuten nach Beginn der ischämischen Phase) behandelt (Durchführung siehe Abschnitt 2.5.3.7). Der Einsatz des BK-Kanalblockers führte in CMBK-CTR zu einem Anstieg der Infarktareale auf Werte, die mit denen der CMBK-KO nach I/R (Abbildung 41B) vergleichbar waren ($36,97 \pm 1,69 \%$, $n=8$; Abbildung 45A, links). Dieser Anstieg der Infarktgrößen in den CMBK-CTR lag im Vergleich zur basalen I/R-Verletzung bei $35,9 \pm 6,2 \%$ (Abbildung 45B). Wie erwartet zeigte Paxilline in den CMBK-KO keinen Effekt ($37,00 \pm 1,81 \%$, $n=8$; Abbildung 45A, links und $-3,3 \pm 4,7 \%$ Abbildung 45B), was die Schlussfolgerung erlaubt, dass Paxilline die Vulnerabilität der Herzen bei I/R primär über eine Hemmung des BK-Kanals in den Mitochondrien erhöht.

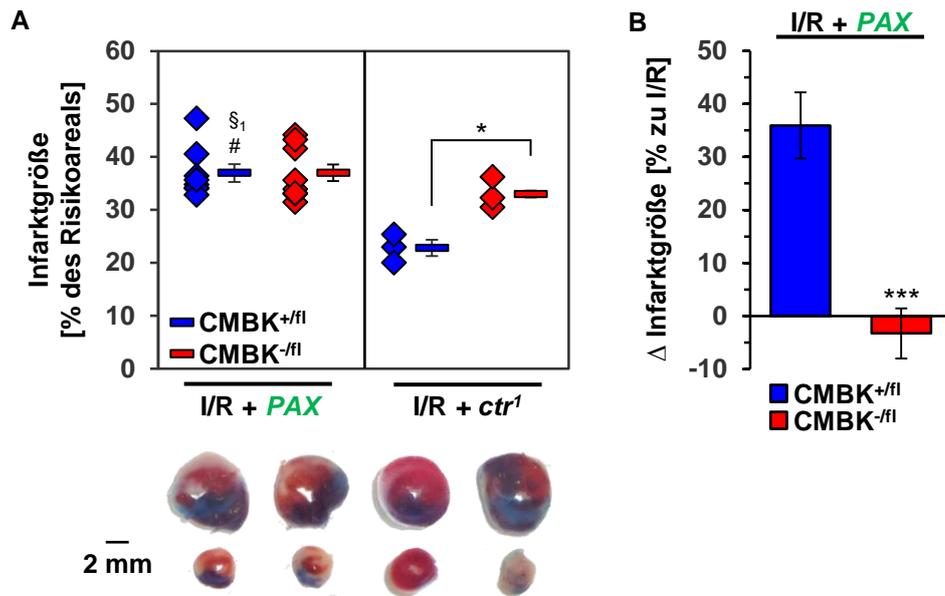


Abbildung 45: Anstieg der Infarktgröße bei I/R durch Paxilline in CMBK-CTR

(A) Zunahme der Infarktgrößen in CMBK-CTR (CMBK^{+fl}) auf Werte, vergleichbar mit CMBK-KO (CMBK^{-fl}) nach I/R, durch die Gabe des BK-Kanalblockers Paxilline (PAX, 8 mg/kg KG, *i.p.* 5 min nach LCA-Ligatur, je n=8). Die Injektion des Lösungsmittels (*ctr*¹: DMSO/H₂O von 9:1) hatte keinen Einfluss auf die Größe des infarzierten Bereichs (je n=3). Infarktgröße angegeben in % zum Risikoareal; repräsentative Herzscheiben sind unterhalb des jeweiligen Genotyps und Setups dargestellt (blau: unbeeinträchtigtes Gewebe, rot+weiß: Risikoareal, weiß: infarziertes Gewebe). (B) Prozentuale Veränderungen der Infarktgröße durch die Gabe von Paxilline in beiden Genotypen bezogen auf I/R (Abbildung 41B). Rauten repräsentieren einzelne Experimente, Balken zeigen Mittelwerte ± SEM; *p<0,05, ***p<0,001 CMBK^{+fl} vs. CMBK^{-fl}; #: p<0,001 zu I/R und §₁: p<0,01 zu I/R + *ctr*¹.

Um einen Einfluss des Lösungsmittels (*ctr*¹), welches aufgrund der schlechten Löslichkeit von Paxilline einen hohen DMSO-Gehalt beinhaltete (DMSO/H₂O von 9:1), auszuschließen, erhielten Kontrollkohorten beider Genotypen das Lösungsmittel entsprechend der Paxillineadministration. Abbildung 45A, rechts zeigt, dass die Einflüsse auf den I/R-Schaden ausschließlich auf die Paxillinewirkung zurückzuführen sind (22,81 ± 1,54 % für CMBK^{+fl}; 32,99 ± 1,68 % für CMBK^{-fl}, je n=3).

3.8.2 Protektion des Herzens bei I/R durch Öffnung des BK-Kanals mittels NS11021

Der BK-Kanalöffner NS11021 (NS) schützt das Herz im Langendorffmodell konzentrationsabhängig vor einem akut auftretenden I/R-Schaden (Bentzen et al. 2009). Da für eine Applikation von NS11021 keine *in-vivo*-Daten zur Verfügung standen, wurden *ex vivo* eingesetzte Dosierungen und Administrationszeiten als Orientierungshilfen verwendet (siehe Abschnitt 2.5.3.7). Als erstes wurde eine Konzentration von 92 µg/kg gewählt, was unter Berücksichtigung des Blutvolumens der Maus der vielfach *ex vivo*

verwendeten Dosierung von 3 μM entsprach (Bentzen et al. 2009). Da keinerlei Informationen zur Pharmakokinetik, insbesondere zur Resorption und Metabolisierung, von NS11021 verfügbar waren, wurde eine *i.v.*-Injektion fünf Minuten vor Beginn der Reperfusion als Applikation gewählt. Dies beinhaltet zum einen eine praktikable Injektionsart, die eine direkte Verfügbarkeit des Wirkstoffes im Blut und damit auch im Herzen ohne weitere Absorptionsschritte gewährleisten sollte. Zum anderen sollte die gewählte kurze Zeitspanne von 5 Minuten bis zum Beginn des akut auftretenden Reperfusionsschadens wenige Möglichkeiten für Metabolisierungs- und Eliminationsschritte lassen. In Abbildung 46A sind die Ergebnisse dieser Applikation dargestellt. Die intravenöse Gabe von 3 μM NS11021 zeigte keinerlei Benefit in Bezug auf den I/R-Schaden ($26,39 \pm 1,33$ % für $\text{CMBK}^{+/fl}$, $n=6$; $40,60 \pm 1,21$ % für $\text{CMBK}^{-/fl}$, $n=3$).

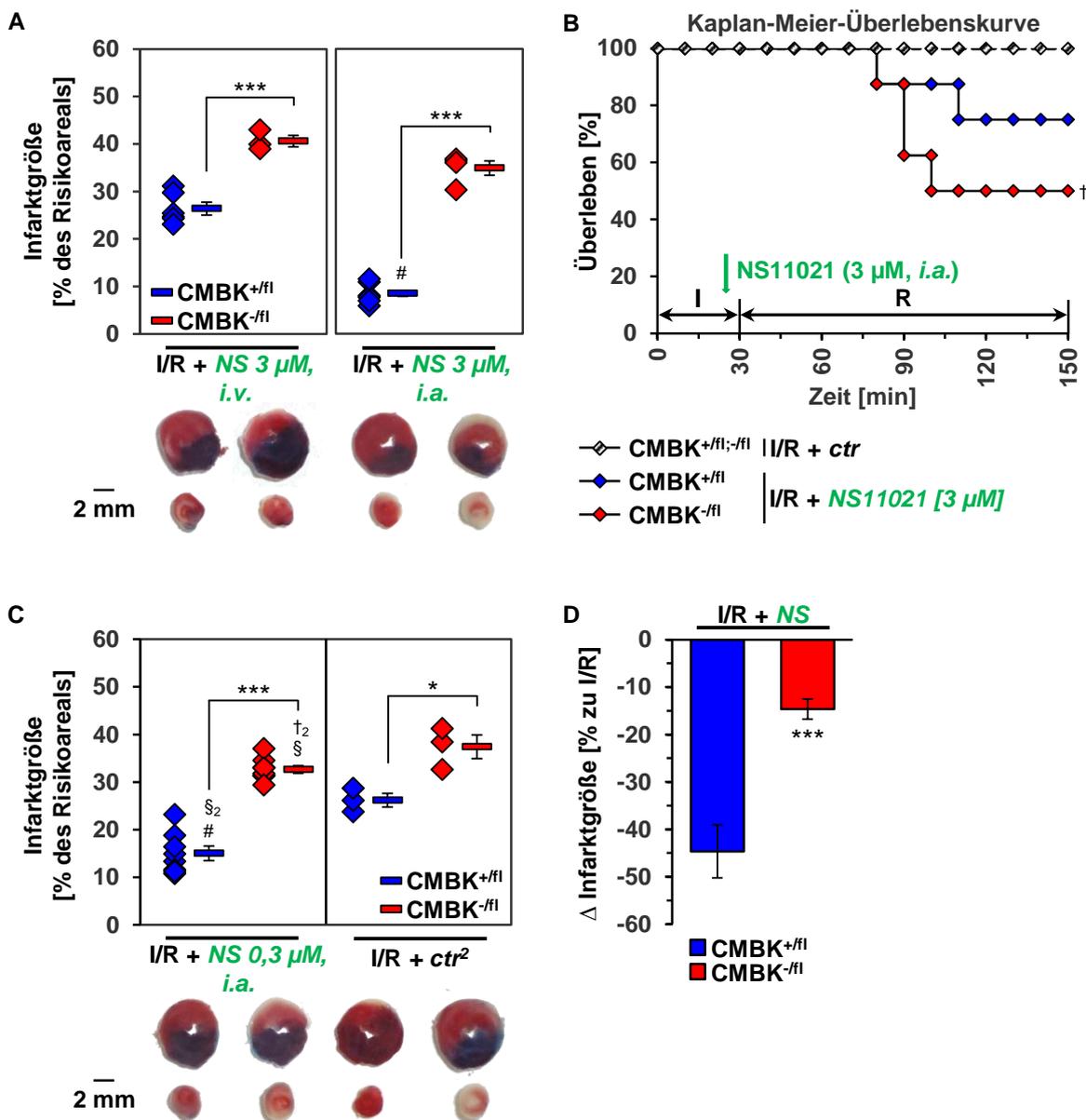


Abbildung 46: Kardioprotektion durch Öffnung des BK-Kanals mit NS11021 in CMBK-CTR

(A) Die intravenöse Gabe (*i.v.*) des BK-Kanalöffners NS11021 (3 μ M, 5 min vor Beginn der Reperfusion) zeigte keinen Einfluss auf die Infarktgröße (in % zum Risikoareal) nach I/R (n=6 für CMBK^{+fl} und n=3 für CMBK^{-fl}, *links*). Nach intraatrialer Injektion (*i.a.*) von NS11021 war der infarzierte Bereich in den CMBK-CTR (CMBK^{+fl}, n=6) deutlich reduziert. Dieser Effekt war in den CMBK-KO (CMBK^{-fl}, n=4, *rechts*) nicht zu beobachten. (B) Kaplan-Meier-Überlebenskurve: In der Reperfusionsphase verstarben nach intraatrialer Gabe von NS11021 (3 μ M) insgesamt 37,5 % der Tiere beider Genotypen. In der Kontrollgruppe, die nur das Lösungsmittel (*ctr*) erhielt, gab es dagegen keine Ausfälle. Das Ableben der CMBK-KO erreichte dabei verglichen mit der Kontrollkohorte, die nur das Lösungsmittel erhalten hatte, knapp das Signifikanzniveau (\dagger : $p < 0,05$). (C) Die Reduktion der NS11021-Dosis um den Faktor 10 verringerte insbesondere in den CMBK-CTR das Infarktareal im Vergleich zum basalen I/R-Schaden und zeigte keinen negativen Effekt auf das Überleben der Tiere (Überlebensquote: 100 %; je n=8, *links*). Generell hatte das Lösungsmittel (*ctr*²: DMSO/0,9%ige NaCl-Lösung von 1:150) keinen Einfluss auf die Größe des infarzierten Areals (je n=3, *rechts*). (D) Prozentuale Veränderungen der Infarktgröße durch die Gabe von NS11021 (0,3 μ M, *i.a.*) in beiden Genotypen bezogen auf I/R (Abbildung 41B). Repräsentative Herzscheiben sind unterhalb des jeweiligen Genotyps und Setups dargestellt (blau: unbetreffenes Gewebe, rot+weiß: Risikoareal, weiß: infarziertes Gewebe). Rauten stellen einzelne Experimente dar, Balken zeigen Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ CMBK^{+fl} vs. CMBK^{-fl}; § $p < 0,01$, #: $p < 0,001$ zu I/R und †₂: $p < 0,05$, §₂: $p < 0,01$ zu I/R + *ctr*².

Die Änderung des Applikationsweges in eine intraatriale (*i.a.*) Injektion bei gleichbleibender Dosierung hatte dagegen überzeugendere Effekte. So konnte die Infarktgröße in den CMBK-CTR auf $8,46 \pm 0,92$ % (n=6) deutlich gesenkt werden, wohingegen in den mitoBK-Mutanten keine signifikante Wirkung im Vergleich zum basalen I/R-Schaden (Abbildung 41B) erzielt wurde ($34,87 \pm 1,53$ %, n=4; Abbildung 46A, *rechts*). Allerdings ging von dieser NS11021-Applikation eine erhebliche Toxizität aus, da von den acht Mäusen, die pro Genotyp operiert wurden, vier aus der KO-Gruppe und zwei Tiere der Kontrollgruppe während der Reperfusion verstarben. Der Tod trat bei allen Tieren erst nach ca. 60 min Reperfusion durch eine zunehmende Bradykardie bis hin zum Herzstillstand ein (Abbildung 46B). Da Tiere beider Genotypen verstarben und sich statistisch mit dem Log-Rang-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den NS-behandelten Kohorten ergaben, scheint das Ableben der Mäuse nicht mit einer Modulation des mitoBKs in Zusammenhang zu stehen. Es ist beschrieben, dass die NS-Verbindungen weitere pleiotrope Effekte besitzen (Details siehe Abschnitt 4.2.4). Dass diese toxischen Effekte nicht auf das Lösungsmittel (DMSO/0,9%ige NaCl-Lösung von 1:150) zurückzuführen waren, zeigte die 100%ige Überlebensrate der Tiere in der entsprechenden Lösungsmittelkontrollkohorte (Abbildung 46B, I/R + *ctr*). Durch die intraatriale Injektion von 3 μ M NS11021 verstarben damit zusammengefasst 37,5 % der CMBK-Tiere. Paradoxerweise war jedoch in den überlebenden CMBK-CTR eine beeindruckende Reduktion der Infarktgröße um $68,9 \pm 3,4$ % zu sehen.

Um die toxischen Nebeneffekte zu minimieren, wurde die Konzentration des BK-Kanalöffners in Folgeexperimenten um den Faktor 10 gesenkt. Auch von 0,3 μ M NS11021 (*i.a.*) ging eine signifikante Kardioprotektion in den Kontrolltieren aus ($15,05 \pm 1,52$ %, für CMBK^{+fl}; $32,66 \pm 0,82$ % für CMBK^{-fl}, je n=8; Abbildung 46C, *links*). Der protektive Effekt viel insgesamt geringer aus als in den überlebenden CMBK-CTR nach einer Einmaldosis von 3 μ M NS11021 (*i.a.*). Es zeigte sich mit 0,3 μ M NS11021 (*i.a.*)

zudem auch in den CMBK-KO eine leichte Reduktion der Infarktgröße ($-44,7 \pm 5,6$ %, für CMBK^{+fl}; $-14,6 \pm 2,1$ % für CMBK^{-fl}; Abbildung 46D). Dieser Effekt war in der höheren Konzentration vermutlich aufgrund der geringen Anzahl an überlebenden Tieren nicht sichtbar. Ein Einfluss des Lösungsmittels (*ctr*²) auf die Infarktgröße konnte erneut nicht beobachtet werden ($26,21 \pm 1,44$ %, für CMBK^{+fl}; $37,42 \pm 2,52$ % für CMBK^{-fl}, je n=3; Abbildung 46C, rechts).

3.9 Der mitoBK als Zielprotein des kardioprotektiven NO/cGMP/PKG I-Signalweges

3.9.1 Expression und Aktivität der PKG I in CMBK-Knockoutherzen

Die PKG I spielt eine zentrale Rolle in der kardioprotektiven cGMP-abhängigen Signaltransduktion (Methner et al. 2013b). Es ist außerdem bekannt, dass membranständige BK-Kanäle sowohl in HEK293- als auch in A7r5-Glattmuskellzellen, einer Zelllinie aus der Rattenaorta, ein Substrat des cGMP/PKG-Signalweges darstellen (Swayze and Braun 2001, Kyle et al. 2013). Um etwaige Einflüsse einer veränderten Expression bzw. Aktivität der PKG I in den CMBK-Mutanten zu eruieren, wurde die kardiale PKG I-Expression sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch nach 30 min Ischämie, gefolgt von einer zehnminütigen Reperusionsphase (*I*₃₀/*R*₁₀) ermittelt (Durchführung siehe Abschnitt 2.7.3-6).

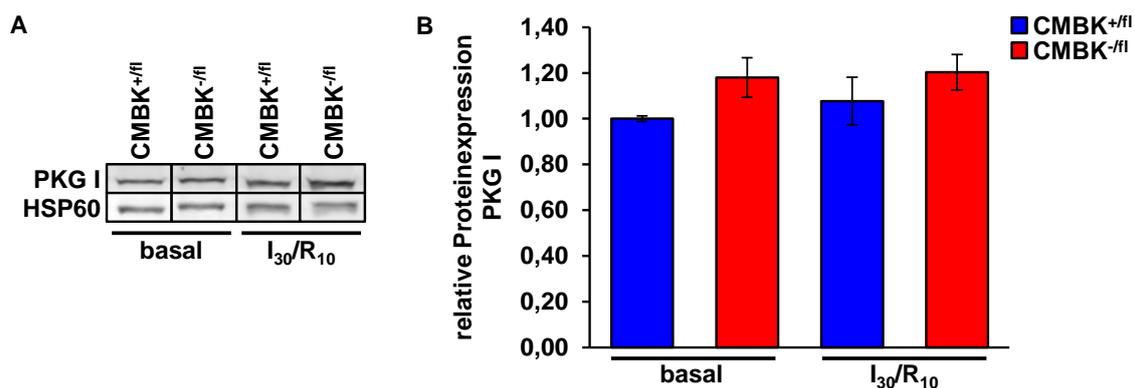


Abbildung 47: Expression der PKG I in CMBK-KO und -CTR-Herzlysaten

(A) Repräsentative Banden der Expression der PKG I basal und zu Beginn der Reperfusion (*I*₃₀/*R*₁₀). (B) Die Expression der PKG I im Herzen zeigte keine signifikanten Änderungen weder unter physiologischen Bedingungen noch nach *I*₃₀/*R*₁₀ zwischen den beiden Genotypen. HSP60 (*Hitzeschockprotein 60*) wurde als Ladungskontrolle verwendet. CMBK-KO (CMBK^{-fl}); CMBK-CTR (CMBK^{+fl}). Balken repräsentieren Mittelwerte \pm SEM mit je n=4.

HSP60 (*Hitzeschockprotein 60*) wurde als Ladungskontrolle verwendet, da in Vorversuchen gezeigt werden konnte, dass dessen Expression nicht durch das Auftreten von I/R beeinflusst wird (*Daten nicht gezeigt*). Repräsentative Proteinbanden von PKG I und HSP60 in CMBK-KO und -CTR-Herzlysaten sind in Abbildung 47A dargestellt. Wie erwartet zeigte sich kein signifikanter Einfluss der mitoBK-Ablation oder des I/R-Stimulus auf die Expression der PKG I (Abbildung 47B). Zudem zeigten sich nach dem Myokardinfarkt keine genotypspezifischen Änderungen in der Phosphorylierung des Vasodilatator-stimulierten Phosphoproteins (VASP bzw. p-VASP, Abbildung 48), welches als weitverbreiteter Biomarker für die Aktivität der PKG I Verwendung findet (Smolenski et al. 1998). Sowohl in den CMBK-Mutanten als auch in ihren Wurfgeschwisterkontrolltieren führte das verkürzte I₃₀/R₁₀-Setup zu einer Zunahme der auf VASP normalisierten p-VASP-Level was als Aktivitätszunahme der PKG I gewertet werden kann.

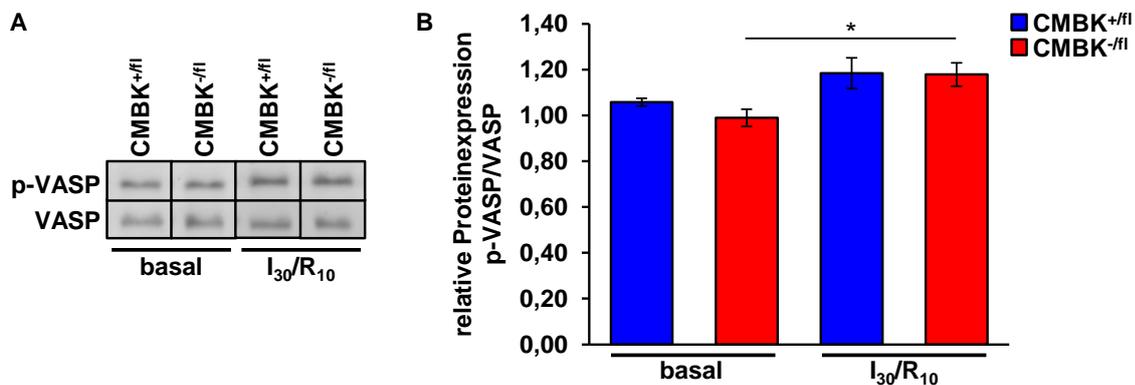


Abbildung 48: Keine genotypspezifischen Änderungen in der Aktivität der PKG I

(A) Repräsentative Banden der Expression von VASP (*Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein*) und seiner phosphorylierten Form (p-VASP) unter physiologischen Bedingungen und zu Beginn der Reperfusion (I₃₀/R₁₀). (B) Relative Proteinexpression von p-VASP zu VASP. Die Phosphorylierung von VASP als Marker für die Aktivität der kardialen PKG I (Smolenski et al. 1998) war sowohl in den CMBK-CTR (CMBK^{+fl}) als auch in den CMBK-KO (CMBK^{-fl}) nach I₃₀/R₁₀ leicht erhöht. Balken repräsentieren Mittelwerte ± SEM mit je n=4; *p<0,05.

Im Anhang (Annex-Abbildung 4) sind sowohl die Mittelwerte der Quantifizierung als auch die Proteinbanden, welche für die Auswertung herangezogen wurden, dargestellt. Zudem sind im Anhang die Risikoareale (Annex-Abbildung 2) und Basalcharakteristiken (Annex-Tabelle 4) der nachfolgend beschriebenen Versuchskohorten des akuten Myokardinfarktmodells aufgeführt.

3.9.2 Verabreichung der PDE5-Hemmer Sildenafil und Tadalafil im akuten Myokardinfarktmodell

Sildenafil und Tadalafil führen durch die Blockade der PDE5 zu einer Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration und damit zu einer Aktivierung des cGMP/PKG I-Signalweges. Eine Reduktion der Infarktgröße *in vivo* wurde für die intraatriale Injektion von Sildenafil (2 µg/kg KG) fünf Minuten vor Beginn der Reperfusion bereits in Abschnitt 3.2.2 gezeigt bzw. in der Literatur beschrieben (Methner et al. 2013b). Eine vergleichbare Kardioprotektion konnte in den Sildenafil-behandelten CMBK-CTR bestätigt werden ($11,64 \pm 0,91$ %, n=8; Abbildung 49A, links). Durch pharmakologische Hemmung des BK-Kanals mittels Paxilline konnten im Langendorffmodell bereits protektive Wirkungen von Sildenafil auf den I/R-Schaden aufgehoben werden (Behmenburg et al. 2015). Dass dieser Effekt auf eine Blockade des mitoBKs zurückzuführen ist, impliziert Abbildung 49A. Die CMBK-KO wiesen nach Sildenafilgabe Infarktgrößen auf, die mit dem basalen I/R-Schaden (Abbildung 41B) bzw. nach I/R und Injektion des Lösungsmittels (*ctr*³) vergleichbar waren ($35,59 \pm 1,51$ % für I/R + *SIL*, n=8; $36,07 \pm 1,43$ % für I/R + *ctr*³, n=3). Wie erwartet konnte auch in den Kontrolltieren weder ein Einfluss des Lösungsmittels, welches hier aus steriler 0,9%iger NaCl-Lösung bestand, noch des Applikationsweges festgestellt werden ($23,55 \pm 1,75$ %, n=3; Abbildung 49A, rechts). Abgebildet sind zudem charakteristische Herzscheiben der jeweiligen Versuchskohorte. Die hier verwendete Sildenafildosis führte rechnerisch zu einer Blutkonzentration von ca. 67 nM Sildenafil (siehe Abschnitt 2.5.3.7). Dabei ist davon auszugehen, dass die intraatriale Applikation lokal – zumindest kurzfristig – deutlich höhere Wirkspiegel erzeugt, weshalb eine Hemmung weiterer PDEs im Herzen nicht ausgeschlossen werden konnte. Insbesondere eine zusätzliche Blockade der PDE1C, deren mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) bei ungefähr 400 nM liegt, musste in Erwägung gezogen werden (Lukowski et al. 2010). Aus diesem Grund wurde zusätzlich noch die Wirkung des Wirkstoffes Tadalafil im akuten Myokardinfarkt untersucht, welcher durch eine spezifischere Blockade der PDE5 und längeren Halbwertszeiten charakterisiert ist und zudem intraperitoneal appliziert werden konnte (Salloum et al. 2009). Interessanterweise ließ sich auch für Tadalafil (1 mg/kg KG, 60 min vor Beginn der Ischämie, siehe Abschnitt 2.5.3.7) eine mitoBK-abhängige Kardioprotektion zeigen ($14,38 \pm 1,15$ %, für CMBK^{+fl}; $32,47 \pm 2,43$ % für CMBK^{-fl}; je n=9; Abbildung 49B, links). Allerdings waren insbesondere bei den CMBK-KO die Infarktgrößen sehr heterogen, so dass das Ansprechen einiger Knockouttiere auf den PDE5-Hemmer nicht vollständig ausgeschlossen werden konnte. Vergleicht man die Reduktion der Infarktgröße zwischen Sildenafil und Tadalafil in den CMBK-CTR, so lag die erreichbare Kardioprotektion in den Tadalafil-behandelten Kontrolltieren ca. 10 % niedriger. Es zeigten sich keine signifikanten Abweichungen in der Infarktgröße nach

alleiniger Gabe des Lösungsmittels von Tadalafil (*ctr⁴*, 40 % DMSO/H₂O; 21,47 ± 0,78 %, für CMBK^{+fl}; 30,98 ± 2,10 % für CMBK^{-fl}; je n=3; Abbildung 49B, rechts).

Zusammengefasst war die Reduktion der Infarktgrößen nach Sildenafil- bzw. Tadalafilgabe in den CMBK-KO deutlich reduziert, so dass eine Beteiligung des mitoBKs an der cGMP-abhängigen Kardioprotektion vor I/R-Schäden wahrscheinlich scheint (I/R + *SIL*: -57,2 ± 3,4 %, für CMBK^{+fl}; -7,0 ± 3,9 % für CMBK^{-fl}; I/R + *TAD*: -47,1 ± 4,2 %, für CMBK^{+fl}; -15,1 ± 6,3 % für CMBK^{-fl}; Abbildung 49C).

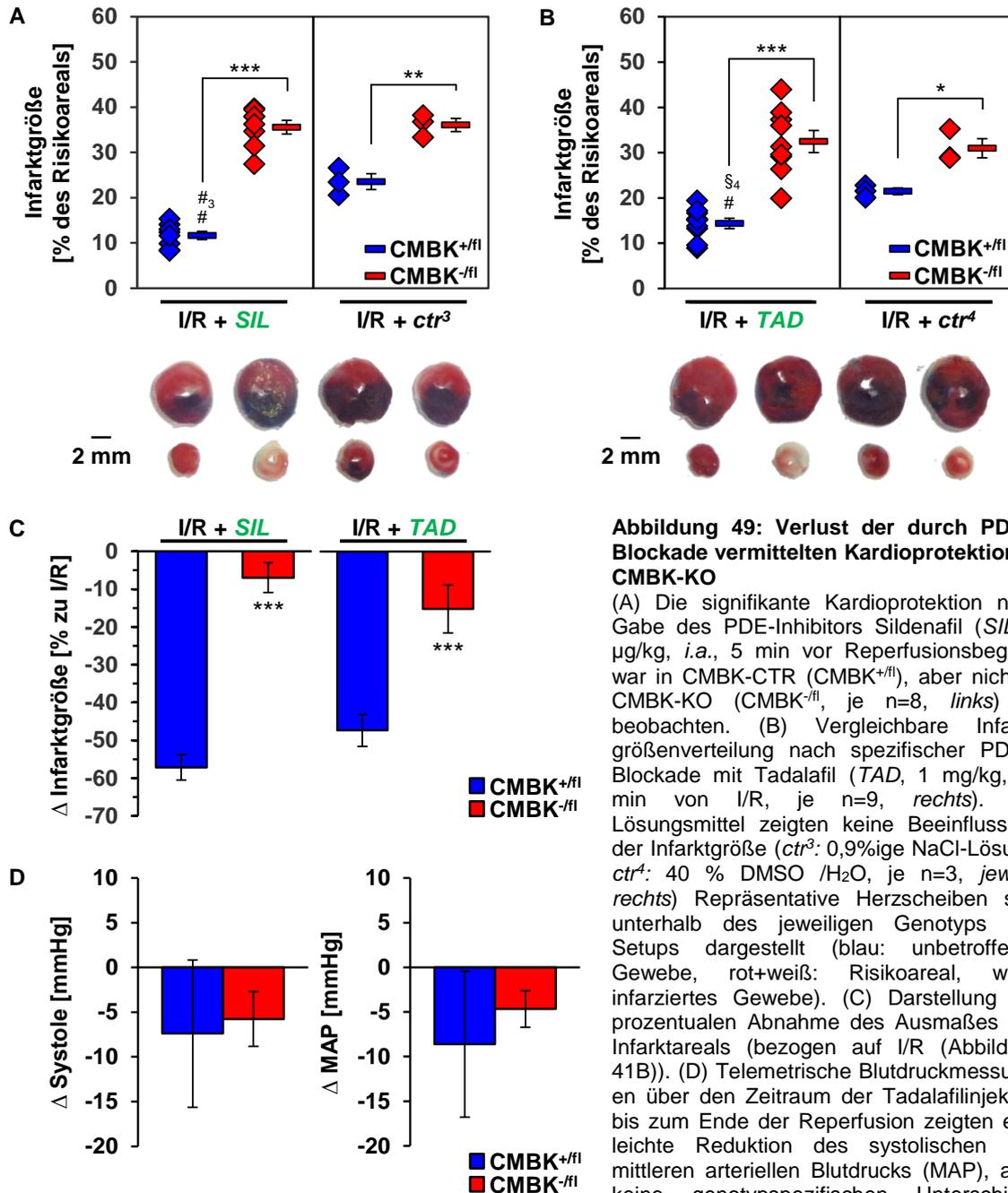


Abbildung 49: Verlust der durch PDE5-Blockade vermittelten Kardioprotektion in CMBK-KO

(A) Die signifikante Kardioprotektion nach Gabe des PDE-Inhibitors Sildenafil (*SIL*, 2 µg/kg, *i.a.*, 5 min vor Reperfusionbeginn) war in CMBK-CTR (CMBK^{+fl}), aber nicht in CMBK-KO (CMBK^{-fl}, je n=8, *links*) zu beobachten. (B) Vergleichbare Infarktgrößenverteilung nach spezifischer PDE5-Blockade mit Tadalafil (*TAD*, 1 mg/kg, 60 min von I/R, je n=9, *rechts*). Die Lösungsmittel zeigten keine Beeinflussung der Infarktgröße (*ctr³*: 0,9%ige NaCl-Lösung, *ctr⁴*: 40 % DMSO /H₂O, je n=3, *jeweils rechts*) Repräsentative Herzscheiben sind unterhalb des jeweiligen Genotyps und Setups dargestellt (blau: unbeeinträchtigtes Gewebe, rot+weiß: Risikoareal, weiß: infarziertes Gewebe). (C) Darstellung der prozentualen Abnahme des Ausmaßes des Infarktareals (bezogen auf I/R (Abbildung 41B)). (D) Telemetrische Blutdruckmessungen über den Zeitraum der Tadalafilinjektion bis zum Ende der Reperfusion zeigten eine leichte Reduktion des systolischen und mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP), aber keine genotypspezifischen Unterschiede (n=5 für CMBK^{+fl} und n=7 für CMBK^{-fl}). Rauten stellen einzelne Experimente dar, Balken zeigen Mittelwerte ± SEM; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 CMBK^{+fl} vs. CMBK^{-fl}; #: p<0,001 zu I/R und §4: p<0,01, #3: p<0,001 zu I/R + *ctr^{3/4}*.

Um auszuschließen, dass die beobachteten Unterschiede zwischen den Genotypen nach der Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration ihre Ursache in einer divergenten Hämodynamik hatten, wurde der arterielle Blutdruck über die Zeitspanne der Operation (I/R + TAD, 210 min; M2) nach Tadalafilgabe bestimmt (Abbildung 27A; Durchführung siehe Abschnitt 2.5.7.2). Dieses führte in beiden Kohorten zu einer leichten Abnahme des arteriellen Blutdrucks im Vergleich zu den basal ermittelten 48h-Blutdruckwerten (M1) ($-8,6 \pm 8,1$ % für CMBK^{+fl}, n=5; $-4,7 \pm 2,1$ % für CMBK^{-fl}, n=7; Abbildung 49D). Die Herzfrequenz blieb dabei unverändert (*Daten nicht gezeigt*). Diese akuten Messungen waren jedoch mit einem hohen Standardfehler behaftet. Dies war unter anderem dadurch bedingt, dass die Tiere sehr unterschiedlich in ihrem Verhalten auf die intraperitoneale Injektion reagierten.

3.9.3 Einfluss der pharmakologischen Stimulation bzw. Aktivierung der sGC auf den I/R-Schaden

Nachdem bestätigt werden konnte, dass die Kardioprotektion durch eine Erhöhung der cGMP-Spiegel mitoBK-abhängig ist, wurde die Rolle der sGC, die eine der beiden cGMP-generierenden Guanylatzyklasen darstellt, untersucht. Dabei wurden zum einen der sGC-Stimulator Riociguat und zum anderen der sGC-Aktivator Cinaciguat im Infarktmodell getestet. Mit Riociguat, welches nur an die sGC im reduzierten Zustand binden kann, war in beiden Genotypen eine Kardioprotektion zu beobachten ($15,63 \pm 2,60$ %, für CMBK^{+fl}, n=10; $31,28 \pm 2,62$ % für CMBK^{-fl}, n=8; Abbildung 50A, links). Die Reduktion der Infarktgröße war jedoch in den CMBK-CTR ca. 2-fach stärker ausgeprägt als in den CMBK-KO ($-42,5 \pm 9,6$ %, für CMBK^{+fl}; $-18,2 \pm 6,8$ % für CMBK^{-fl}; Abbildung 50B, links). Dabei wurden 50 ng Riociguat fünf Minuten vor dem Ende der ischämischen Phase intravenös verabreicht. Im Gegensatz hierzu wurde Cinaciguat (10 µg/kg KG) 30 Minuten vor der Ischämie intraperitoneal injiziert. Beide Administrationswege orientierten sich an bereits publizierten Protokollen (siehe Abschnitt 2.5.3.7). Die Aktivierung der sGC führte zu einer beachtlichen Abnahme des infarzierten Bereichs in den Kontrolltieren um $50,7 \pm 4,7$ % auf $13,46 \pm 1,28$ % (Abbildung 50A+B, rechts). In den CMBK-KO war hingegen mit Cinaciguat keine Kardioprotektion zu beobachten ($38,20 \pm 1,69$ %; je n=8, Abbildung 50A, rechts; Infarktgrößenreduktion: $-0,1 \pm 4,4$ %, Abbildung 50B, rechts). Auf die Lösungsmittelkontrolle wurde in diesem Setup verzichtet, da beide Wirkstoffe in DMSO angelöst und im Anschluss 1:2000 bzw. 1:400 mit steriler, isotoner NaCl-Lösung verdünnt wurden und so kein Lösungsmittel-abhängiger Effekt zu erwarten war.

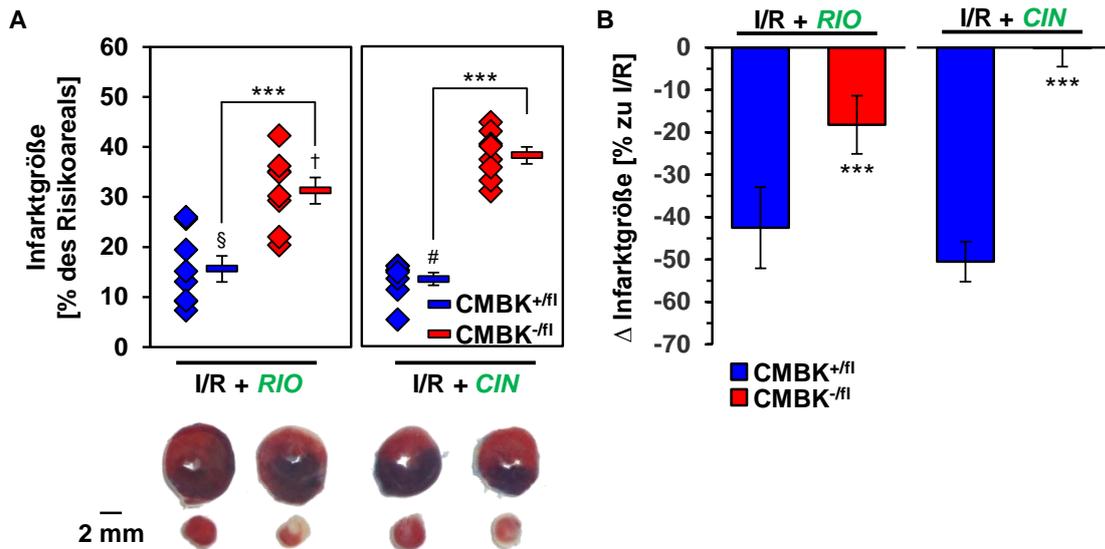


Abbildung 50: Kardioprotektion durch sGC-Stimulation bzw. -Aktivierung

(A) Die Infarktgröße (in % zum Risikoareal) war in den CMBK-CTR (CMBK^{+fl}, n=10) nach *i.v.*-Gabe von 50 ng Riociguat (*RIO*) 5 min vor Reperfusionbeginn signifikant reduziert. In den CMBK-KO (CMBK^{-fl}, n=8) zeigte sich hingegen nur eine leichte Kardioprotektion (*links*). Die Aktivierung der sGC mit Cinaciguat (*CIN*, 10 µg/kg, *i.p.*, 30 min vor I/R) führte zu einer noch deutlicheren Infarktreduktion in den CMBK-CTR und zeigte keine Wirkung in den CMBK-KO (je n=8, *rechts*). Repräsentative Herzscheiben sind unterhalb des jeweiligen Genotyps und Setups dargestellt (blau: unbetreffenes Gewebe, rot+weiß: Risikoareal, weiß: infarziertes Gewebe). (B) Darstellung der prozentualen Abnahme der Infarktgröße durch sGC-Stimulation bzw. -Aktivierung (bezogen auf I/R (Abbildung 41B)). Rauten zeigen einzelne Experimente, Balken repräsentieren Mittelwerte ± SEM; ***p<0,001 CMBK^{+fl} vs. CMBK^{-fl}; †: p<0,05, §: p<0,01, #: p<0,001 zu I/R.

3.10 Bedeutung der NOS für die iPost- und Sildenafil-abhängige Konditionierung

Um den Einfluss der NO-Synthasen (NOS) auf die kardioprotektiven Effekte von iPost und Sildenafil zu testen, wurden diese durch die Gabe von L-NAME blockiert. L-NAME stellt ein Prodrug dar, welches durch hydrolytische Abspaltung des Methylesters in die aktive Form N_ω-Nitro-L-Arginin umgewandelt wird und einen Inhibitor der konstitutiven NOS darstellt (Pfeiffer et al. 1996). Da die endotheliale NOS eine entscheidende Rolle bei der Vasodilatation spielt, wurde die Wirksamkeit von L-NAME in der eingesetzten Dosierung von 5 mg/ml im Trinkwasser über fünf Tage durch seinen Einfluss auf den arteriellen Blutdruck kontrolliert (Durchführung siehe Abschnitt 2.5.7.2). Dabei wurde aufgrund der beschriebenen Instabilität von L-NAME in wässriger Lösung das Trinkwasser regelmäßig erneuert. Abbildung 51 veranschaulicht einen deutlichen Anstieg des systolischen (A) und diastolischen (C) Blutdrucks an den Tagen 3 bis 5 unter L-NAME-Gabe im Vergleich zu den Basalwerten, was eine erfolgreiche Inhibition der NOS in den CMBK-KO und -CTR bestätigt (Systole: +9,9 ± 2,5 mmHg für CMBK^{+fl}; +18,9 ± 2,1 mmHg für CMBK^{-fl}; Diastole: +6,3 ± 3,0 mmHg für CMBK^{+fl}; +10,5 ± 4,0 mmHg für CMBK^{-fl}; je n=5). Das kompensatorische Absinken der Herzfrequenz ist in der Literatur beschrieben (Obst et al.

2006) und konnte im Rahmen dieser Arbeit für beide Genotypen verifiziert werden (-110 ± 6 bpm für CMBK^{+fl}; -98 ± 11 bpm für CMBK^{-fl}; Abbildung 51D). Auffallend ist, dass die unter physiologischen Bedingungen beobachteten Unterschiede im arteriellen Blutdruck zwischen den Genotypen (siehe Abschnitt 3.5) nach L-NAME-Gabe nicht mehr vorhanden waren und der Blutdruck der mitoBK-Mutanten auf das Niveau der Kontrolltiere anstieg (Abbildung 51B). Das Aktivitätsprofil zeigte keine signifikanten Unterschiede, die diese Beobachtung erklären würden (*Daten nicht gezeigt*).

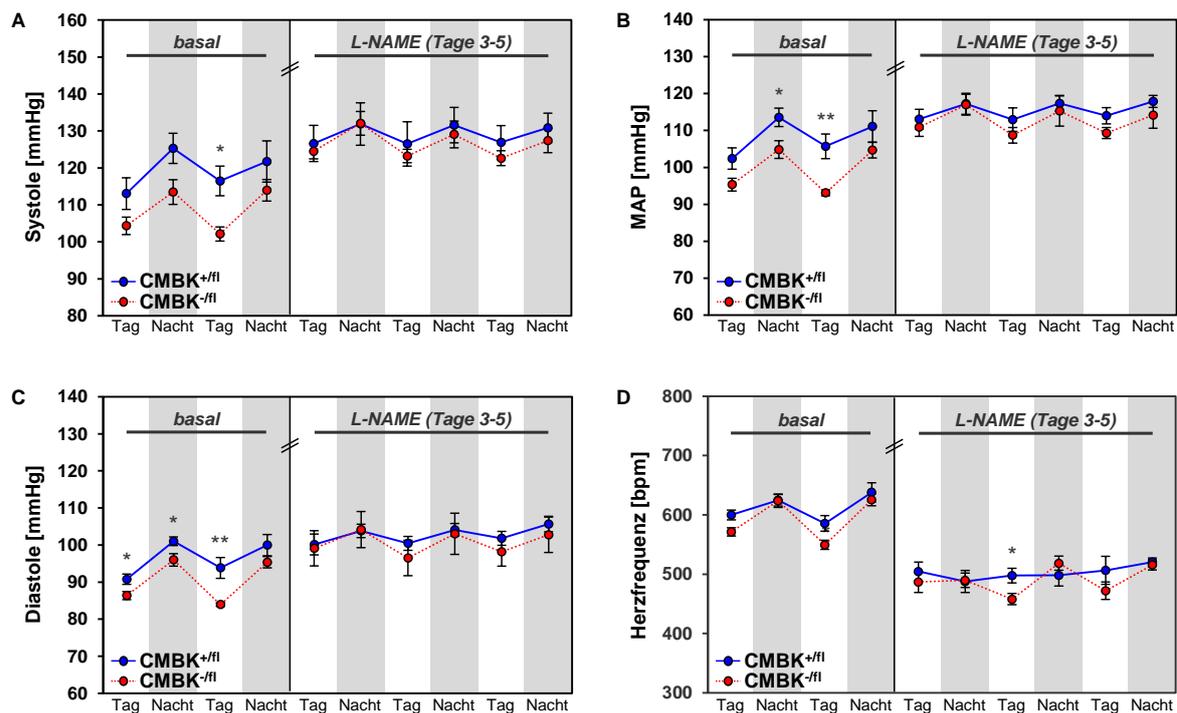


Abbildung 51: Beeinflussung der Hämodynamik durch L-NAME in CMBK-KO

Die Verabreichung des NO-Synthaseinhibitors L-NAME (N_{ω} -Nitro-L-Arginin-Methylester-Hydrochlorid, 5 mg/ml Trinkwasser) zeigte ab dem dritten Tag einen Anstieg des systolischen Blutdruckwertes (A), des mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) (B) und des diastolischen Wertes (C). Dies war begleitet von einer deutlichen Abnahme der Herzfrequenz (D). Dabei war eine Annäherung der unter physiologischen Bedingungen beobachteten, genotypspezifischen Blutdruckunterschiede zu erkennen. Kreise zeigen Mittelwerte \pm SEM mit je $n=5$; * $p<0,05$; ** $p<0,01$ CMBK^{+fl} vs. CMBK^{-fl}.

Die Blutdruckmessungen implizieren, dass die Gabe von L-NAME zu einer wirkungsvollen Inhibition der konstitutiv exprimierten NOS geführt hatte. Für die Durchführung des Infarktmodells wurden deshalb die Tage 4 und 5 der L-NAME-Behandlung gewählt. Interessanterweise hatte die alleinige Blockade der NOS keinen Einfluss auf den I/R-Schaden ($27,71 \pm 1,50$ %, $n=3$; Abbildung 52A, rechts; siehe auch Abbildung 73). Die endogene Bildung von NO scheint jedoch von immenser Bedeutung für die durch Konditionierung gesetzten kardioprotektiven Stimuli zu sein. In Abbildung 52A ist zu sehen, dass die Gabe von L-NAME die iPost-vermittelte Kardioprotektion in den CMBK-CTR (Abbildung 44) annähernd komplett aufheben konnte ($26,00 \pm 0,73$ %, $n=8$).

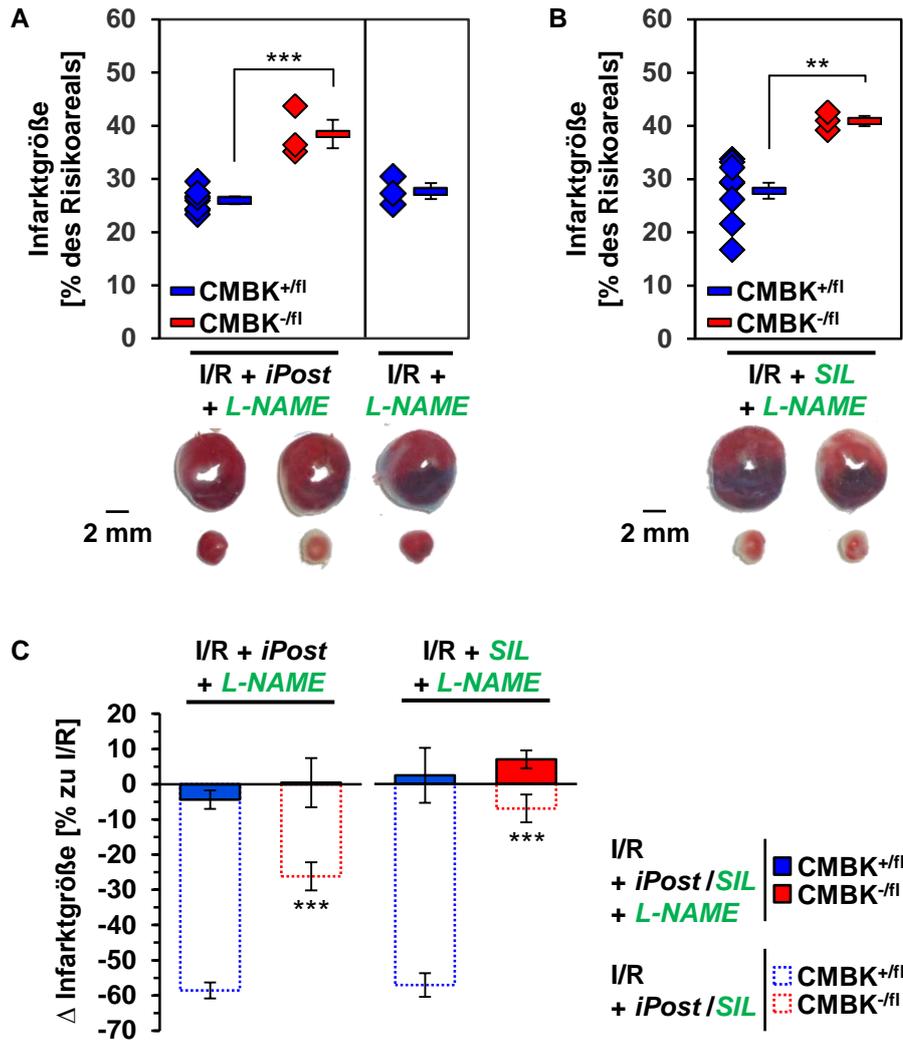


Abbildung 52: Einfluss einer NOS-Blockade auf die kardioprotektiven Effekte von iPost und Sildenafil
 (A) Die iPost-vermittelte Kardioprotektion wurde durch vorherige Blockade der NO-Synthase mit L-NAME (5 mg/ml Trinkwasser) vollständig inhibiert (n=8 für CMBK^{+fl} und n=3 für CMBK^{-fl}, *links*). Die alleinige Gabe von L-NAME beeinflusste nicht das Ausmaß des I/R-Schadens in den CMBK-CTR (n=3, *rechts*). (B) Der PDE-Inhibitor Sildenafil konnte unter L-NAME in den CMBK-CTR keine Reduktion der Infarktgröße mehr bewirken (n=8 für CMBK^{+fl} und n=3 für CMBK^{-fl}). Repräsentative Herzscheiben sind unterhalb des jeweiligen Genotyps und Setups dargestellt (blau: unbetreffenes Gewebe, rot+weiß: Risikoareal, weiß: infarziertes Gewebe). (C) Darstellung der prozentualen Infarktgrößenänderung durch die zusätzliche Gabe von L-NAME im Vergleich zur alleinigen Konditionierung mit iPost (Abbildung 44A) bzw. SIL (Abbildung 49A) ohne L-NAME (jeweils bezogen auf I/R (Abbildung 41B)). Rauten stellen einzelne Experimente dar, Balken repräsentieren Mittelwerte ± SEM; **p<0,01, ***p<0,001 CMBK^{+fl} vs. CMBK^{-fl}; *iPost*: Postkonditionierung; L-NAME: N_ω-Nitro-L-Arginin-Methylester-Hydrochlorid; *SIL*: Sildenafil.

Auch die Sildenafil-aktivierten Signalkaskaden waren von NO abhängig (27,85 ± 2,13 %, n=8; Abbildung 52B). In den CMBK-Knockouttieren zeigte die L-NAME-Gabe keinen Effekt auf den I/R-Schaden unter Sildenafilbehandlung, da in diesen Tieren mit Sildenafil, wie bereits beschrieben (siehe Abschnitt 3.9.2), keine Konditionierung möglich war (40,93 ± 0,98 %, n=3; Abbildung 52B). Auch die vergleichsweise geringen kardioprotektiven Effekte der iPost in den CMBK-KO (Abbildung 44) waren sensitiv für den NOS-Inhibitor (38,43 ± 2,67 %, n=3; Abbildung 52A). Ein direkter Vergleich der prozentualen

Infarktgrößenänderung verdeutlicht nochmals den Verlust der protektiven Effekte von iPost und Sildenafil unter der L-NAME-Behandlung (Abbildung 52C).

3.11 Rolle der ROS während des akuten I/R-Schadens

3.11.1 Quantifizierung der ROS mit MitoB *in vivo*

Um zu untersuchen, ob die gesteigerte Bildung von ROS, welche in isolierten Kardiomyozyten von globalen BK-KO nach Hypoxie/Reoxygenierung *in vitro* beobachtet werden konnte (Soltysinska et al. 2014), auch *in vivo* nach I/R auftritt, wurden die basal sowie im akuten Infarktmodell auftretenden ROS-Level gemessen. Hierfür wurde MitoB wie unter Abschnitt 2.5.6.1 beschrieben 60 min vor Beginn der I/R intravenös appliziert. Die intravenöse Injektion wurde unter Kurzzeit-Isoflurannarkose durchgeführt, die jedoch in diesem Setup die Infarktgröße nicht beeinflusste (Annex-Abbildung 7A). Das Mäuseherz wurde nach Ende des akuten Myokardinfarktmodells aufgearbeitet und es wurde massenspektrometrisch das Verhältnis MitoP zu MitoB bestimmt (Durchführung siehe Abschnitt 2.5.6.2). Die Umsetzung von MitoB zu MitoP erfolgt unter der Präsenz von H_2O_2 und ONOO^- hochspezifisch in den Mitochondrien und kann als Maß für die ROS-Produktion herangezogen werden (für Details siehe Abschnitt 2.5.6). Dabei zeigte sich basal keine veränderte ROS-Bildung zwischen den Genotypen ($0,028 \pm 0,005$ für $\text{CMBK}^{+/fl}$, $n=6$; $0,025 \pm 0,002$ für $\text{CMBK}^{-/fl}$, $n=5$; Abbildung 53). Nach 30 min Ischämie, gefolgt von 120 min Reperfusion traten sowohl in den CMBK-KO ($0,061 \pm 0,009$) als auch in den Kontrolltieren ($0,051 \pm 0,004$, je $n=8$) signifikant erhöhte ROS-Spiegel im Vergleich zu den Basalwerten auf. Mit der Injektion des sGC-Aktivators Cinaciguat ($10 \mu\text{g/kg KG}$, *i.p.*, 30 min vor I/R) erreichten die ROS-Level nach der 120-minütigen Reperfusionsphase in beiden Genotypen annähernd die basalen Spiegel ($0,027 \pm 0,002$ für $\text{CMBK}^{+/fl}$, $n=5$; $0,032 \pm 0,004$ für $\text{CMBK}^{-/fl}$, $n=6$). Der ROS-Anstieg zeigte sich dabei in den CMBK-Knockout Herzen sowohl nach I/R als auch nach I/R + Cinaciguat tendenziell erhöht (Abbildung 53).

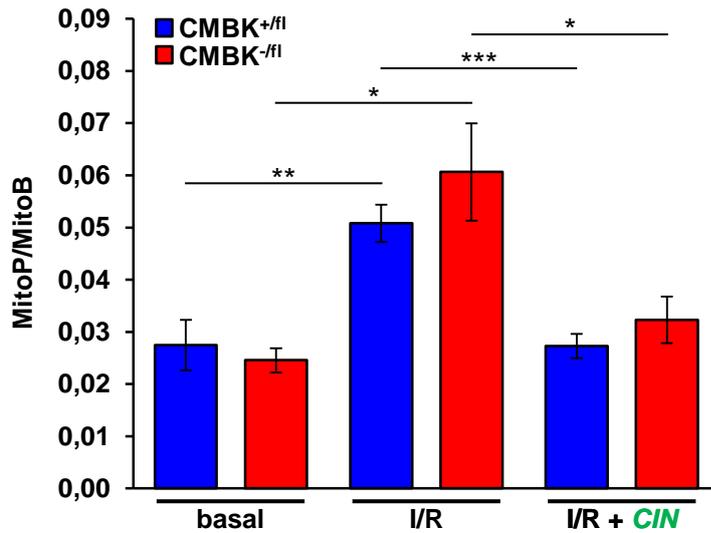


Abbildung 53: ROS-Spiegel in CMBK-KO und -CTR basal und nach I/R

Der Quotient MitoP/MitoB als Marker für die ROS-Bildung *in vivo* zeigte, dass CMBK-KO (CMBK^{-fl}) eine Tendenz zu höheren ROS-Level nach 30 min Ischämie und 120 min Reperfusion im Vergleich zu den Kontrolltieren (CMBK^{+fl}) aufweisen. Die Gabe von Cinaciguat (CIN, 10 µg/kg, *i.p.*, 30 min vor I/R) führte zu einer Reduktion der ROS-Spiegel nach I/R; je n=5 für basal (CMBK^{-fl}) und I/R+CIN (CMBK^{+fl}); je n=6 für basal (CMBK^{+fl}) und I/R+CIN (CMBK^{-fl}); je n=8 für I/R; Balken repräsentieren Mittelwerte ± SEM; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 CMBK^{+fl} vs. CMBK^{-fl}.

Die Betrachtung der normalisierten MitoP/MitoB-Level ergab einen signifikant höheren Anstieg der ROS-Produktion in den CMBK-KO verglichen mit den Wurfgeschwisterkontrolltieren nach I/R (Abbildung 54). Die gesteigerte mitochondriale ROS-Generierung in den mitoBK-defizienten Tieren lieferte damit erste Hinweise für beeinträchtigte, intramitochondriale Mechanismen *in vivo*, die während eines akuten Myokardinfarkts ablaufen und zu den erhöhten Infarktgrößen in diesen Tieren führen.

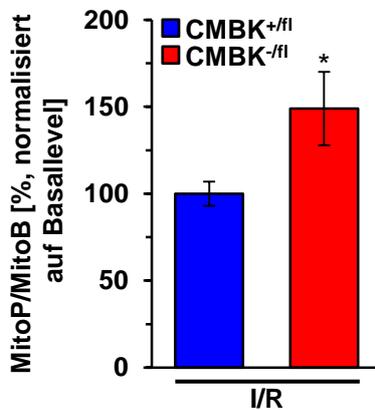


Abbildung 54: Normalisierte MitoP/MitoB-Level zeigen eine erhöhte ROS-Generierung in CMBK-KO

Die Normalisierung des MitoP/MitoB-Quotienten nach I/R auf die Basallevel des jeweiligen Genotyps, demonstrierte einen signifikanten Anstieg in der mitochondrialen ROS-Menge in CMBK-KO (CMBK^{-fl}) im Vergleich zu CMBK-Kontrolltieren (CMBK^{+fl}, je n=8). Balken stellen Mittelwerte ± SEM dar; *p<0,05 CMBK^{+fl} vs. CMBK^{-fl}.

Die trotz allem eher geringen Unterschiede zwischen den CMBK-Mutanten und ihren Wurfgeschwisterkontrollen sprechen dafür, dass der Zeitpunkt der ROS-Messungen (*hier*: nach 30 min Ischämie und 120 min Reperfusion) möglicherweise nicht ideal war. Wie eingangs beschrieben (siehe Abschnitt 1.2.2), ist insbesondere in den ersten Minuten der kardialen Reperfusion mit einem starken Anstieg der flüchtigen ROS-Intermediate zu rechnen. In einer weiteren, aktuell noch sehr präliminären Messreihe wurden die ROS-Spiegel daher nach 15-minütiger Reperfusionsphase untersucht (Annex-Abbildung 7B).

3.11.2 Expression der Superoxiddismutasen

Erhöhte Spiegel an ROS können auch Defizite in den ROS-metabolisierenden Enzymen zur Ursache haben. Aus diesem Grund wurden die Expressionslevel der Superoxiddismutasen MnSOD und CuZnSOD, die als endogene Antioxidantien einen entscheidenden Beitrag für die Disproportionierung der ROS (insbesondere der Superoxide) in Kardiomyozyten leisten, untersucht. Wie in Abbildung 55 dargestellt, zeigten sich jedoch weder basal noch nach 30-minütiger Ischämie gefolgt von 10 bzw. 120 min Reperfusion Unterschiede in den Expressionsspiegeln der SODs zwischen den beiden Genotypen. Die Absolutwerte der Quantifizierung sind im Anhang (Annex-Abbildung 5) aufgeführt.

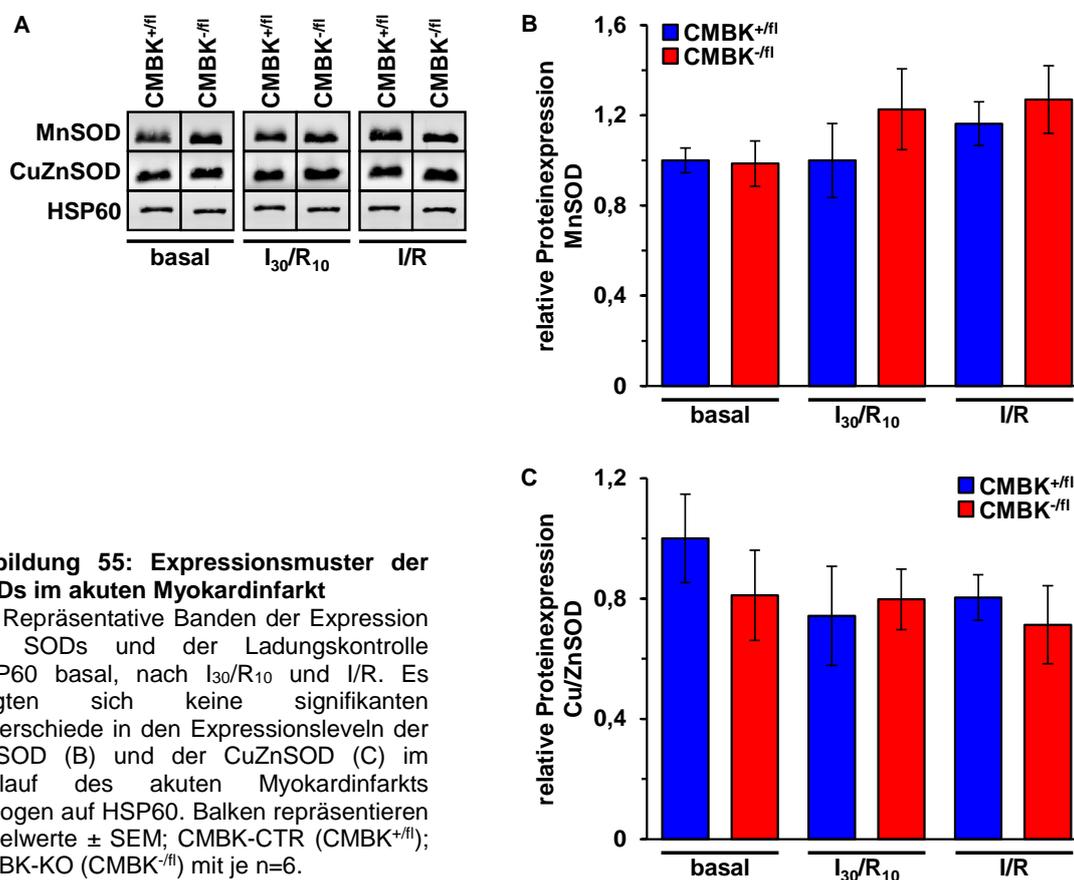


Abbildung 55: Expressionsmuster der SODs im akuten Myokardinfarkt
 (A) Repräsentative Banden der Expression der SODs und der Ladungskontrolle HSP60 basal, nach I₃₀/R₁₀ und I/R. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Expressionsleveln der MnSOD (B) und der CuZnSOD (C) im Verlauf des akuten Myokardinfarkts bezogen auf HSP60. Balken repräsentieren Mittelwerte ± SEM; CMBK-CTR (CMBK^{+fl}); CMBK-KO (CMBK^{-fl}) mit je n=6.

3.12 Einfluss der Deletion des mitoBKs auf ERK und Akt als die Hauptmediatoren des RISK-Signalweges im akuten Myokardinfarktmodell

Die Aktivierung des RISK (*reperfusion injury salvage kinase*)-Signalweges spielt für die Kardioprotektion durch die mechanische Konditionierung eine wichtige Rolle (Hausenloy and Yellon 2004). Des Weiteren kommt es in den ersten Minuten der Reperfusion zu einem Anstieg in der Phosphorylierung der RISK-Hauptmediatoren ERK und Akt (Nagata et al. 2015). Inwiefern die kardiomyozytäre Deletion des mitoBKs das Phosphorylierungsmuster und damit die Aktivität von ERK und Akt beeinflusst, wurde im Nachfolgenden genauer untersucht. Hierfür wurden CMBK-Knockouttiere und ihre Wurfgeschwisterkontrollen einer akuten Myokardinfarktoperation unterzogen. Das Herz wurde bereits nach zehnminütiger Reperusionsphase (I_{30}/R_{10}) entnommen und sofort aufgearbeitet (siehe Abschnitt 2.7.3-6). Abbildung 56A zeigt die relative Expression von ERK42/44 (ERK) sowie den Phosphorylierungsstatus der Kinase basal und nach I_{30}/R_{10} . Es ließ sich eine leichte aber signifikante Erhöhung der p-ERK-Level in den CMBK-CTR nach I_{30}/R_{10} beobachten (Abbildung 56B).

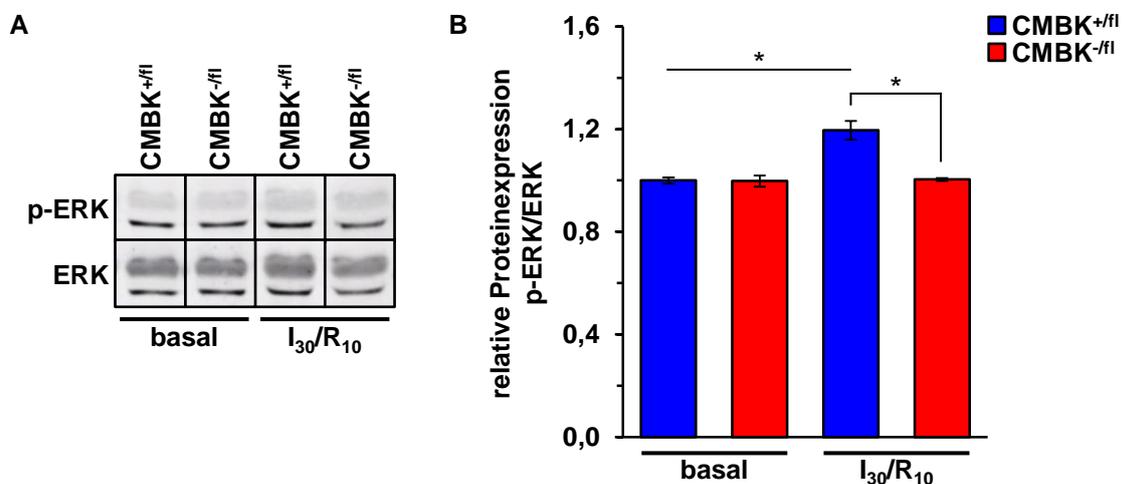


Abbildung 56: Erhöhte Phosphorylierung von ERK in CMBK-CTR nach I_{30}/R_{10}
 (A) Repräsentative Banden der Expression von ERK (ERK42/44) und p-ERK (p-ERK42/44) basal und zu Beginn der Reperfusion (I_{30}/R_{10}). (B) CMBK-CTR (CMBK^{+fl}) wiesen nach zehnminütiger Reperfusion eine signifikant erhöhte Phosphorylierung von ERK gegenüber den CMBK-KO (CMBK^{-fl}) auf. Basallevel zeigten sich unverändert zwischen den Genotypen. Balken repräsentieren Mittelwerte \pm SEM mit je n=4; *p<0,05.

Neben einer Aktivierung von ERK ist auch die Phosphorylierung der Kinase Akt entscheidend an der Signaltransduktion kardioprotektiver Prozesse beteiligt (siehe hierfür auch Abbildung 4). Unter physiologischen Bedingungen konnten in den Herzlysaten nur minimale p-Akt-Level detektiert werden (Abbildung 57A). Nach zehnminütiger

Reperusionsphase war insbesondere in den CMBK-CTR-Proben ein deutlicher Anstieg in der Phosphorylierung von Akt nachweisbar (Abbildung 57B).

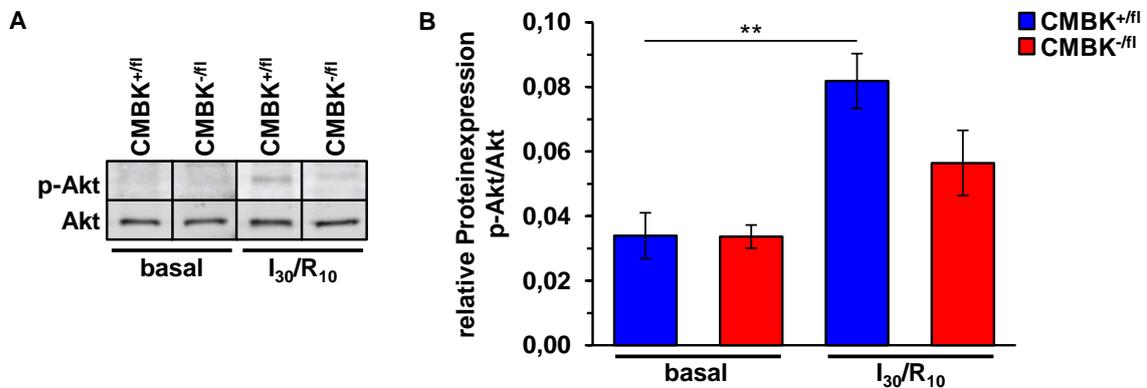


Abbildung 57: Aktivierung von Akt im akuten Myokardinfarktmodell

(A) Darstellung von Western Blot-Banden von Akt und p-Akt basal und nach I₃₀/R₁₀. (B) Deutlicher Anstieg in der Phosphorylierung von Akt in CMBK-CTR (CMBK^{+fl}) im Vergleich zu den CMBK-KO (CMBK^{-fl}). Basallevel zeigten sich unverändert zwischen den Genotypen. Balken repräsentieren Mittelwerte ± SEM mit je n=4; **p<0,01.

Die Mittelwerte der Quantifizierung und die Proteinbanden, welche für die Auswertung herangezogen wurden, sind für ERK und Akt im Anhang (Annex-Abbildung 6) zu finden. Diese Ergebnisse bestätigten zum einen die These, dass die Signalmoleküle ERK und Akt während eines akuten Myokardinfarkts zum Schutz vor Zelltod phosphoryliert werden. Zum anderen zeigten sie, dass die Deletion des mitoBKs zu einer verminderten Aktivierung dieser kardioprotektiven Signalelemente führt.

3.13 Auswirkungen einer 24-stündigen permanenten Ligatur auf die Infarktgröße in CMBK-CTR und -KO-Herzen

Die permanente Ligatur stellt für das Versuchstier eine große Herausforderung dar, da die linke Koronararterie in diesem Setup dauerhaft verschlossen wird (Durchführung siehe Abschnitt 2.5.5). Dadurch lässt sich der Schaden, der einzig durch die Ischämie verursacht wird, von dem Reperfusionsschaden differenzieren. Bedeutsam ist hierbei, dass die Tiere nicht wie im akuten Myokardinfarktmodell bis zum Ende der Reperfusion im anästhesierten Zustand verbleiben, sondern dass nach der Ligatur die Wunde verschlossen wird, die Tiere aus der Narkose aufgeweckt werden und die restliche Zeit unter Analgetikagabe verbleiben (siehe Abschnitt 2.5.5 für weitere Details).

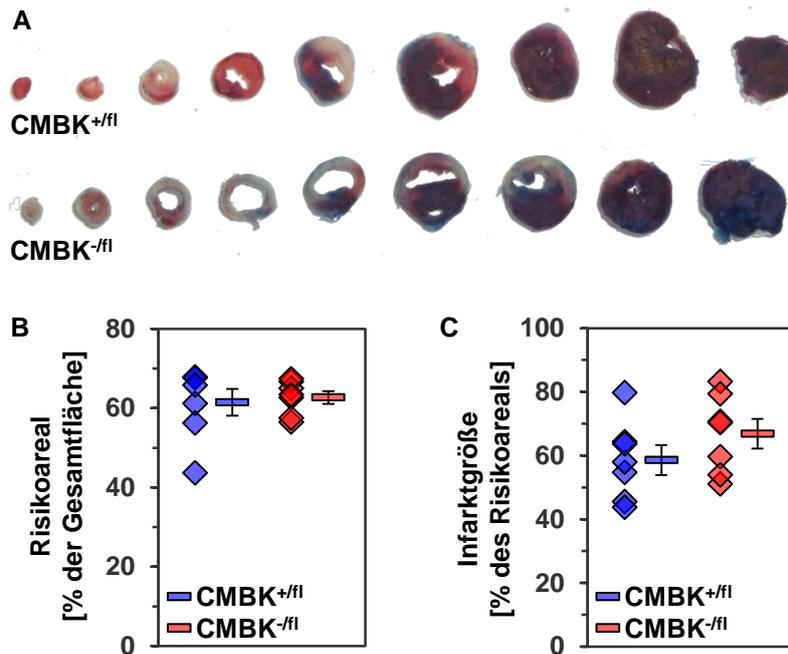


Abbildung 58: Einfluss des mitoBKs auf die Herzscheidigung bei permanenter Ligatur der LCA

(A) Repräsentative Herzscheiben von CMBK-CTR (CMBK^{+fl}) und CMBK-KO (CMBK^{-fl}) nach 24-stündiger Ligatur der LCA und Evans Blue/TTC-Färbung (blau: unbetreffenes Gewebe, rot+weiß: Risikoareal, weiß: infarziertes Gewebe). (B) Risikoareale beider Genotypen nach permanenter Ligatur (je n=7). (C) Deutlicher Anstieg in der Größe des infarzierten Bereichs durch die 24-stündige Ligatur in beiden Genotypen verglichen mit I/R. Rauten stellen einzelne Experimente dar, Balken zeigen Mittelwerte ± SEM.

CMBK-KO und -CTR im Alter von 12 bis 13 Wochen wurden dem 24-stündigen Myokardinfarkt mit anschließender Evans Blue/TTC-Färbung unterzogen. Abbildung 58A zeigt charakteristische Herzen der beiden Genotypen. Dabei wiesen 57 % der CMBK-KO und nur 14 % der CMBK-CTR ein äußerst dilatiertes Herz auf. Die Ausdehnung des Risikoareals entsprach dabei dem Areal nach akuter I/R (61,46 ± 3,39 %, für CMBK^{+fl}; 62,70 ± 1,62 % für CMBK^{-fl}; je n=7; Abbildung 58B). Die Quantifizierung der Infarktgröße zeigte jedoch einen massiven Anstieg des Infarktareals im Vergleich zum akuten Myokardinfarkt (siehe Abbildung 58C und Abbildung 41B), aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen. Dennoch zeigten die CMBK-KO eine klare Tendenz zu größeren Herzmuskelschäden (58,59 ± 4,67 %, für CMBK^{+fl}; 66,87 ± 4,68 % für CMBK^{-fl}; Abbildung 58C). Die Basalcharakteristiken der operierten Tiere sind im Anhang (Annex-Tabelle 5) aufgeführt.

3.14 Folgen einer mitoBK-Ablation auf das Langzeitüberleben und die Herzfunktion im chronischen Myokardinfarktmodell

Neben der direkten Gabe pharmakologischer Substanzen zur akuten Verminderung der I/R-Schäden nach einem akuten Myokardinfarkt sind vor allem das Langzeitüberleben und die damit verbundene Lebensqualität von klinischem Interesse. Aus diesem Grund wurden die Erkenntnisse aus dem akuten Modell in ein chronisches Myokardinfarktmodell von 30 min Ischämie, gefolgt von einer vierwöchigen Reperfusionphase (I₃₀/R_{4Wo})

übertragen. Es wurde eine Gesamtzahl von 31 männlichen Tieren im Alter von 10 bis 12 Wochen operiert. Zwei Tiere der Versuchskohorte verstarben intra-operativ und ein Tier nach einer weiteren Woche Reperfusion. Die verbleibenden 28 Tiere zeigten eine gute Erholung, was anhand des Gewichtskurvenverlaufs dokumentiert ist (Annex-Abbildung 8). Die Operation unterlag einer herausfordernden Technik, da nur eine technisch begrenzte Visualisierung der linken Koronararterie möglich war (Durchführung siehe Abschnitt 2.5.4). Um sicherzustellen, dass Tiere, die möglicherweise keiner Okklusion der linken Koronararterie ausgesetzt waren, die nachfolgenden Statistiken nicht verfälschten, wurden von drei Wissenschaftlern (Dr. Julia Straubinger, Dipl.-Pharm. Sandra Frankenreiter und JProf. Dr. Robert Lukowski (A-C, Annex-Tabelle 11)) unabhängig die Herzen hinsichtlich ihres Aussehens, ihres Fibrosierungsgrades und ihrer Auswurffraktion bewertet. Befand ein Wissenschaftler ein Herz anhand der genannten Parameter für infarziert (+), wurde es in die Statistik mit aufgenommen. Anhand dieser Methode kam es durch alle Wissenschaftler zum Ausschluss von zwei Herzen (rot markiert), die sich beide ohne nennenswertes Narbengewebe präsentierten, nur sehr wenig Fibrose entwickelt hatten und eine fast physiologische Auswurffraktion aufwiesen (für Details siehe Annex-Tabelle 11). Es konnten somit letztlich 84 % der operierten Tiere für die finale Statistik berücksichtigt werden (entspricht 13 Mäusen pro Genotyp).

Die Bestimmung der Herzgewichte bezogen auf das jeweilige Körpergewicht bzw. die Tibialänge zeigte einen deutlichen Anstieg im Vergleich zu den Basalwerten des entsprechenden Genotyps, wobei keine genotypbedingten Unterschiede erkennbar waren (Tabelle 7).

Tabelle 7: Herzgewichte der männlichen CMBK-CTR (CMBK^{+fl}) und CMBK-KO (CMBK^{-fl}) nach I₃₀/R_{4w0}. *p<0,05, **p<0,01 I₃₀/R_{4w0} vs. HG bzw. HG/KG basal des entsprechenden Genotyps

	KG [g]	HG [mg]	TL [mm]	HG/KG [mg/g]	HG/TL [mg/mm]
CMBK ^{+fl} (n=13)	25,2 ± 0,3	125,3 ± 2,4*	17,27 ± 0,12	4,96 ± 0,07**	7,26 ± 0,14
CMBK ^{-fl} (n=13)	25,1 ± 0,3	124,6 ± 1,9*	17,31 ± 0,16	4,97 ± 0,05*	7,21 ± 0,12

3.14.1 Bestimmung der Herzfunktion mittels Echokardiographie und konventioneller Auswertung

Die Beschaffenheit des linken Ventrikels und die sich daraus ableitende Herzfunktion stellen wichtige Parameter für die Bewertung der Langzeitfolgen eines akuten Myokardinfarkts dar. Nach der vierwöchigen Reperfusionsphase im chronischen

Myokardinfarktmodell wurden die Herzen der CMBK-Knockouttiere und ihrer Wurfgeschwisterkontrollen echokardiographisch untersucht.

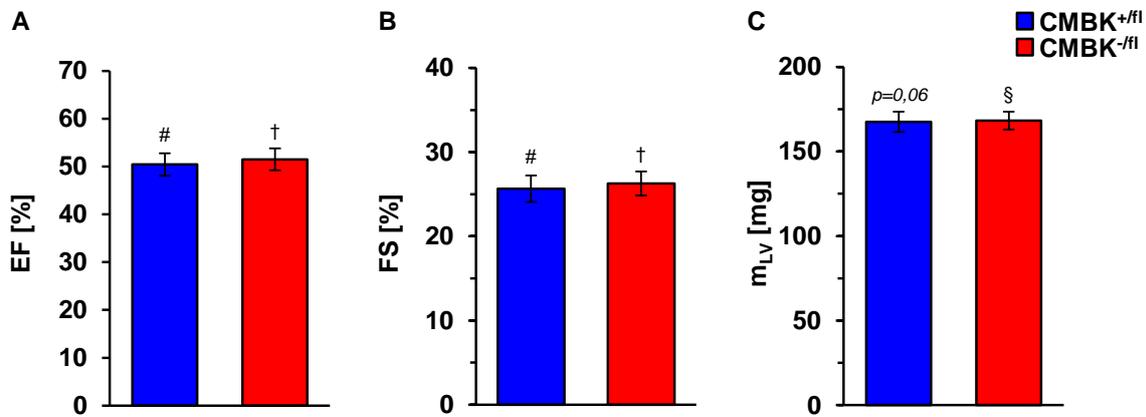
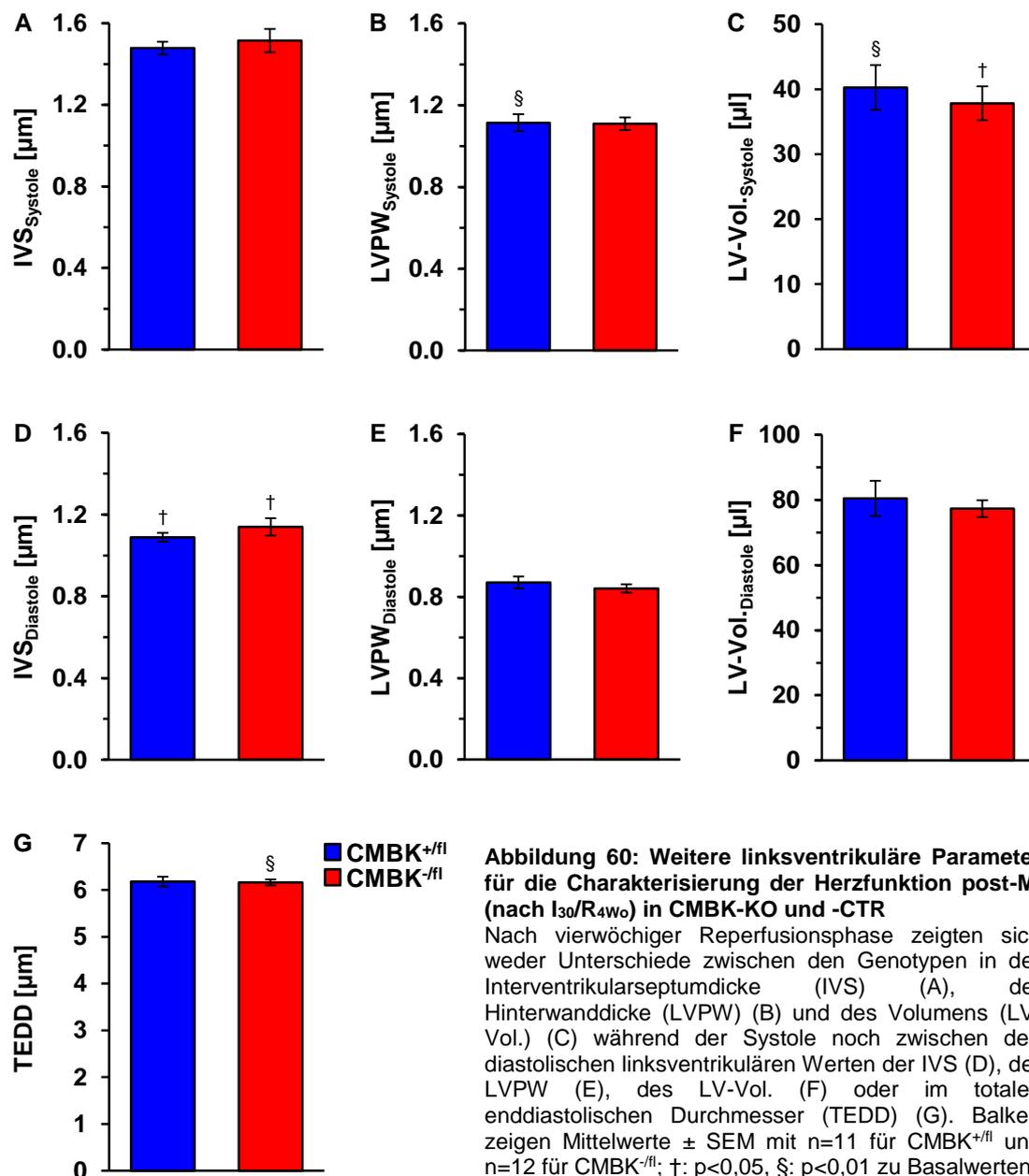


Abbildung 59: Genotypunabhängige Beeinträchtigung der Herzfunktion nach I₃₀/R_{4W0}

(A) Reduzierte Auswurffraktion (EF) sowohl in CMBK-KO (CMBK^{-fl}) als auch in CMBK-CTR (CMBK^{+fl}) nach I₃₀/R_{4W0} verglichen mit Basalbedingungen (Abbildung 39). (B) Genotypunabhängige verminderte Verkürzungsfraktion (FS) nach Durchführung des chronischen Myokardinfarktmodells. (C) Vergleichbare Erhöhung der linksventrikulären Massen zwischen den beiden Genotypen. Balken zeigen Mittelwerte ± SEM mit n=11 für CMBK^{+fl} und n=12 für CMBK^{-fl}; †: p<0,05, §: p<0,01, #: p<0,001 zu Basalwerten.

Es konnte sowohl eine signifikante Reduktion der Auswurffraktion (EF; 50,45 ± 2,35 % für CMBK^{+fl}, n=11; 51,50 ± 2,30 % für CMBK^{-fl}, n=12; Abbildung 59A) als auch der Verkürzungsfraktion (FS; 25,65 ± 1,59 % für CMBK^{+fl}; 26,27 ± 1,43 % für CMBK^{-fl}; Abbildung 59B) in beiden Genotypen festgestellt werden. Die unter basalen Bedingungen beobachtete, leicht verminderte Herzfunktion der CMBK-KO gegenüber den Kontrolltieren (Abbildung 39) wurde von dem I/R-Schaden nach I₃₀/R_{4W0} maskiert. Außerdem zeigte sich in beiden Genotypen ein deutlicher Anstieg der linksventrikulären Masse nach I₃₀/R_{4W0} (m_{LV}, 167,49 ± 5,98 % für CMBK^{+fl}; 168,30 ± 5,30 % für CMBK^{-fl}; Abbildung 59C).



Bei der Bestimmung weiterer echokardiographischer Parameter konnten insbesondere in der Interventrikulärseptumdicke (IVS) während der Diastole und im linksventrikulären Volumen (LV-Vol.) während der Systole signifikante, genotypunabhängige Beeinträchtigungen vier Wochen nach dem Myokardinfarkt (post-MI) beobachtet werden (Abbildung 60C und D). Die basalen Unterschiede in der systolischen, linksventrikulären Hinterwanddicke (LVPW) waren nach I₃₀/R_{4Wo} nicht mehr erkennbar (siehe Abbildung 40B und Abbildung 60B). Weitere Parameter wie die systolische Interventrikulärseptumdicke (Abbildung 60A), die Hinterwanddicke (E) und das Volumen (F) des linken Ventrikels in der Diastole, sowie der totale enddiastolische Durchmesser (TEDD) (G) zeigten sich nach dem Myokardinfarkt nur wenig verändert. Die Deletion des mitoBKs zeigte hierbei nur geringfügige Auswirkungen auf die langfristigen Folgen eines Myokardinfarkts. Die

Absolutwerte der weiteren Parameter, welche mit der konventionellen Auswertemethode bestimmt wurden, sind im Anhang (Annex-Tabelle 10) tabellarisch zusammengefasst.

3.14.2 Vergleich der Auswertemethoden „konventionell“ und „Vevo Strain 2100“ anhand der Auswurffraktion

Die Auswertung mittels der konventionellen Methode erfolgte durch das Einzeichnen einer vertikalen Linie mittig zwischen der Aortenklappe und dem Apex in der Längsachse des Herzens (Abbildung 61A, Durchführung siehe Abschnitt 2.5.8). Diese Methode ist limitiert und mit Fehlern behaftet. Insbesondere können hierdurch regionale Dysfunktionen des Herzens, die die Ursache von Spätschäden darstellen können, leicht übersehen werden. Durch die Ligatur der LCA waren vor allem Beeinträchtigungen der vom Infarkt betroffenen Areale in weiter distal liegenden Herzregionen (z.B. Apex) zu erwarten. Um zu verifizieren, dass mit der konventionellen Auswertemethode keine Dysfunktionen unerkannt geblieben waren, wurde eine erst kürzlich etablierte Auswertemethode mit der Software „Vevo Strain 2100“ herangezogen (Bauer et al. 2011). Ein deutlicher Vorteil dieser Methode stellte die Einbeziehung des gesamten Ventrikels dar (Abbildung 61B, Durchführung siehe Abschnitt 2.5.8.2). Unter physiologischen Bedingungen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Auswertemethoden, was für die Richtigkeit der „Vevo Strain 2100“-Methode spricht (*konventionell*: $64,63 \pm 1,84$ % für CMBK^{+fl}; $58,04 \pm 1,42$ % für CMBK^{-fl}; „Vevo Strain 2100“: $61,29 \pm 1,21$ % für CMBK^{+fl}; $56,13 \pm 2,02$ % für CMBK^{-fl}; jeweils n=8; Abbildung 61C). Die Auswurffraktionen waren mit der „Vevo Strain 2100“-Auswertung in beiden Genotypen leicht reduziert. Der mit der konventionellen Methode ermittelte Unterschied zwischen den Auswurffraktionen der CMBK-KO und -CTR erreichte mit der „Vevo Strain 2100“-Methode knapp kein Signifikanzniveau ($p=0.05$).

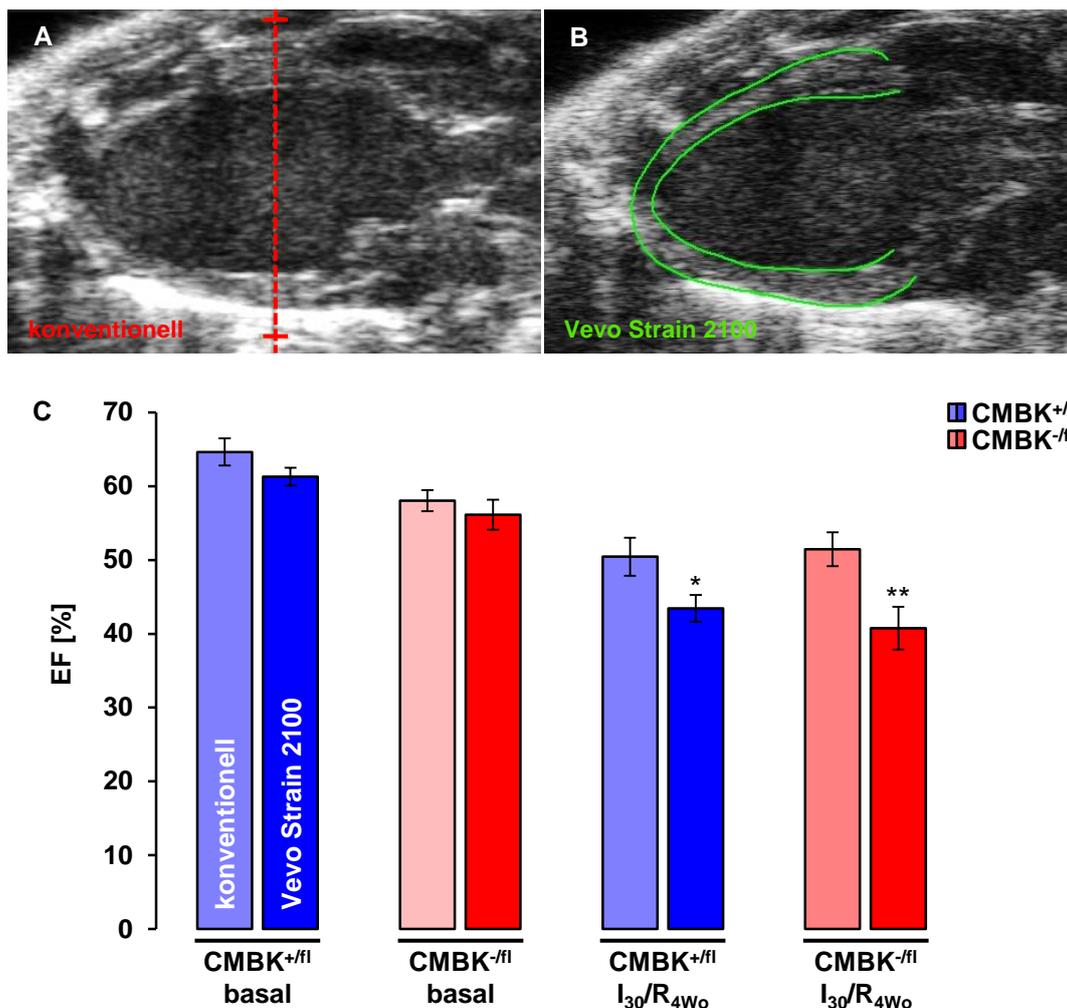


Abbildung 61: Vergleich der Auswertemethoden anhand der EF

Auswertung eines CMBK-Kontrollherzens unter basalen Bedingungen nach der konventionellen Methode (A) und mit der „Vevo Strain 2100“-Methode (B). (C) Es zeigten sich vergleichbare Auswurffrac-tionen (EF) zwischen den beiden Auswertemethoden unter basalen Bedingungen in CMBK-CTR (CMBK^{+fl}) und -KO (CMBK^{-fl}), je n=8. Nach I₃₀/R_{4Wo} waren die Auswurffrac-tionen mit der „Vevo Strain 2100“-Methode in beiden Genotypen signifikant verringert (n=11 für CMBK^{+fl} und n=12 für CMBK^{-fl}). Balken zeigen Mittelwerte ± SEM; *p<0,05; **p<0,01 konventionelle Methode vs. „Vevo Strain 2100“-Methode.

Deutliche Differenzen zwischen den Methoden waren in dem chronischen Infarktmodell zu erkennen. Hier war in beiden Genotypen mit der „Vevo Strain 2100“-Methode eine signifikant stärkere Reduktion der Auswurffrac-tion zu beobachten und der Effekt des I₃₀/R_{4Wo}-Schadens auf die Funktion des Herzens deutlich ausgeprägter als mit der konventionellen Methode (*konventionell*: 50,45 ± 2,57 % für CMBK^{+fl}, je n=11; 51,47 ± 2,30 % für CMBK^{-fl}, je n=12; „Vevo Strain 2100“: 43,46 ± 1,83 % für CMBK^{+fl}; 40,75 ± 2,91 % für CMBK^{-fl}; Abbildung 61C). Die Abweichung, die sich durch die Auswertung der Auswurffrac-tion mit der konventionellen Methode ergab, ist in Abbildung 62 nochmals in Prozent verdeutlicht dargestellt. Wohingegen die Unterschiede bei den basalen Messungen weniger als 10 % betragen, wiesen die Werte der infarzierten Tiere massive

Differenzen auf (19 ± 4 % für CMBK^{+fl}; 22 ± 4 % für CMBK^{-fl}). Dabei wurden mit der konventionellen Methode durchweg höhere Auswurffractionen errechnet.

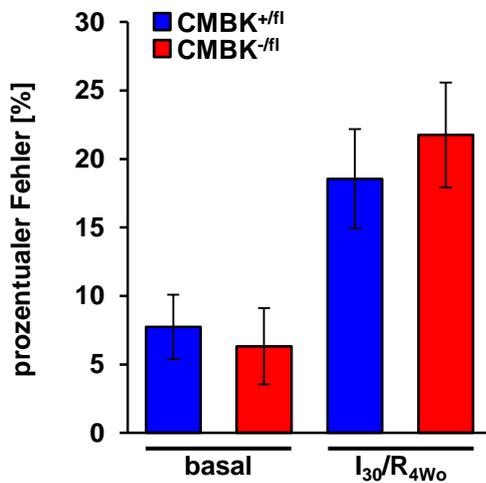


Abbildung 62: Prozentuale Abweichung in der Auswurffraction (EF) zwischen der konventionellen Auswertemethode und der „Vevo Strain 2100“-Methode

Die konventionelle Methode führte zu deutlichen, genotypunabhängigen Abweichungen in der Größe der EF insbesondere im chronischen Infarktmodell.

Damit zeigte sich erstens, dass die konventionelle Auswertung ungeeignet für die Untersuchung der lokalen Myokardinfarkt-bedingten Dysfunktionen war, da nicht mittig zwischen Apex und Aortenklappe liegende Beeinträchtigungen mit dieser Methode unidentifiziert blieben. Zweitens konnte demonstriert werden, dass mit der Software „Vevo Strain 2100“ eine geeignete Methode für die Detailauswertung der Herzfunktion nach einem Myokardinfarkt zur Verfügung steht.

3.14.3 Segmentanalyse der Herzen post-MI mittels der „Vevo Strain 2100“-Methode

Die Software „Vevo Strain 2100“ bot zudem die Möglichkeit, das Herz in verschiedene Bereiche einzuteilen und diese separat zu charakterisieren. Nachfolgend sind ausschließlich Daten des Endokards dargestellt, da kein abweichendes Verhalten des Epikards beobachtet werden konnte (*Daten nicht gezeigt*). Abbildung 63 zeigt die Originallinien der 48 Punkte, anhand derer der Verlauf des Endokards (und des Epikards) für die Verformung des Herzens während Systole und Diastole extrapoliert wurde (siehe hierfür auch 2.5.8.2). Die Verformbarkeit des Herzens ist ein wichtiger Parameter für die Aktivität bzw. Passivität des Gewebes. Nekrotische Gewebestücke nach einem Myokardinfarkt weisen keine oder höchstens passive Bewegung auf, während gesundes Gewebe in der Systole eine aktive Bewegung vollzieht, welche sich in der Kontraktion und Dilatation des Herzens widerspiegelt. Dabei ist der Zeitpunkt der Enddiastole als 0 %

Verformung definiert. In Abbildung 63A ist die charakteristische longitudinale Verformung eines Kontrolltierherzens unter physiologischen Bedingungen zu sehen. Diese definierte sich vor allem über die Synchronizität der Linien eines Herzens untereinander bei den untersuchten Tieren (n=5). In den Knockouterzen zeigten sich leichte Unregelmäßigkeiten im Verlauf der Systole (Abbildung 63B). Vier Wochen nach dem Myokardinfarkt war die unter physiologischen Bedingungen aufgetretene Synchronizität kaum zu erkennen. Dabei war der Linienvverlauf in den Herzen der CMBK-KO (Abbildung 63D) noch unregelmäßiger als der in den infarzierten Kontrollherzen (Abbildung 63C).

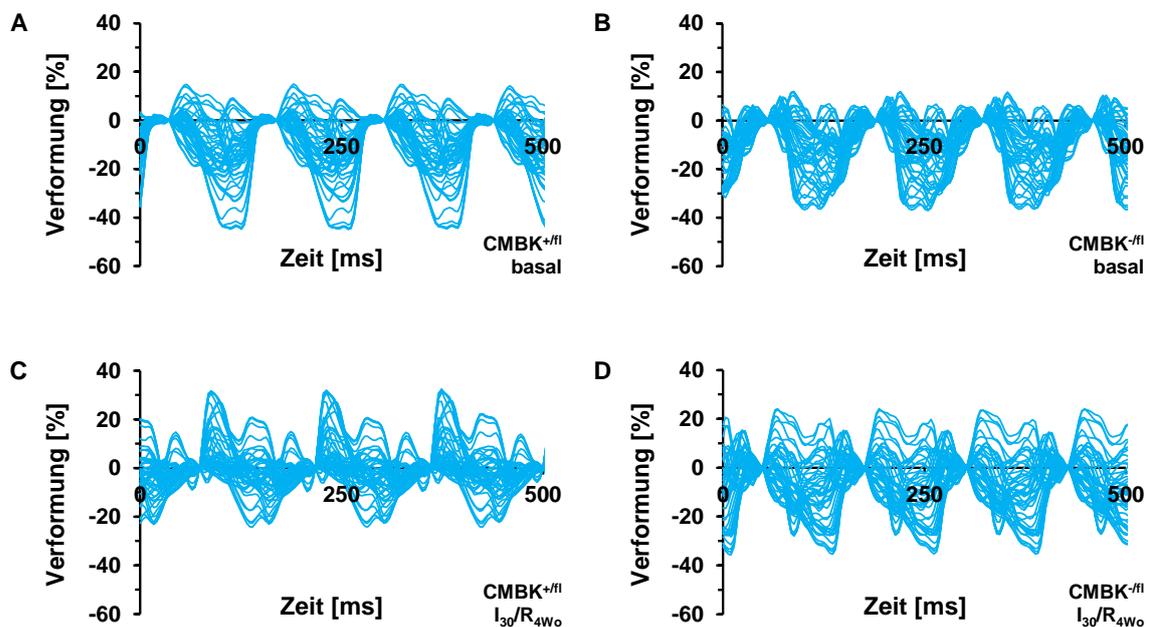


Abbildung 63: Änderungen der longitudinalen Verformbarkeit des Endokards nach Myokardinfarkt

Repräsentative Originalspuren der 48 Punkte entlang des Endokards zeigen die longitudinale prozentuale Verformung des Herzens in CMBK-CTR (CMBK^{+/fl}) (A) und CMBK-KO (CMBK^{-/fl}) (B) unter basalen Bedingungen, sowie nach I₃₀/R_{4Wo} in CMBK-CTR (C) und CMBK-KO (D). Echokardiographische Messungen erfolgten in der Längsachse, Auswertung mit „Vevo Strain 2100“.

Die genauere Beurteilung der Verformbarkeit konnte mithilfe der Segmentanalyse getroffen werden. Hierfür fasste die Software „Vevo Strain 2100“ semi-automatisch jeweils acht benachbarte Punkte in einem Segment zusammen. Dadurch wurde das Herz in zwei Basissegmente (*Base*), zwei mittlere Segmente (*Mid*) und zwei Apexbereiche (*Apex*), jeweils anterior (*ant.*) und posterior (*post.*) differenziert (Abbildung 64, Legende). Abbildung 64 zeigt repräsentative longitudinale Verformungen der beiden Genotypen ± Myokardinfarkt der einzelnen Segmente während Systole und Diastole. Hierbei sind unter A, B, C₁ und D₁ dieselben Tiere wie in Abbildung 63 dargestellt.

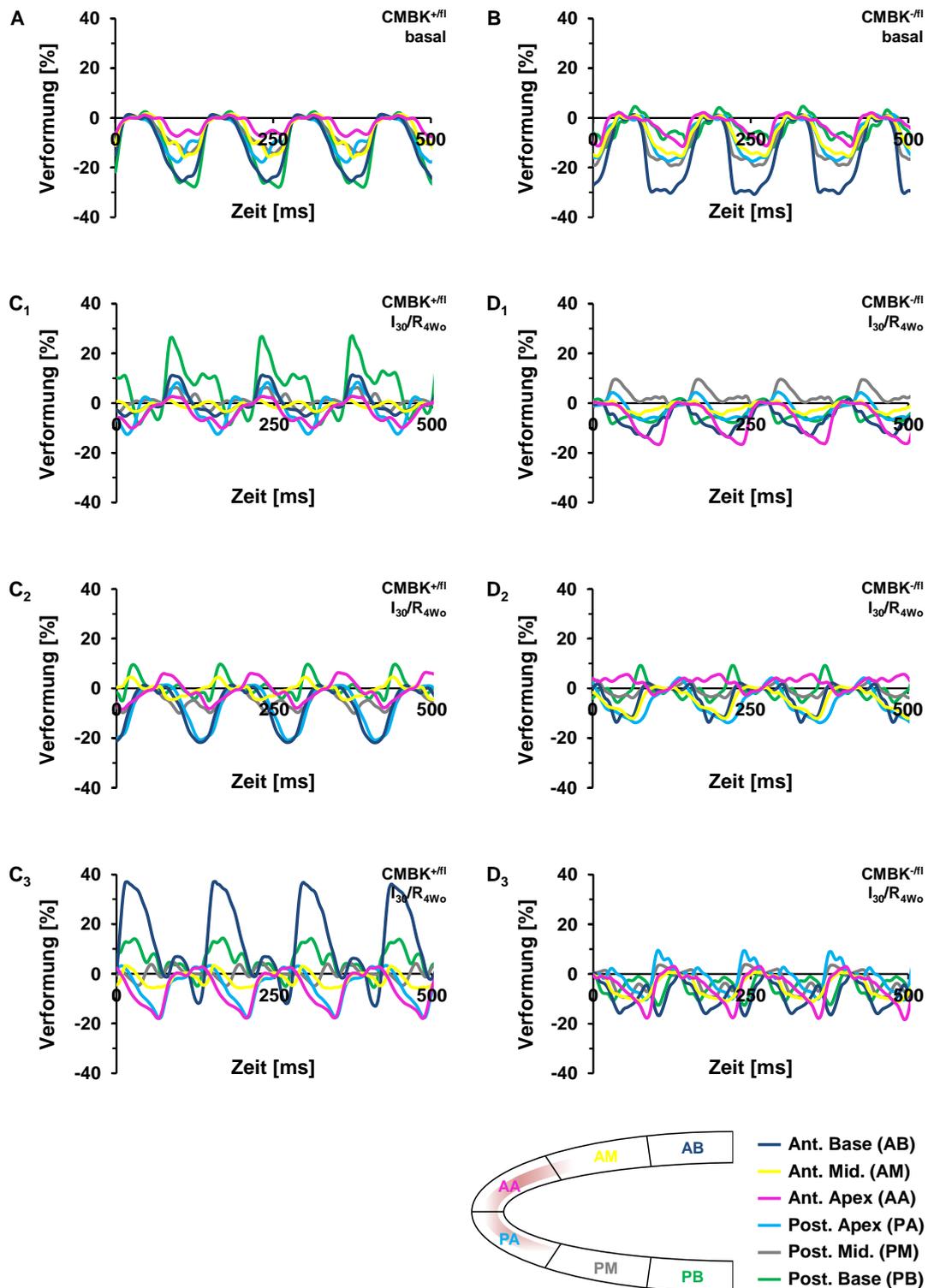


Abbildung 64: Segmentanalyse der longitudinalen Verformung des Endokards

Die Zusammenfassung von jeweils 8 benachbarten Originalspuren zu einem Segment zeigte synchrone Kurvenverläufe der basalen CMBK-Kontrollherzen (CMBK^{+fl}) (A) und leicht veränderte Verformungen der Segmente in den mitoBK-Mutanten (CMBK^{-fl}) (B). Die Muster zeigten charakteristische Veränderungen nach Durchführung des chronischen Myokardinfarktmodells in den CMBK-CTR (C₁₋₃) und den CMBK-KO (D₁₋₃). Echokardiographische Messungen erfolgten in der Längsachse, Auswertung mit „Vevo Strain 2100“. AA: Ant. Apex (pink); AB: Ant. Base (dunkelblau); AM: Ant. Mid (gelb); PA: Post. Apex (hellblau); PB: Post. Base (grün); PM: Post. Mid (grau).

In dieser Darstellung wird die zeitliche Synchronizität der Linien unter physiologischen Bedingungen insbesondere in den Endokarden der CMBK-CTR nochmals verdeutlicht. Der Ant. Apex (pink) wies dabei unter physiologischen Bedingungen die geringste prozentuale Verformung sowohl in den CMBK-CTR (Abbildung 64A) als auch in den CMBK-KO (Abbildung 64B) auf. Die stärkste longitudinale Verformung während der Systole durchliefen in den Kontrolltieren die Basissegmente (Post. Base, grün und Ant. Base, dunkelblau). Die mittleren Segmente (Post. Mid, grau und Ant. Mid, gelb), sowie der post. Apex (hellblau) wiesen vergleichbare Verlaufsmuster auf. Ein ähnlich einheitliches Verformungsbild war in den Knockouttieren nicht gegeben.

Interessanterweise zeigte sich nach I_{30}/R_{4W_0} ein deutlich verändertes Verlaufsmuster, das eine Desynchronisation der Herzbewegung erkennen ließ. Abbildung 64C₁ bis C₃ zeigt charakteristische Verformungsmuster von drei repräsentativen CMBK-CTR. Die Verformung war in den CMBK-KO nochmals deutlich verschlechtert und die Verläufe der einzelnen Segmentlinien stellten sich völlig inhomogen dar (Abbildung 64D₁ bis D₃). Nach dem Myokardinfarkt reduzierte sich die Verformung der einzelnen Segmente oder wies sogar positive Werte auf, die auf eine lokale Dilatation während der Kontraktion in der Systole hindeuteten. Dies trat vereinzelt in beiden Genotypen auf und könnte möglicherweise eine passive Ausweichbewegung nekrotischer Bereiche zur Ursache haben. Dieses Phänomen war in keinem der beiden Genotypen unter physiologischen Bedingungen zu beobachten.

Die Segmentanalyse wurde zudem für die radiale Verformung und für die Verformung pro Zeit (Verformungsrate), sowie für die Geschwindigkeit allein, mit der sich das Herzgewebe bewegt, jeweils in longitudinaler und radialer Richtung durchgeführt. Repräsentative Abbildungen derselben Tiere sind im Anhang (Annex-Abbildung 9-13) aufgeführt.

Im nächsten Schritt erfolgte die Quantifizierung der maximalen Verformung bzw. der weiteren Parameter Verformungsrate und -geschwindigkeit. Es zeigte sich, dass die CMBK-KO bereits unter physiologischen Bedingungen eine reduzierte Verformbarkeit (Berechnung siehe Abbildung 29B) in bestimmten Segmenten des Herzens im Vergleich zu ihren Wurfgeschwisterkontrollen aufwiesen (Abbildung 65, schraffierte Balken). Besonders betroffen waren hier beide Basissegmente. Nach I_{30}/R_{4W_0} zeigte sich eine verschlechterte Bewegung der Herzmuskel in beiden Genotypen über alle Segmente hinweg, jedoch war die Reduktion in den CMBK-KO stärker ausgeprägt. Im Bereich des Post. Apex wurde hier fast das Signifikanzniveau ($p=0,05$) erreicht.

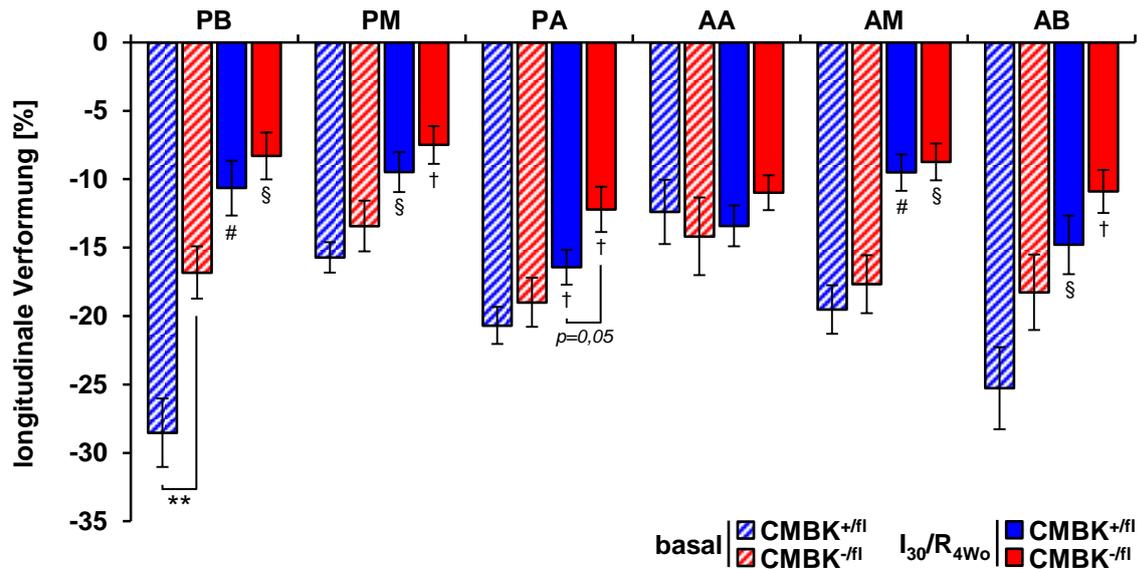


Abbildung 65: Beeinträchtigte longitudinale Verformung in CMBK-KO nach Myokardinfarkt

Die Quantifizierung der Spuren zeigte eine verschlechterte longitudinale Verformung nach I₃₀/R_{4wo}, insbesondere im Bereich des hinteren Apex (PA) und des vorderen Mittelsegments (AM), in beiden Genotypen auf. Dabei war die Verformbarkeit in CMBK-KO (CMBK^{-fl}) stärker beeinträchtigt als bei CMBK-CTR (CMBK^{+fl}). Die Verformung in der Enddiastole wurde gleich null gesetzt, so dass eine gute Kontraktion in der Systole zu negativeren Werten in der Verformung führte (siehe Abbildung 29). Echokardiographische Messungen erfolgten in der Längsachse, Auswertung mit „Vevo Strain 2100“. AA: Ant. Apex; AB: Ant. Base; PB: Post. Base; PM: Post. Mid. Balken zeigen Mittelwerte ± SEM; basal (schraffiert) je n=8; I₃₀/R_{4wo} (ausgefüllt) je n=13; **p<0,01 CMBK^{+fl} vs. CMBK^{-fl}; †: p<0,05; §: p<0,01; #: p<0,001 zu basal.

Im Mittel über die sechs Segmente zeigten die CMBK-KO bereits basal verglichen mit den CMBK-CTR eine Beeinträchtigung der longitudinalen Verformbarkeit (-20,35 ± 1,31 % für CMBK^{+fl}; -16,56 ± 1,20 % für CMBK^{-fl}, je n=8, Annex-Abbildung 15A). Die Durchführung des chronischen Myokardinfarktmodells äußerte sich in beiden Genotypen in einer weiteren, signifikanten Verschlechterung der Verformbarkeit (Abbildung 66A). Dieser Verformungsdefekt war in den CMBK-KO signifikant stärker ausgeprägt (-12,38 ± 0,97 % für CMBK^{+fl}; -9,77 ± 0,76 % für CMBK^{-fl}, je n=13; Abbildung 66A). Die Verformung in radialer Richtung spiegelte sich in vergleichbaren Tendenzen wider, allerdings waren die Unterschiede (im Vergleich zur longitudinalen Verformung) generell weniger deutlich ausgeprägt (basal: +29,81 ± 2,20 % für CMBK^{+fl}; +27,46 ± 1,39 % für CMBK^{-fl}, Annex-Abbildung 15B; I₃₀/R_{4wo}: +23,75 ± 1,20 % für CMBK^{+fl}; +21,51 ± 2,61 % für CMBK^{-fl}, Abbildung 66B).

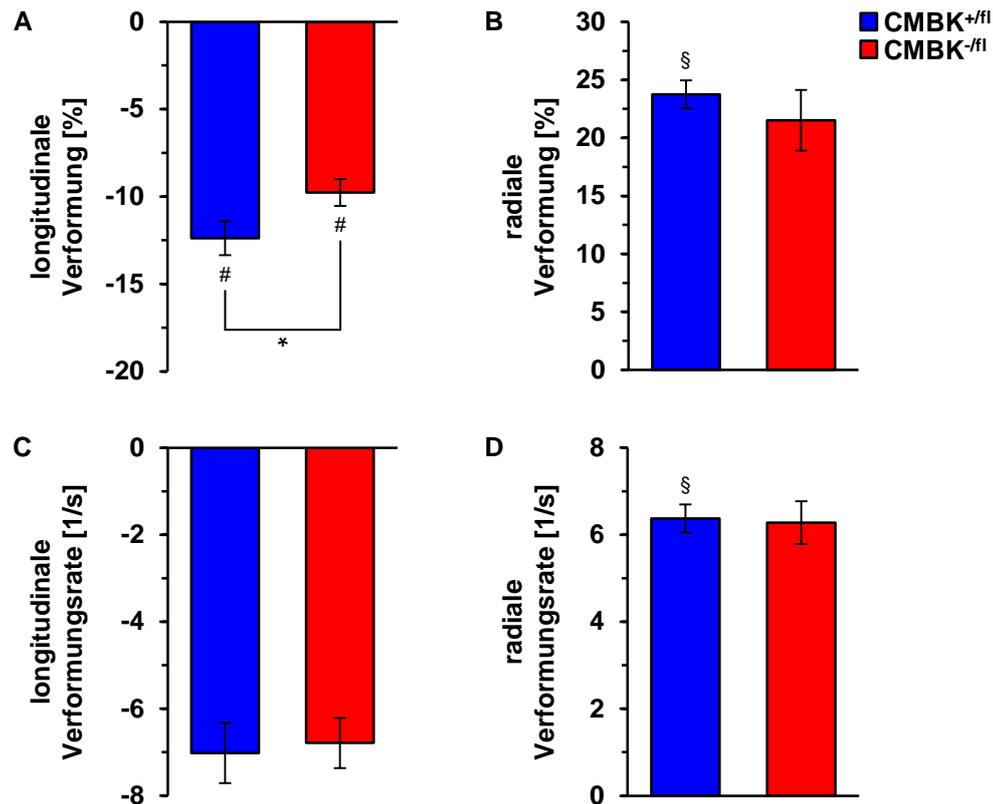


Abbildung 66: Durchschnittliche Verformung und Verformungsrate in CMBK-KO und -CTR im chronischen Myokardinfarktmodell

(A) Beeinträchtigte longitudinale Verformung in CMBK-KO (CMBK^{-/fl}) verglichen mit CMBK-CTR (CMBK^{+/fl}) nach I₃₀/R_{4Wo}. Die Verformung in der Enddiastole wurde gleich null gesetzt, so dass eine gute Kontraktion in der Systole zu negativeren Werten in der Verformung führte (siehe Abbildung 29). (B) Schwächer ausgeprägte Defizite in der radialen Verformung nach I₃₀/R_{4Wo} bzw. zwischen den Genotypen. Keine genotypspezifischen Unterschiede in der Verformungsrate (1/s) nach I₃₀/R_{4Wo} weder in longitudinaler (C) noch in radialer (D) Richtung. Balken zeigen Mittelwerte ± SEM, je n=13; *p<0,05 CMBK^{+/fl} vs. CMBK^{-/fl}; §: p<0,01, #: p<0,001 zu basal (Annex-Abbildung 15+17).

Die Verformungsrate (Verformung pro Zeit) zeigte sich in der Segmentanalyse nach I₃₀/R_{4Wo} in beiden Genotypen sowohl longitudinal als auch radial leicht beeinträchtigt (Annex-Abbildung 16). Die durchschnittlichen Verformungsraten nach I₃₀/R_{4Wo} in longitudinaler Richtung sind in Abbildung 66C (-7,02 ± 0,69 % für CMBK^{+/fl}; -6,79 ± 0,58 % für CMBK^{-/fl}) und in radialer Richtung in Abbildung 66D (+6,37 ± 0,32 % für CMBK^{+/fl}; +6,28 ± 0,49 % für CMBK^{-/fl}) dargestellt. Die entsprechenden Diagramme für die Verformungsraten in den CMBK-Tieren unter basalen Bedingungen sind im Anhang (Annex-Abbildung 16) gezeigt (longitudinal: -8,26 ± 0,98 % für CMBK^{+/fl}; -8,33 ± 1,56 % für CMBK^{-/fl}; radial: +7,51 ± 0,47 % für CMBK^{+/fl}; +6,68 ± 0,67 % für CMBK^{-/fl}). Im Einklang mit der Verformungsrate, konnte auch in der Segmentanalyse der Geschwindigkeit des Gewebes keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden (Annex-Abbildung 18+19).

3.14.4 Bestimmung des Fibrosierungsgrades

Die Fibrosierung des Herzgewebes ist ein weiterer wichtiger Parameter, der zusätzlichen Aufschluss über die strukturellen Auswirkungen eines Myokardinfarkts geben kann. Von den Herzen der im chronischen Modell operierten Tiere wurden nach der Durchführung der Echokardiographie Kryoschnitte über die Sektionen 1 bis 8 (Abbildung 42A) angefertigt und diese mit Sirius Rot (siehe Abschnitt 2.6.4) sowie mit Hämatoxylin/Eosin (siehe Abschnitt 2.6.5, *Daten nicht gezeigt*) angefärbt. Abbildung 67 zeigt repräsentative Herzschnitte vom Apex bis zur Ligatur von CMBK-CTR (A_1 - A_3) und -KO (B_1 - B_3) nach Sirius Rot-Färbung. Die gefärbten Herzscheiben aller weiteren CMBK-Tiere aus dem chronischen Modell sind im Anhang (Annex-Abbildung 21+22) dargestellt.

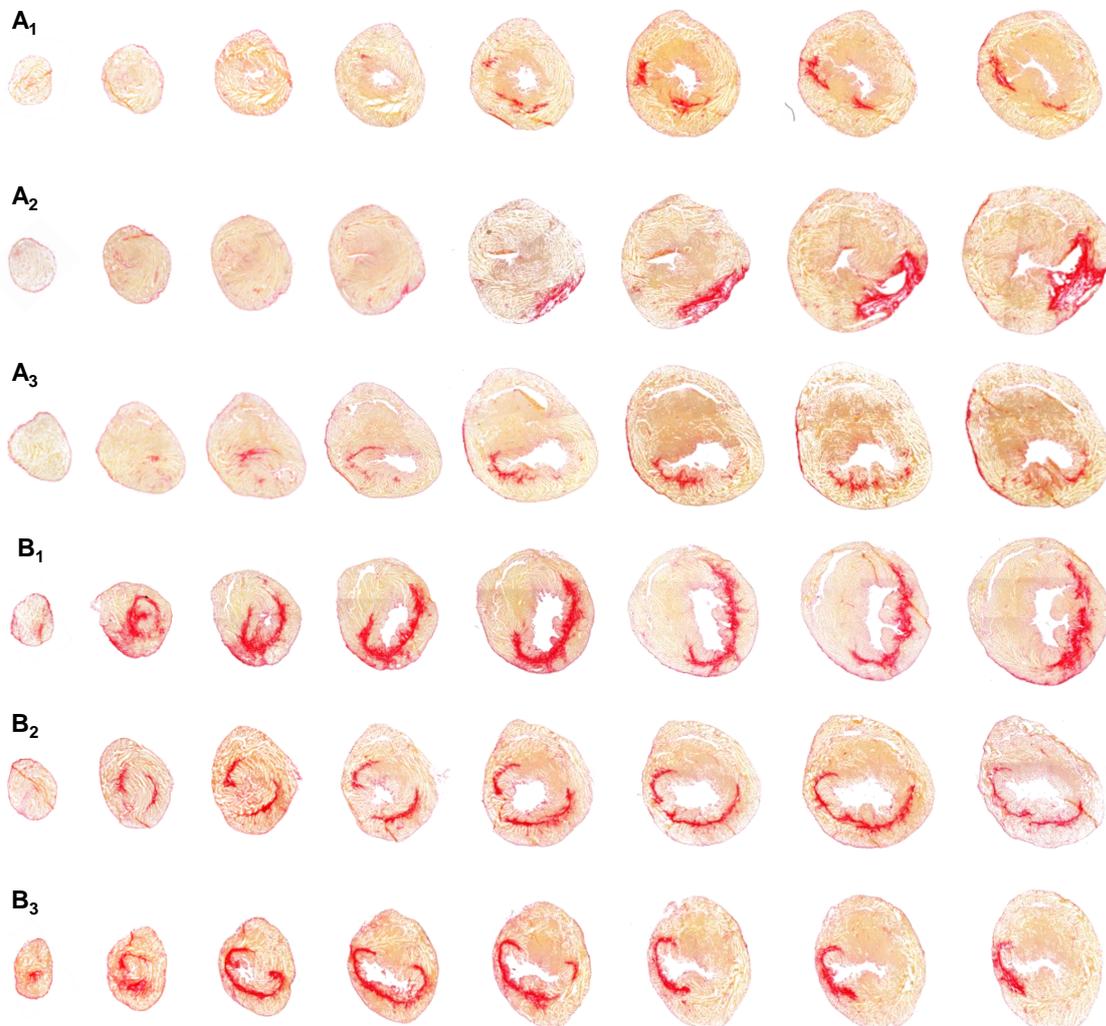


Abbildung 67: Fibrosefärbung der Herzen nach I₃₀/R_{4w0}

Repräsentative Herzscheiben nach Sirius Rot-Färbung zur Visualisierung von fibrotischem Gewebe. CMBK-Kontrollherzen (A_1 - A_3) zeigten weniger vernarbttes Bindegewebe (rot) als die CMBK-Knockoutherzen (B_1 - B_3) im chronischen Infarktmodell nach vierwöchiger Reperusionsphase.

Die Rotfärbung beschreibt das vernarbte, fibrotische Gewebe, welches aus nicht funktionellem Bindegewebe besteht. Es entsteht durch die Unterversorgung des Gewebes während der ischämischen Phase und durch die plötzliche Revaskularisierung zu Reperfusionbeginn. Die Quantifizierung des fibrotischen Anteils bezogen auf das Gesamtherzgewebe zeigt, dass die CMBK-KO signifikant mehr Fibrose gebildet hatten als ihre Wurfgeschwisterkontrollen nach I₃₀/R_{4wo} (15,63 ± 1,40 % für CMBK^{+fl}, n=12; 22,49 ± 1,89 % für CMBK^{-fl}, n=13; Abbildung 68). Dies war über alle Sektionen hinweg zu beobachten mit Ausnahme der Sektion 1 nahe des Apex, in welcher sich kein Unterschied in der Fibrose zwischen den Genotypen zeigte (Annex-Abbildung 20).

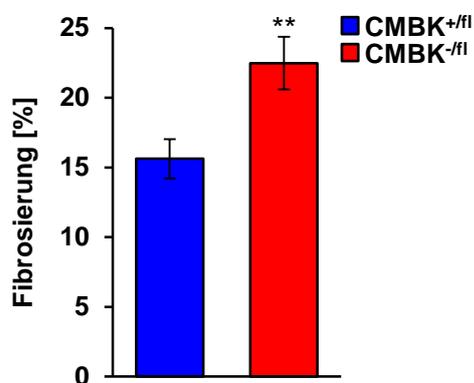


Abbildung 68: Signifikant erhöhte Ausbildung von fibrotischem Gewebe in CMBK-KO im chronischen Infarktmodell

Die Quantifizierung des fibrotischen Anteils (in % zum Gesamtgewebe) bestätigte den visuellen Eindruck. Herzen der CMBK-KO (CMBK^{-fl}) wiesen signifikant mehr Fibrose auf als die entsprechenden Kontrolltiere (CMBK^{+fl}) nach I₃₀/R_{4wo}. Balken zeigen Mittelwerte ± SEM mit n=12 für CMBK^{+fl} und n=13 für CMBK^{-fl}; **p<0,01 CMBK^{+fl} vs. CMBK^{-fl}.

3.15 Bedeutung der sGC in Kardiomyozyten für grundlegende kardiovaskuläre Funktionen sowie ihre Rolle bei I/R

3.15.1 Auswirkungen einer Deletion der sGC in CM auf den Blutdruck und I/R-Schaden nach akutem Myokardinfarkt

Die lösliche Guanylatzyklase (sGC) stellt ein Schlüsselenzym des NO/sGC/cGMP/PKG I-Signalweges im kardiovaskulären System dar (Boerrigter et al. 2009). Sowohl die Gabe von sGC-Aktivatoren als auch von -Stimulatoren schützen das Herz vor dem I/R-Schaden während eines akuten Myokardinfarkts *in vivo* (Salloum et al. 2012, Methner et al. 2013a, Methner et al. 2013b). Jedoch erlaubt die Verwendung der sGC-Modulatoren keine Rückschlüsse auf den Zelltyp, in welchem die beteiligte Guanylatzyklase lokalisiert ist. Einen wichtigen Anhaltspunkt, dass dieser Signalweg über kardiomyozytäre Enzyme vermittelt werden könnte, lieferte die Erkenntnis, dass kardioprotektive Effekte, welche durch eine pharmakologische cGMP-Erhöhung induziert wurden, von der in Kardiomyozyten lokalisierten PKG I abhängig waren (Methner et al. 2013b). Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun die Rolle der endogenen sGC im Kardiomyozyten untersucht.

Diese könnte in dem kardioprotektiven NO/cGMP/PKG I-Signalweg primär für die Generierung des cGMPs verantwortlich und somit direkt an einer Reduktion des kardialen I/R-Schadens beteiligt sein. Hierfür wurden Mäuse mit einer Kardiomyozyten-spezifischen Deletion der sGC β_1 -Untereinheit generiert (CMsGC-KO, CMsGC^{-fl}, siehe Abschnitt 2.2.2.5). Diese Tiere wurden von Herrn Prof. Dr. Andreas Friebe, Physiologisches Institut, Julius-Maximilians-Universität Würzburg gezüchtet und für die Induktion der Cre-Rekombinase mit Tamoxifen injiziert. Der Verlust der sGC β_1 -Untereinheit führt in diesem Modell zu einem kompletten Verlust der Guanylatzyklase im kardiomyozytären Gewebe (Friebe et al. 2007). Wie bereits unter Abschnitt 2.2.2.5 beschrieben, konnte 50 Tage nach dem Ende der Tamoxifeninjektionen von einer effizienten Deletion der CMsGC ausgegangen werden, weshalb die Tiere frühestens im Alter von 16 Wochen für Folgeversuche verwendet wurden.

Interessanterweise zeigte die telemetrische 48-Stunden-Blutdruckmessung in männlichen CMsGC-KO und ihren Wurfgeschwisterkontrollen bereits unter physiologischen Bedingungen eine signifikante Erhöhung des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP; 106,68 \pm 2,19 mmHg für CMsGC^{+fl}, n=4; 115,71 \pm 2,00 mmHg für CMsGC^{-fl}, n=6; Abbildung 69C). Dies äußerte sich sowohl in einer Erhöhung der systolischen (121,29 \pm 2,44 mmHg für CMsGC^{+fl}; 131,83 \pm 3,70 mmHg für CMsGC^{-fl}, $p < 0,07$; Abbildung 69A) als auch der diastolischen Werte (91,18 \pm 2,47 mmHg für CMsGC^{+fl}; 100,37 \pm 2,25 mmHg für CMsGC^{-fl}, $p < 0,05$; Abbildung 69B), was zur Folge hatte, dass der Pulsdruck mit 30,06 \pm 2,22 mmHg (CMsGC^{+fl}) zu 31,25 \pm 4,67 mmHg (CMsGC^{-fl}) keine genotypspezifischen Unterschiede zeigte (Abbildung 69E). Weder die Messung der Herzfrequenz (592 \pm 16 bpm für CMsGC^{+fl}; 573 \pm 15 bpm für CMsGC^{-fl}; Abbildung 69D) noch die Aktivität der Tiere (10,75 \pm 2,04 cpm für CMsGC^{+fl}; 9,58 \pm 1,23 cpm für CMsGC^{-fl}; Abbildung 69F) wiesen dabei signifikanten Unterschiede auf.

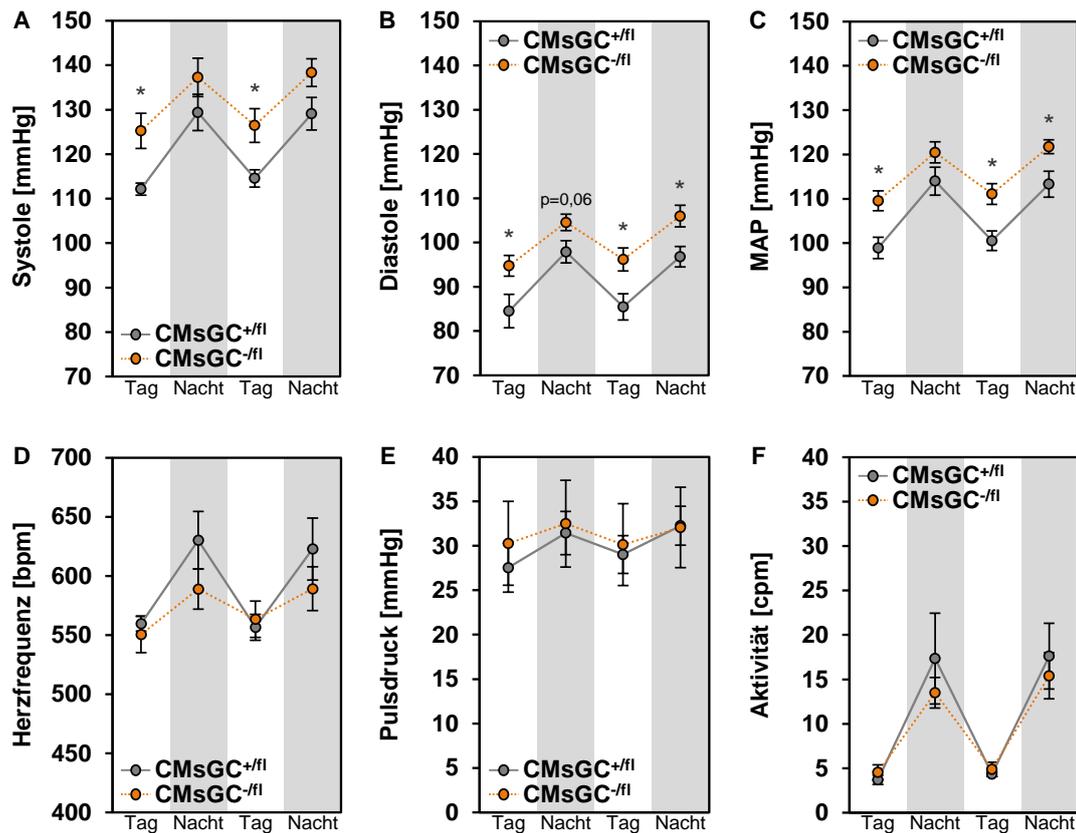


Abbildung 69: Telemetrische Blutdruckmessung in CMsGC-KO und -CTR

Die telemetrische Blutdruckmessung über 48 Stunden ergab einen Anstieg des systolischen (A) und des diastolischen Blutdrucks (B), was zu einem signifikant erhöhten mittleren arteriellen Druck (MAP) (C) in den CMsGC-KO (CMsGC^{-fl}) führte. Die Herzfrequenz (D), der Pulsdruck (E) und die Aktivität (F) waren in beiden Genotypen vergleichbar. Kreise zeigen Mittelwerte ± SEM mit n=4 für CMsGC^{+fl} und n=6 für CMsGC^{-fl}; *p<0,05 CMsGC^{+fl} vs. CMsGC^{-fl}.

Es wurden Tiere beider Geschlechter im Alter von 15 bis 27 Wochen verwendet um die Rolle der kardiomyozytären sGC für den I/R-Schaden zu untersuchen (*Anm.*: Das im Vergleich zu der CMBK-Mauslinie fortgeschrittene Alter der Tiere, sowie die etwas größeren Altersunterschiede ergaben sich aufgrund der Transportprozesse und Quarantänezeiten). Eine alters- bzw. geschlechtsspezifische Auswertung zeigte, dass diese Parameter keinen Einfluss auf die Infarktgrößen hatten (Vergleich von globalen BK-WT, CMBK-CTR und CMsGC-CTR nach akuter I/R; *Daten nicht gezeigt*). Für alle in Abschnitt 3.15 beschriebenen Untersuchungen im akuten Myokardinfarktmodell wurden jeweils n=5 CMsGC-CTR und n=8 CMsGC-KO, sowie für die Kontrollexperimente mit dem entsprechenden Lösungsmittel jeweils n=3 Tiere pro Genotyp verwendet.

Wie bereits in den vorherigen Kohorten konnte auch hier nach I/R ± *iPost* kein Unterschied in den Risikoarealen zwischen den Genotypen und Setups festgestellt werden (I/R: 56,39 ± 2,32 % für CMsGC^{+fl}; 62,33 ± 1,83 % für CMsGC^{-fl}; I/R + *iPost*: 55,67 ± 2,94 % für CMsGC^{+fl}; 59,94 ± 2,75 % für CMsGC^{-fl}; Abbildung 70A). Die vorangegangenen Versuche hatten gezeigt, dass der mitoBK das Ausmaß des Infarkts nach

I/R entscheidend beeinflusst (siehe Abschnitt 3.6.1). Eine CM-spezifische Deletion der sGC per se hatte zunächst keinen Einfluss auf die basalen Infarktgrößen nach 30-minütiger Ischämie, gefolgt von 120 min Reperfusion ($24,02 \pm 1,21$ % für CMsGC^{+fl}; $22,51 \pm 0,84$ % für CMsGC^{-fl}; Abbildung 70B, links). Eine essentielle Rolle der CMsGC für die kardioprotektive Signaltransduktion wird nach iPost der Herzen deutlich (Abbildung 70B+C, rechts). Durch die mechanische Konditionierung konnte die Infarktgröße in den CMBK-CTR um $50,7 \pm 5,3$ % auf $11,85 \pm 1,28$ % gesenkt werden. In den CMsGC-KO war hingegen keinerlei Ansprechen auf das iPost-Protokoll zu beobachten ($24,04 \pm 1,60$ %, Infarktgrößenänderung: $+6,8 \pm 4,3$ %).

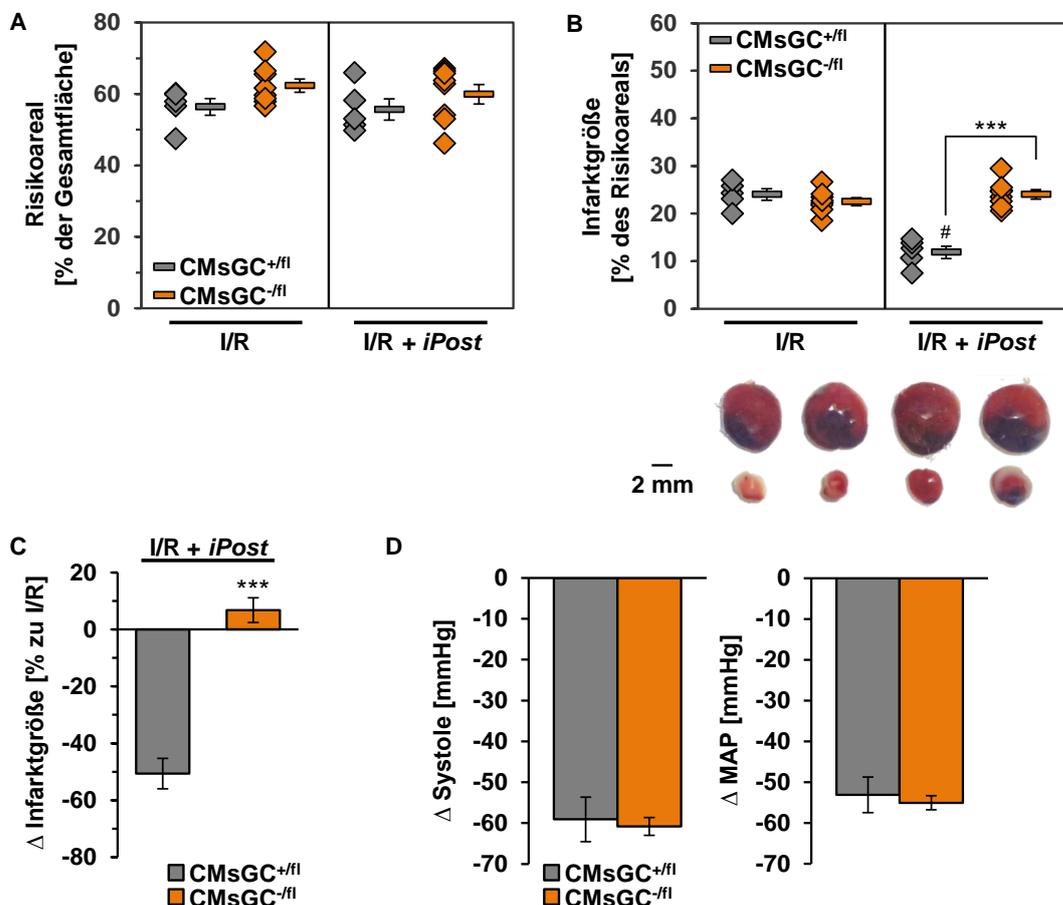


Abbildung 70: Einfluss einer CM-spezifischen Deletion der sGC auf die Infarktgröße

(A) Die Risikoareale (in % zur Gesamtherzfläche) zeigten keine Unterschiede zwischen den Genotypen und Setups. (B) Die Infarktgröße (in % zum Risikoareal) war nach 30 min Ischämie, gefolgt von 120 min Reperfusion (I/R) vergleichbar zwischen den CMsGC-KO (CMsGC^{-fl}) und den CMsGC-CTR (CMsGC^{+fl}, links). Eine Kardioprotektion durch Postkonditionierung (iPost) war hingegen nur in den CMsGC-Kontrolltieren möglich (rechts). Repräsentative Herzscheiben sind unterhalb des jeweiligen Genotyps und Setups dargestellt (blau: unbetreffenes Gewebe, rot+weiß: Risikoareal, weiß: infarziertes Gewebe); je n=5 für CMsGC^{+fl} und je n=8 für CMsGC^{-fl}. (C) Prozentuale Änderung der Infarktgröße nach iPost (bezogen auf I/R (B)). (D) In beiden Genotypen war eine deutliche Reduktion des arteriellen Mitteldrucks (MAP) unter Anästhesie erkennbar (n=4 für CMsGC^{+fl} und n=5 für CMsGC^{-fl}). Rauten stellen einzelne Experimente dar, Balken repräsentieren Mittelwerte \pm SEM; ***p<0,001 CMsGC^{+fl} vs. CMsGC^{-fl}; #: p<0,001 zu I/R.

Unterschiede in der Hämodynamik zwischen den Genotypen durch die Gabe des Anästhetikums wurden durch die telemetrische Messung des Blutdrucks nach Pentobarbitalinjektion ausgeschlossen (Abbildung 70D, Durchführung siehe Abschnitt 2.5.7.2 und Abbildung 27B). Die Reduktion des systolischen Blutdrucks ($-59,08 \pm 5,46$ mmHg für $CMsGC^{+/fl}$; $n=4$; $-60,81 \pm 2,16$ mmHg für $CMsGC^{-/fl}$; $n=5$), sowie des MAPs ($-53,13 \pm 4,38$ mmHg für $CMsGC^{+/fl}$; $-55,06 \pm 1,71$ mmHg für $CMsGC^{-/fl}$) und der Herzfrequenz (-192 ± 23 bpm für $CMsGC^{+/fl}$; -190 ± 17 bpm für $CMsGC^{-/fl}$) waren wie bereits in den CMBK-Tieren in beiden Genotypen vergleichbar (siehe auch Abbildung 41C).

3.15.2 Einfluss des $CMsGC$ -KOs auf die kardioprotektiven Effekte der cGMP-modulierenden Substanzen Sildenafil, Tadalafil und Cinaciguat

In Abschnitt 3.9.2 konnte bereits eine mitoBK-abhängige Kardioprotektion durch Sildenafil und Tadalafil gezeigt werden. Da beide PDE-Inhibitoren eine deutliche Wirksamkeit zeigten, implizierten diese Daten, dass dieser Effekt über eine Hemmung der PDE5 entsteht. Um Hinweise zu erhalten, ob die Reduktion der Infarktgröße erstens von der kardiomyozytären sGC-abhängig ist und zweitens durch die Blockade der PDE5 in Kardiomyozyten oder in anderen Zelltypen wie beispielsweise Endothelzellen erfolgte, wurden die kardioprotektiven Effekte der PDE5-Inhibitoren in $CMsGC$ -KO überprüft (Durchführung siehe Abschnitt 2.5.3.7). Dabei konnten die Infarkt-reduzierenden Wirkungen von Sildenafil und Tadalafil in den Kontrolltieren erneut bestätigt werden ($9,50 \pm 0,77$ % für $I/R + SIL$; $9,89 \pm 0,68$ % für $I/R + TAD$; Abbildung 71A+B, links). Die $CMsGC$ -KO waren hingegen nicht sensitiv für die kardioprotektiven Stimuli ($23,26 \pm 0,52$ % für $I/R + SIL$; $20,76 \pm 0,83$ % für $I/R + TAD$; Abbildung 71A+B, links). Dies ist nochmals in einer alternativen Darstellung zur Reduktion der Infarktgrößen durch Sildenafil und Tadalafil im Vergleich zum basalen I/R -Schaden in Abbildung 71C verdeutlicht ($I/R + SIL$: $-60,4 \pm 3,2$ % für $CMsGC^{+/fl}$; $+3,3 \pm 2,3$ % für $CMsGC^{-/fl}$; $I/R + TAD$: $-58,8 \pm 2,8$ % für $CMsGC^{+/fl}$; $-7,8 \pm 3,7$ % für $CMsGC^{-/fl}$). Die Injektionen der Lösungsmittel (ctr^3 , ctr^A) übten, wie bereits in den CM-spezifischen BK-Tieren (Abbildung 49), keinen Einfluss auf die Infarktgrößen aus ($I/R + SIL$: $25,50 \pm 1,78$ % für $CMsGC^{+/fl}$; $25,33 \pm 1,9$ % für $CMsGC^{-/fl}$; $I/R + TAD$: $23,60 \pm 1,84$ % für $CMsGC^{+/fl}$; $22,25 \pm 1,40$ % für $CMsGC^{-/fl}$; Abbildung 71A+B, rechts).

Die vergleichbare Abnahme sowohl des systolischen ($-14,6 \pm 3,8$ % für $CMsGC^{+/fl}$, $n=4$; $-13,9 \pm 3,1$ % für $CMsGC^{-/fl}$, $n=6$) als auch des mittleren arteriellen Blutdrucks ($-11,3 \pm 4,0$ % für $CMsGC^{+/fl}$; $-9,9 \pm 3,4$ % für $CMsGC^{-/fl}$) nach Tadalafilinjektion über das

Zeitintervall einer Operation von 210 min (M2) im Vergleich zu den 48h-stündigen Basalwerten (M1) in beiden Genotypen, erlaubte den Ausschluss von hämodynamischen Einflüssen auf die intrazellulären cGMP-Level und damit auf das Infarktareal (Abbildung 71D, Durchführung siehe Abbildung 27A). Die Herzfrequenz blieb nach Tadalafilgabe mit einer Abweichung um ± 6 Schläge pro Minute in beiden Genotypen weitgehend unverändert (Daten nicht gezeigt).

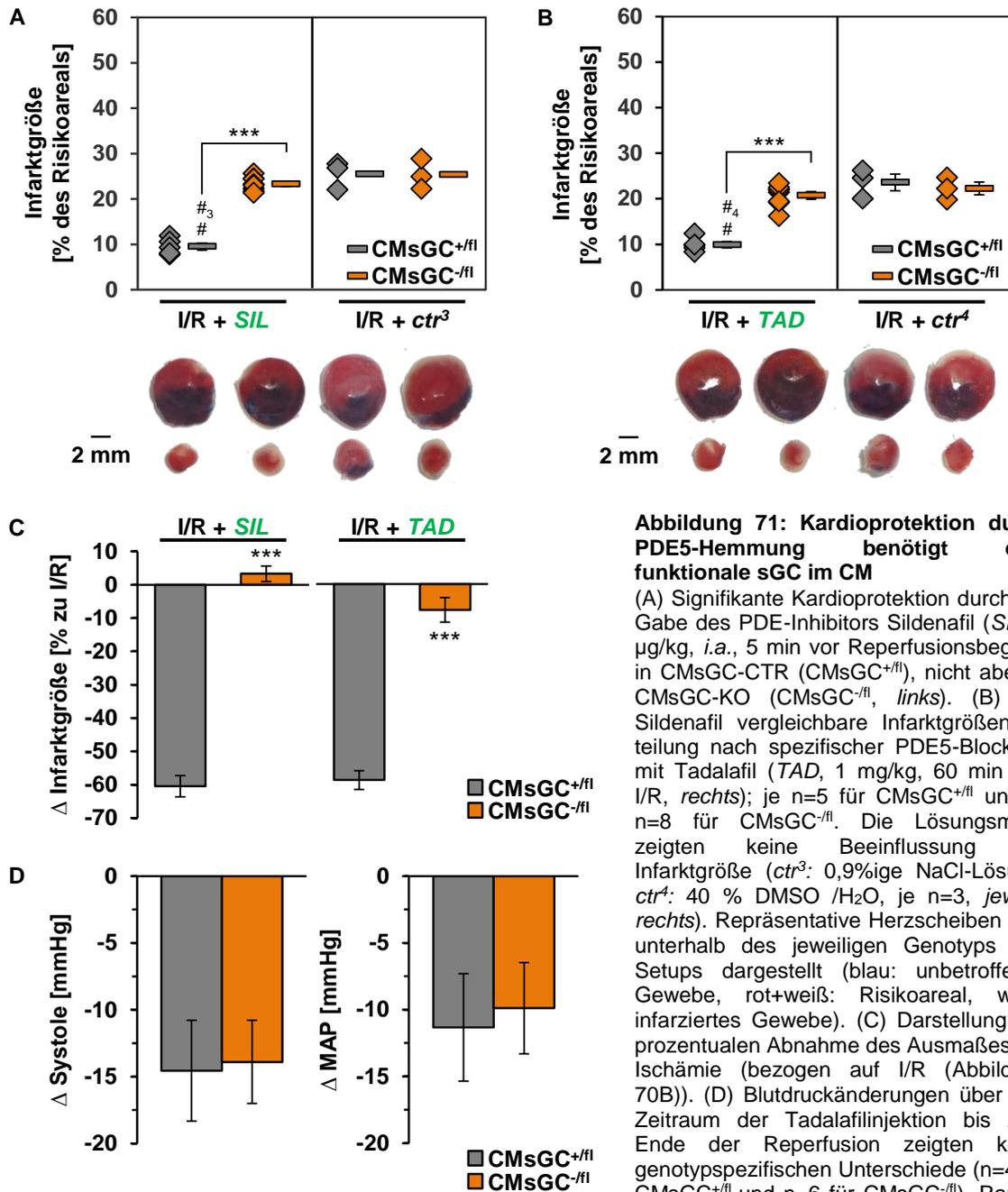


Abbildung 71: Kardioprotektion durch PDE5-Hemmung benötigt eine funktionale sGC im CM

(A) Signifikante Kardioprotektion durch die Gabe des PDE-Inhibitors Sildenafil (SIL, 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, *i.a.*, 5 min vor Reperfusionbeginn) in CMsGC-CTR (CMsGC^{+fl}), nicht aber in CMsGC-KO (CMsGC^{-fl}, links). (B) Mit Sildenafil vergleichbare Infarktgrößenverteilung nach spezifischer PDE5-Blockade mit Tadalafil (TAD, 1 mg/kg, 60 min von I/R, rechts); je n=5 für CMsGC^{+fl} und je n=8 für CMsGC^{-fl}. Die Lösungsmittel zeigten keine Beeinflussung der Infarktgröße (ctr³: 0,9%ige NaCl-Lösung, ctr⁴: 40 % DMSO /H₂O, je n=3, jeweils rechts). Repräsentative Herzscheiben sind unterhalb des jeweiligen Genotyps und Setups dargestellt (blau: unbetreffenes Gewebe, rot+weiß: Risikoareal, weiß: infarziertes Gewebe). (C) Darstellung der prozentualen Abnahme des Ausmaßes der Ischämie (bezogen auf I/R (Abbildung 70B)). (D) Blutdruckänderungen über den Zeitraum der Tadalafilinjektion bis zum Ende der Reperfusion zeigten keine genotypspezifischen Unterschiede (n=4 für CMsGC^{+fl} und n=6 für CMsGC^{-fl}). Rauten stellen einzelne Experimente dar, Balken repräsentieren Mittelwerte \pm SEM; ***p<0,001 CMsGC^{+fl} vs. CMsGC^{-fl}; #: p<0,001 zu I/R und #_{3/4}: p<0,001 zu I/R + ctr^{3/4}.

Im nächsten Schritt wurde der Fokus auf die endogene cGMP-Generierung *upstream* der cGMP/PKG I-Signalkaskade gelegt. Eine Inhibition der NO-Synthese mit L-NAME in Tieren der CMBK-Mauslinie hatte bereits hypertone Effekte, jedoch keinen Einfluss auf den I/R-Schaden per se gezeigt (siehe Abschnitt 3.10). Auch in den CMsGC-KO und -CTR zeigte sich eine Erhöhung des systolischen ($+17,8 \pm 3,9$ mmHg für CMsGC^{+fl}, n=4 und $+11,7 \pm 1,2$ mmHg für CMsGC^{-fl}, n=6; Abbildung 72A) und des diastolischen Blutdrucks ($+13,7 \pm 5,2$ mmHg für CMsGC^{+fl}; $+10,3 \pm 1,4$ mmHg für CMsGC^{-fl}; Abbildung 72C) und damit zusammenhängend ein Anstieg im mittleren arteriellen Blutdruck (MAP: $+14,4 \pm 4,4$ mmHg für CMsGC^{+fl}; $+9,7 \pm 1,1$ mmHg für CMsGC^{-fl}; Abbildung 72B) nach dreitägiger Behandlung mit L-NAME (Durchführung siehe Abschnitt 2.5.7.2). Die auftretende Hypertonie wurde von einem charakteristischen Absinken der Herzfrequenz begleitet (-102 ± 19 bpm für CMsGC^{+fl}; -77 ± 11 bpm für CMsGC^{-fl}; Abbildung 72D). Der erhöhte Blutdruck in den CMsGC-Mutanten war auch mit L-NAME noch detektierbar, allerdings weniger ausgeprägt als unter physiologischen Bedingungen. Die Unterschiede in der Aktivität der Tiere während der L-NAME-Behandlung waren nur marginal (*Daten nicht gezeigt*).

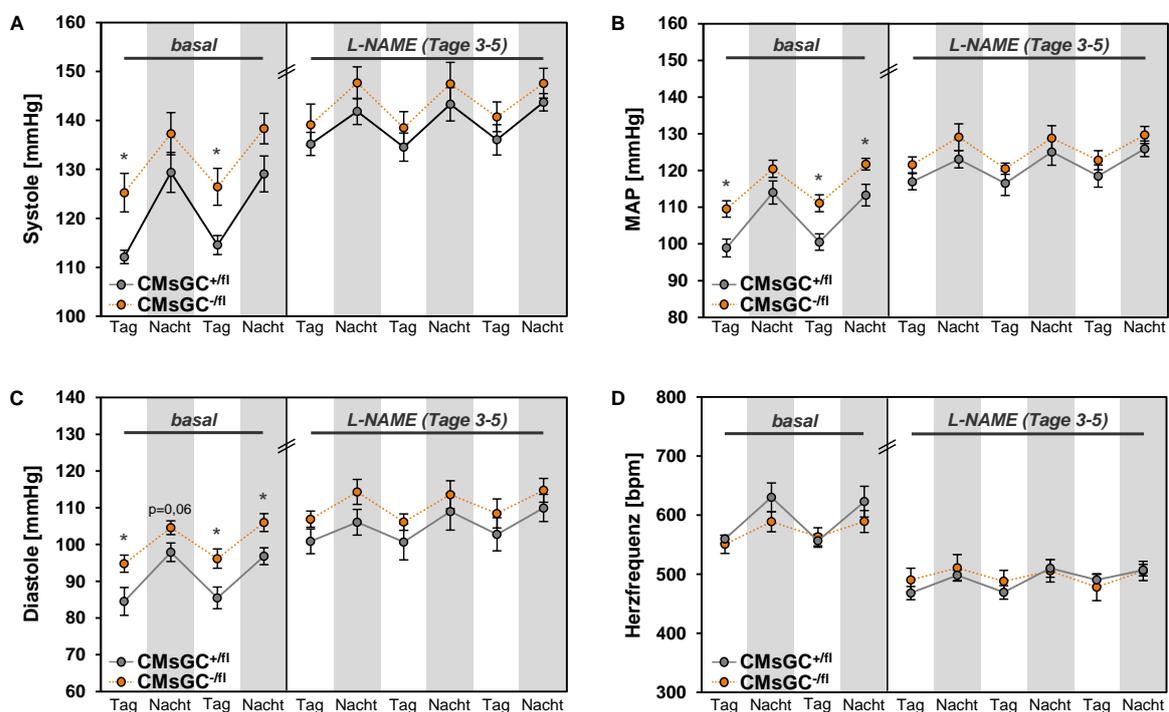


Abbildung 72: Hämodynamische Effekte von L-NAME in CMsGC-Mutanten

Die Verabreichung des NO-Synthaseinhibitors L-NAME (N_w-Nitro-L-Arginin-Methylester-Hydrochlorid, 5 mg/ml Trinkwasser) zeigte ab dem dritten Tag einen Anstieg des systolischen Blutdrucks (A), des mittleren arteriellen Drucks (MAP) (B) und des diastolischen Wertes (C) sowohl in den CMsGC-KO (CMsGC^{-fl}) als auch in den CMsGC-CTR (CMsGC^{+fl}). Dies war begleitet von einer deutlichen Abnahme der Herzfrequenz (D). Kreise zeigen Mittelwerte \pm SEM mit n=4 für CMsGC^{+fl} und n=5 für CMsGC^{-fl}; *p<0,05 CMsGC^{+fl} vs. CMsGC^{-fl}.

Die Untersuchung wie sich eine Inhibition der NO-Synthase auf den I/R-Schaden auswirkt ergab, dass eine Hemmung der NO-Bildung keinen Einfluss auf das Ausmaß der Ischämie ausübt. CMsGC-KO und ihre Wurfgeschwisterkontrollen präsentierten sich nach der L-NAME-Behandlung mit vergleichbaren Infarktgrößen wie nach alleinigem I/R-Stimulus ($21,53 \pm 1,39$ % für CMsGC^{+fl}; $22,30 \pm 1,88$ % für CMsGC^{-fl}; Abbildung 73A). Die Kardioprotektion durch eine Aktivierung der sGC mit Cinaciguat ($10 \mu\text{g}/\text{kg}$ KG, *i.p.*, 30 min vor I/R) war in den Tieren mit einer Kardiomyozyten-spezifischen Deletion der sGC nicht möglich ($24,41 \pm 1,39$ %; Infarktgrößenänderung: $+8,4 \pm 6,2$ %), wohingegen in den CMsGC-CTR eine signifikante Reduktion der Infarktgröße um $53,6 \pm 6,0$ % zu sehen war ($11,15 \pm 1,43$ %, Abbildung 73B+C).

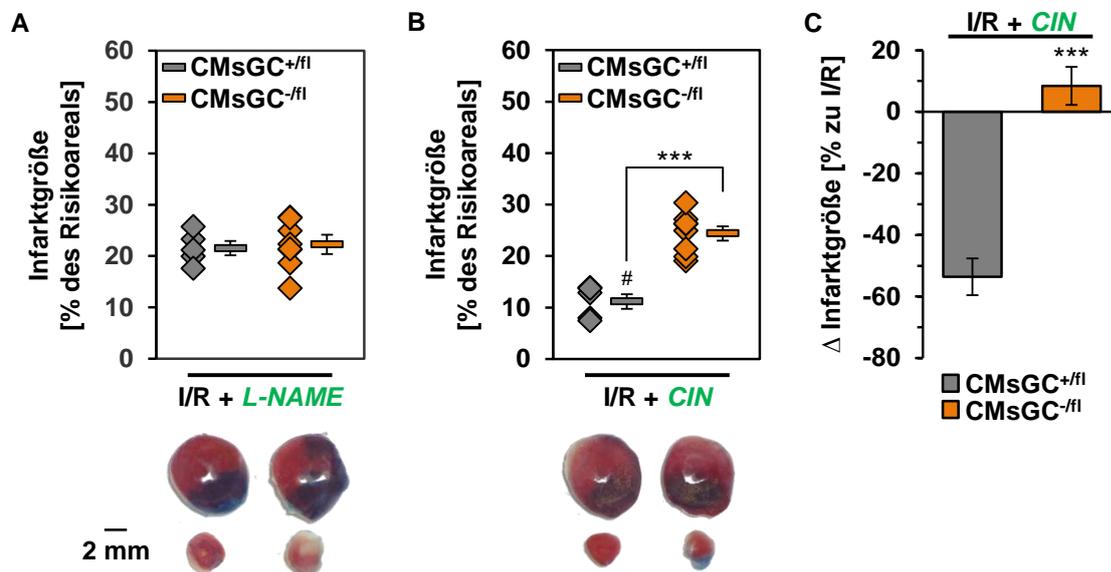


Abbildung 73: Einfluss einer Modulation der NO/sGC-abhängigen Signalkaskade auf den I/R-Schaden in sGC-KO und -CTR

(A) Die Blockade der NO-Synthase mit L-NAME (N_{ω} -Nitro-L-Arginin-Methylester-Hydrochlorid, 5 mg/ml Trinkwasser) zeigte keine Beeinflussung der Infarktgröße. (B) Eine Kardioprotektion mit dem sGC-Aktivator Cinaciguat (*CIN*, $10 \mu\text{g}/\text{kg}$, *i.p.*, 30 min vor I/R) war ausschließlich in den CMBK-CTR (CMsGC^{+fl}), nicht aber in den CMBK-KO (CMsGC^{-fl}) möglich. Repräsentative Herzscheiben sind unterhalb des jeweiligen Genotyps und Setups dargestellt (blau: unbetreffenes Gewebe, rot+weiß: Risikoareal, weiß: infarziertes Gewebe). (C) Darstellung der prozentualen Änderung der Infarktgröße (bezogen auf I/R (Abbildung 70B)) mit Cinaciguat. Rauten stellen einzelne Experimente dar, Balken repräsentieren Mittelwerte \pm SEM mit je $n=5$ für CMsGC^{+fl} und je $n=8$ für CMsGC^{-fl}; *** $p < 0,001$ CMsGC^{+fl} vs. CMsGC^{-fl}; #: $p < 0,001$ zu I/R.

Im Anhang sind sowohl die Risikoareale (Annex-Abbildung 3) als auch die Basalcharakteristiken (Annex-Tabelle 6) für die Untersuchung der Einflüsse der cGMP-modulierenden Substanzen auf den I/R-Schaden in den CMsGC-KO und -CTR dargestellt.

3.15.3 Aktivierung des BK-Kanals mit NS11021 in CMsGC-KO bei akutem I/R-Schaden

Dass eine Kardioprotektion durch die Aktivierung bzw. Stimulation der löslichen Guanylatzyklase mitoBK abhängig ist, konnte bereits in Abschnitt 3.9.3 gezeigt werden. Ob auch die Reduktion des I/R-Schadens durch eine pharmakologische Öffnung des BK-Kanals von der löslichen Guanylatzyklase beeinflusst wird, wurde nachfolgend untersucht. In Abbildung 74A sind die prozentualen Infarktgrößen bezogen auf die Größe des Risikoareals dargestellt. Es zeigte sich, dass sowohl CMsGC-Mutanten als auch ihre Wurfgeschwisterkontrollen durch Öffnung des BK-Kanals (5 min vor Beginn der Reperfusionphase) vor dem Ausmaß des I/R-Schadens geschützt sind ($11,14 \pm 2,08$ % für CMsGC^{+fl}; $13,02 \pm 1,39$ % für CMsGC^{-fl}). Dabei reduzierte sich die Infarktgröße verglichen mit I/R (Abbildung 70B) bei den CMsGC-CTR um $53,6 \pm 8,6$ % und bei den CMsGC-KO um $42,2 \pm 6,2$ % (Abbildung 74B). Diese Befunde implizieren, dass in den CMsGC-defizienten Tiere die kardioprotektiven Mechanismen *downstream* der NO/cGMP/PKG I-Signalkaskade weiterhin intakt sind und eine Öffnung der BK-Kanäle unabhängig von der Präsenz der kardiomyozytären sGC das Ausmaß des I/R-Schadens reduzieren kann.

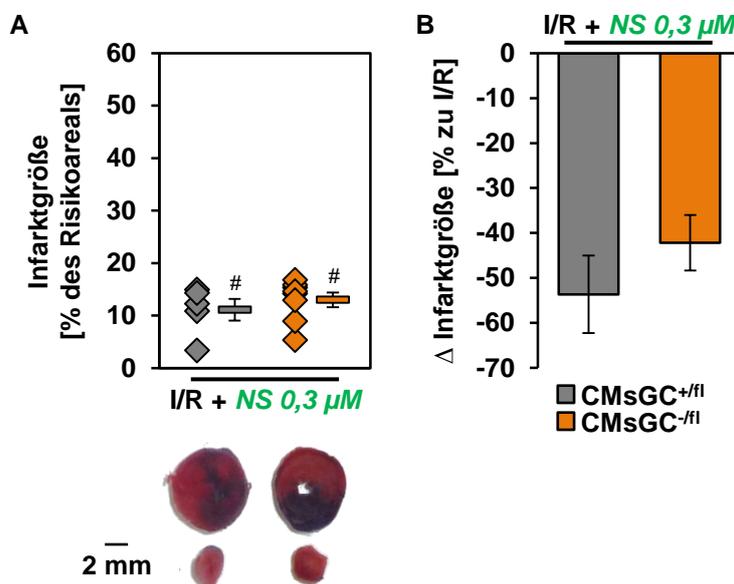


Abbildung 74: Kardioprotektion durch BK-Kanalöffnung in CMsGC-KO und -CTR

(A) Die intraatriale Injektion von 0,3 µM NS11021 führte sowohl in CMsGC-KO (CMsGC^{-fl}) als auch in CMsGC-CTR (CMsGC^{+fl}) zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße. Repräsentative Herzscheiben sind unterhalb des jeweiligen Genotyps und Setups dargestellt (blau: unbetreffenes Gewebe, rot+ weiß: Risikoareal, weiß: infarziertes Gewebe). (B) Darstellung der prozentualen Änderung der Infarktgröße (bezogen auf I/R (Abbildung 70B)) mit NS11021. Rauten zeigen einzelne Experimente, Balken repräsentieren Mittelwerte ± SEM mit n=5 für CMsGC^{+fl} und n=8 für CMsGC^{-fl}; #: p<0,001 zu I/R.

Die Risikoareale und Basalcharakteristiken der beiden Genotypen sind im Anhang (Annex-Abbildung 3, Annex-Tabelle 6) zu finden.

4. Diskussion

Ischämische Herzerkrankungen stehen seit Jahren auf Platz 1 der weltweiten Liste aller Todesfälle (Mozaffarian et al. 2015). Dabei führt insbesondere der Myokardinfarkt durch den Verschluss einer Koronararterie und der damit einhergehenden Unterversorgung des kardialen Gewebes, trotz immer besser werdenden Notfallsystemen und den flächendeckenden Möglichkeiten der Herzkatheter-Therapie, häufig zum Tod bzw. zu irreversiblen Beeinträchtigungen in der Herzfunktion. Die schnelle und vollständige Revaskularisierung der verschlossenen Koronararterie, die sog. Reperfusion, stellt bislang die beste Behandlungsstrategie dar, um die Prognose von Myokardinfarktpatienten zu verbessern. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass insbesondere zu Beginn der Reperfusion, wenn der Blutfluss und damit die Sauerstoffversorgung des betroffenen Gewebes plötzlich wieder hergestellt sind, ein massiver Gewebeuntergang auftritt (Abbildung 2, Garcia-Dorado and Piper 2006). Dabei ist der Reperfusionsschaden wahrscheinlich für bis zu 50 % des Gewebeuntergangs eines Myokardinfarkts verantwortlich (Hausenloy and Yellon 2013). Aus diesem Grund liegen Behandlungsstrategien, die eine Reduktion des I/R-Schadens bewirken, im Fokus der kardiovaskulären Forschung. Obwohl einige grundlegende Mechanismen der Signaltransduktion beim akuten Myokardinfarkt entschlüsselt werden konnten, ist es bislang noch nicht gelungen einen klinischen Therapieansatz zur Reduktion des I/R-Schadens abzuleiten.

4.1 Eignung des *in-vivo*-Myokardinfarktmodells für die durchgeführten Studien

Die Studien in dieser Arbeit wurden als *in-vivo*-Studien im akuten bzw. chronischen Myokardinfarktmodell durchgeführt um die Effekte der globalen und gewebespezifischen Deletionen des BK-Kanals und der sGC in Kardiomyozyten zu untersuchen. Der bedeutende Vorteil des verwendeten *in-situ*-Modells ist, dass das Herz in seinem physiologischen Umfeld betrachtet wird und somit weitere Einflüsse wie beispielsweise der Hämodynamik oder der neuronalen Signaltransduktion mitberücksichtigt werden. Zudem ist in *in-situ*-I/R-Studien nach Wiedereröffnung der LCA beispielsweise die Zirkulation essentieller Substrate gewährleistet. Aminosäuren, Fettsäuren und andere Metabolite spielen vermutlich eine nicht zu vernachlässigende Rolle in der Pathogenese des I/R-Schadens (Backstrom et al. 2003, Rudolph et al. 2010) und insbesondere ihre

Dynamik ist in den Reperfusionslösungen von isolierten Langendorffsystemen nur schlecht abbildbar.

Im akuten Myokardinfarktmodell wurden als Dauer für die ischämische Periode 30 min und für die unmittelbar folgende Reperfusion 120 min gewählt. Die Reperfusion im chronischen Myokardinfarktmodell wurde auf vier Wochen festgesetzt. Diese Zeitintervalle wurden bereits mehrfach in der Literatur beschrieben (Eckle et al. 2006, Methner et al. 2013a, Methner et al. 2013b), wodurch eine Einordnung der Ergebnisse dieser Arbeit in den Gesamtkontext publizierter Befunde erst möglich wird. Als Kontrolltiere wurden, dem anerkannten wissenschaftlichen Standard entsprechend, Cre-Rekombinase transgene Wurfgeschwister verwendet. Hierdurch ließen sich letztlich die beobachteten Effekte eindeutig der Ausschaltung des Zielgens zuordnen. Dass sowohl der genetische Hintergrund als auch das Alter der Mäuse die Folgen des I/R-Schadens determinieren, ist spätestens seit einer umfangreichen Studie der Arbeitsgruppe um Roberto Bolli bekannt (Guo et al. 2012). Die Autoren verglichen über 1000 Mäuse im Infarktmodell anhand verschiedener Parameter, konnten aber weder in Tieren mit SV129- noch mit FVB/C57BL6-Hintergrund signifikante Unterschiede in der Infarktgröße nach 30 min Ischämie und 24 h Reperfusion hinsichtlich Geschlecht und Alter (zwischen 6 und 18 Wochen) feststellen. Auch im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl weibliche als auch männliche Tiere untersucht. Geschlechtsspezifische Unterschiede bezüglich des I/R-Schadens, der cTnI-Spiegel und der Proteinexpressionen waren dabei nicht zu beobachten (*Daten nicht gezeigt*) und können als Bestätigung der Befunde von Guo et al. gewertet werden. Dennoch wurde darauf geachtet, dass jede Kohorte beide Geschlechter enthielt. Das Alter zwischen den KO-Gruppen und ihren entsprechenden Kontrollkohorten war dabei nicht signifikant unterschiedlich (Annex-Tabelle 2-6). Aufgrund der Tatsache, dass nach der Tamoxifen-induzierten Aktivierung der Cre-Rekombinase bis zur vollständigen Ausschaltung der sGC eine Zeitspanne von 50 Tagen vergeht (Groneberg et al. 2010), erstreckte sich das Alter, in welchem diese Tiere der Operation unterzogen wurden, insgesamt über einen Zeitraum von 19 Wochen. Doch auch in dieser Zeitspanne konnten keine altersabhängigen Differenzen beobachtet werden.

Die vernachlässigbaren Unterschiede in den Risikoarealen zwischen den einzelnen Kohorten (Annex-Abbildung 1-3) und die Tatsache, dass Tiere, die einer Scheinoperation unterzogen wurden, keine Infarkte aufwiesen (Abbildung 32B+41B), unterstreichen die Qualität der anspruchsvollen Operationsmethode. Die klare Differenzierung der gefärbten Herzscheiben (blau für das vom Infarkt nicht betroffene Gewebe, rot für das betroffene, aber noch vitale Gewebe und weiß für den infarzierten Bereich) ermöglichte eine gute Auswertung der Areale. In den CMBK- und CMsGC-Tieren wurde zusätzlich der Einfluss der Gabe von Pentobarbital, welches als Anästhetikum für die Operation verwendet

wurde, auf den Blutdruck und die Herzfrequenz untersucht. Die drastische Reduktion des Blutdrucks und der Herzfrequenz (Abbildung 41C+70D) verdeutlichen die geringe therapeutische Breite des Barbiturats. Es zeigten sich jedoch keine genotypspezifischen Unterschiede. Pentobarbital kann damit, im Gegensatz zu den volatilen Inhalationsanästhetika vom Flurantyp, deren kardioprotektive Wirkung unter anderem über eine Aktivierung von BK-Kanälen vermittelt werden soll (Redel et al. 2008, Kinoshita et al. 2016), als geeignet für das Versuchsvorhaben angesehen werden.

Eine Untersuchung des intra-operativen Blutdrucks war aus mehreren Gründen technisch nicht realisierbar. Zum einen hätte dies eine schwere invasive Doppelbelastung für die Tiere bedeutet. Da sowohl eine invasive Okklusion der *Arteria carotis communis* und die Implantation des Telemetriekatheters (siehe Abschnitt 2.5.7.1) als auch 7 Tage später die Thoraxeröffnung und die Ligatur der LCA (siehe Abschnitt 2.5.3) hätten durchgeführt werden müssen. Zum anderen störten die für die LCA-Ligatur notwendigen, technischen Aufbauten (z.B. Heizplatte) die Signalqualität des Blutdrucktelemetriesystems. Um zukünftig Blutdruckverläufe während des akuten Myokardinfarktmodells studieren zu können, wäre daher die Benutzung der Tailcuff-Methode eine Option.

Zusammengefasst erwies sich die verwendete LCA-Ligaturtechnik als äußerst geeignete Methode um die Auswirkungen eines akuten Myokardinfarkts *in vivo* zu studieren und dabei das Herz in seinem gesamten physiologischen Umfeld zu betrachten.

4.2 Funktion des (mito)BK-Kanals für das kardiovaskuläre System ± I/R

4.2.1 Globale BK-Knockoutmäuse weisen nach akutem Myokardinfarkt einen signifikant erhöhten I/R-Schaden auf

Die Effekte, die bislang durch eine Aktivierung des BK-Kanals in I/R-Modellen *in vitro* und *ex vivo* gezeigt werden konnten, postulieren kardioprotektive Eigenschaften für den BK-Kanal. Dieser könnte demnach ein vielversprechendes therapeutisches Target zur Verringerung des I/R-Schadens darstellen. So wirken die BK-Kanalöffner NS1619 und NS11021, zum Zeitpunkt der Reperfusion appliziert, kardioprotektiv und dieser Schutzeffekt zeigte sich unabhängig von Änderungen in der K_{ATP} -Kanalaktivität oder Hämodynamik (Wang et al. 2004, Bentzen et al. 2009, Jin et al. 2012). Interessanterweise war nach globaler Ausschaltung des BK-Kanals im Langendorffmodell, d.h. in isolierten Mäuseherzen, kein I/R-Phänotyp zu beobachten (Singh et al. 2013, Wojtovich et al. 2013, Soltysinska et al. 2014). Erst nach pharmakologischer Aktivierung des BK-Kanals oder

nach präkonditionierendem Stimulus von zwei Zyklen mit je 5 min Ischämie und Reperfusion konnten diese Autoren BK-Kanal-abhängige Mechanismen der Kardioprotektion aufdecken. Im Gegensatz dazu war in den im Rahmen dieser Arbeit erstmalig durchgeführten *in-vivo*-Studien im akuten Myokardinfarktmodell bereits nach 30 min Ischämie, gefolgt von 120 min Reperfusion eine signifikant erhöhte Infarktgröße in den globalen BK-KO im Vergleich zu ihren Wurfgeschwisterkontrollen zu sehen (Abbildung 32B). Anstiege in den Serumspiegel von kardialem Troponin I, einem unabhängigen Marker für das Ausmaß des Myokardinfarkts, in den globalen BK-KO untermauern diese Befunde (Abbildung 32C). Diese Unterschiede sind vermutlich modellabhängig (siehe Abschnitt 4.1). In den Langendorffperfusionsstudien wurden Herzen isoliert von ihrer physiologischen Umgebung betrachtet, wohingegen das in der vorliegenden Arbeit verwendete *in-vivo*-Mausmodell den Myokardinfarkt in seiner gesamten Komplexität im Organismus betrachtet. Somit scheint der BK-Kanal per se für das zelluläre Überleben nach akutem Myokardinfarkt von Bedeutung zu sein. Um die These zu unterstützen, dass der BK-Kanal auch an den kardioprotektiven Signalkaskaden von Konditionierungsmechanismen beteiligt ist, wurde nachfolgend eine Postkonditionierung mit sechs Zyklen Kurzzeit-Ischämie und -Reperfusion (iPost) in den BK-Mutanten durchgeführt. Soltysinska et al. konnten in diesem Zusammenhang bereits *ex vivo* zeigen, dass infarktlimitierende Effekte der Präkonditionierung (iPre) BK-Kanal-abhängig sind. Dieser mechanistisch spannende Befund ist jedoch nur von geringer klinischer Relevanz, denn Patienten präsentieren sich für gewöhnlich erst in der ischämischen Phase des Myokardinfarkts. Die iPost stellt, sofern auf den Menschen übertragbar, zumindest eine potentiell geeignete Intervention zur Reduktion des I/R-Schadens dar. Ihre Anwendung führte in klinischen Studien jedoch bislang zu eher kontroversen Resultaten (siehe Abschnitt 1.5.2, (Staat et al. 2005, Laskey et al. 2008, Freixa et al. 2012, Hahn et al. 2013)). Eine Vielzahl an variablen Faktoren, die u.a. Komorbiditäten, Komedikationen und verschiedene technische Interventionen beinhaltet, könnten die sowohl positiven als auch negativen Studienergebnisse erklären. Insofern ist das hier verwendete Tiermodell natürlich als „optimierter Patient“ zu verstehen, da der Myokardinfarkt in einem gesunden Organismus induziert wird. Infarktpatienten haben häufig Vorerkrankungen, zu denen Hypertonie, arteriosklerotische Veränderungen und Diabetes Mellitus zählen, was die Auswirkungen von kardioprotektiven Interventionen und damit die Folgen eines Myokardinfarkts beeinflussen könnte. Ein weiterer wichtiger Punkt sind Anpassungen der kardioprotektiven Signalkaskaden, die mit ansteigendem Alter der Patienten wahrscheinlicher sind.

Die hier durchgeführten Postkonditionierungen unterstreichen im Tiermodell, dass der BK-Kanal eine Komponente der bei I/R ablaufenden Signalkaskaden ist und seine

Aktivität das Ausmaß des I/R-Schadens limitiert. So konnte in den globalen BK-Knockoutherzen nur eine geringfügige Protektion durch iPost beobachtet werden (Abbildung 33A). Die Effizienz der mechanischen Konditionierung generell wurde in den Tieren der Kontrollgruppe sichtbar. Wie in der Literatur beschrieben (Methner et al. 2013b) führte die iPost in diesen Mäusen zu einer deutlichen Reduktion der Infarktgröße.

Ausgehend von diesen spannenden Befunden stellte sich nun die Frage, in welchen Zellen und über welche Mechanismen der BK-Kanal den I/R-Schaden limitiert. Der glattmuskuläre, plasmamembranständige BK-Kanal und der mitoBK an der inneren Mitochondrienmembran von Kardiomyozyten sind naheliegende Kandidaten, da beide BK-Kanäle an wichtigen Funktionen des kardiovaskulären Systems beteiligt sind (Sausbier et al. 2005, Soltysinska et al. 2014, Balderas et al. 2015, Cordeiro et al. 2015a). *Ex-vivo*-Studien zur Bedeutung des BK-Kanals bei I/R wurden bislang nur an globalen BK-Mutanten (Soltysinska et al. 2014) bzw. durch eine pharmakologische Inhibition des Kanals ubiquitär im isolierten Herzen (Behmenburg et al. 2015) durchgeführt, wodurch die Zuordnung eines Effektes zu einer BK-Kanalexpression in einem bestimmten Zelltyp unmöglich war. Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals gewebespezifische BK-Kanalmutanten generiert, mit denen eine eindeutige Zuordnung des I/R-Phänotyps zur Funktion der glattmuskulären (SM) und/oder kardiomyozytären (CM) BK-Kanäle möglich sein sollte. Im akuten Myokardinfarktmodell zeigten sich für die SMBK-KO nach I/R jedoch keine veränderten Infarktgrößen. Auch das iPost-Protokoll war in den SMBK-KO nach wie vor effektiv und das Ausmaß der Kardioprotektion entsprach dem der Wurfgeschwisterkontrollen (Abbildung 35). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass dem glattmuskulären BK-Kanal keine Funktion zur Reduktion des I/R-Schadens beim akuten Myokardinfarkt zukommt. Folglich wurde der Fokus auf den mitoBK gelegt.

4.2.2 Die Deletion des mitoBKs in Kardiomyozyten führt bereits unter physiologischen Bedingungen zu kardiovaskulären Beeinträchtigungen

Die Charakterisierung der Kardiomyozyten-spezifischen BK-Mutanten (CMBK-KO) mithilfe von PCR-Analysen und der Verpaarung mit Reportertieren zeigte eine hochspezifische und effiziente Deletion des BK-Kanals in den Kardiomyozyten durch die α MHC-Cre-Rekombinase (Abbildung 36+37). Damit eigneten sich diese genetisch veränderten Mäuse hervorragend um den Einfluss des mitoBKs auf den I/R-Schaden *in vivo* zu untersuchen. Weder die Männchen noch die Weibchen zeigten klinisch auffällige

Phänotypen und die CMBK-KO und -CTR-Mäuse unterschieden sich nicht in ihren Körper- und Herzgewichten (Tabelle 6, Annex-Tabelle 7). Insbesondere die zahlreichen Defizite der globalen BK-Knockouttiere, die beispielsweise durch ein verringertes Körpergewicht, einen Tremor und eine eingeschränkte motorische Koordination auffallen (Sausbier et al. 2004), waren nach spezifischer Ausschaltung des mitoBKs in den Kardiomyozyten klinisch nicht apparent. Auch im Alter (>45 Wochen) zeigten sich keine Unterschiede in den Herzgewichten der mitoBK-Mutanten und ihrer Wurfgeschwisterkontrollen (Annex-Tabelle 8), was gegen die Entwicklung einer altersbedingten Herzhypertrophie nach Kardiomyozyten-spezifischer Deletion des BK-Kanals spricht.

Der BK-Kanal spielt im kardiovaskulären System nicht nur in den pathologischen Mechanismen eines Myokardinfarkts eine wichtige Rolle, sondern ist auch unter physiologischen Bedingungen unter anderem für die Regulation des Blutdrucks verantwortlich (Sausbier et al. 2005). Die Untersuchung der CMBK-KO zeigte, dass auch der mitoBK eine Komponente der Blutdruckregulation darstellt. Die deutlich erniedrigten Blutdruckwerte in den CMBK-KO bei unveränderter physiologischer Aktivität und einer leicht reduzierten Herzfrequenz (Abbildung 38) stehen jedoch im Gegensatz zu dem Hypertonus, der in globalen BK-KO beobachtet wurde (Sausbier et al. 2005). Diese Befunde legen die Vermutung nahe, dass in den globalen BK-KO der blutdrucksenkende Effekt der mitoBK-Deletion durch glattmuskuläre, renale, humorale und/oder neuronale Einflüsse weiterer BK-Kanäle maskiert wird. Beispielsweise beschrieben Sausbier et al. hier 2005 zum einen den auftretenden Hyperaldosteronismus, der vermutlich durch die Deletion von BK-Kanälen in der Zona glomerulosa der Nebenniere bedingt wird (Sausbier et al. 2005). Dort scheint der BK-Kanal einen Einfluss auf die Aldosteronproduktion und -freisetzung zu nehmen. Zum anderen zeigten sie, dass die Deletion des BK-Kanals insbesondere in kleineren Widerstandsgefäßen aufgrund der fehlenden BK-Kanal-abhängigen Hyperpolarisation zu einem gesteigerten Gefäßtonus führt. Hinzu kommt eine Beeinträchtigung der cGMP-abhängigen vasorelaxierenden Effekte im Glattmuskel (Sausbier et al. 2005).

Bemerkenswert ist, dass in den CMBK-KO sowohl der Blutdruck als auch die Herzfrequenz reduziert sind. Dies lässt auf eine intrinsische kardiale Dysfunktion schließen, da für gewöhnlich bei einem Absinken des arteriellen Blutdrucks über Barorezeptoren vermittelt eine Steigerung der Herzfrequenz erfolgt. Interessanterweise ist in der Literatur ein Zusammenhang zwischen der β 1-Untereinheit des BK-Kanals und dem Barorezeptorreflex, insbesondere dem parasympathischen Tonus, sowohl in Mäusen als auch in humanen SNPs (*single-nucleotide polymorphisms*) des Gens *Kcnmb1* beschrieben (Gollasch et al. 2002). Dieser Hinweis auf eine milde intrinsische kardiale

Dysfunktion, bei welcher die Hypotonie als eine Folge der Herzfehlfunktion zu verstehen ist (Reichert et al. 1992), wird durch die Befunde der Echokardiographie unterstützt. CMBK-Knockoutmäuse präsentierten sich hier mit einer reduzierten Auswurf- und Verkürzungsfraktion (Abbildung 39). Weitere Hinweise für eine beeinträchtigte Pumpfunktion der CMBK-KO lieferten die signifikant reduzierte Hinterwanddicke des linken Ventrikels und das vergrößerte linksventrikuläre Restvolumen während der Systole (Abbildung 40). Daran gekoppelt ist der Frank-Starling-Mechanismus, der den autonomen Regelkreis des Herzens und damit den Zusammenhang zwischen der Füllung und der Auswurfleistung des Herzens beschreibt. Eine verringerte ATP-Produktion im Herzen, eine gestörte Reizweiterleitung sowie Remodeling-Prozesse, die die Überlappung der kontraktilen Proteine Aktin und Myosin beeinflussen, könnten Ursachen für intrinsische kardiale Dysfunktionen darstellen. Die Gruppe um Andrea L. Meredith konnte 2014 die Präsenz von BK-Kanälen in Zellen des Sinusknoten nachweisen und zeigen, dass sowohl die genetische Ausschaltung als auch die pharmakologische Modulation des BK-Kanals zu einer Sinusbradykardie führt (Lai et al. 2014). Unabhängig von diesen Befunden war auf molekularer Ebene eine Reduktion der mitochondrialen Kapazität der oxidativen Phosphorylierung für Glutamat, dem Substrat des Komplex I, in isolierten kardialen Muskelfasern von globalen BK-Knockoutmäusen zu sehen (Soltysinska et al. 2014). Dies bedeutet, dass bereits unter normoxischen Bedingungen die Atmungskette in ihrer Funktion beeinträchtigt und damit die ATP-Generierung im Herzen in den globalen BK-KO gestört ist. Die ATP-Depletion kann in einer verringerten cAMP-Bildung und damit in einer reduzierten Öffnungswahrscheinlichkeit der HCN-Schrittmacherkanäle (*hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation channel*) im Sinusknoten resultieren (DiFrancesco and Mangoni 1994). Letztlich wird so die Generierung der Schrittmacheraktionspotentiale verlangsamt. Da der Sinusknoten aus hochspezialisierten Kardiomyozyten gebildet wird, besteht die Möglichkeit, dass der mitoBK trotz der geringen Anzahl an Mitochondrien in diesen Zellen eine wichtige Funktion in der Erregungsbildung übernimmt. Des Weiteren kann die mitoBK-Ablation negativ inotrope Effekte auslösen, da die beschriebene ATP-Depletion bei globaler BK-Kanaldeletion (Soltysinska et al. 2014) über eine verringerte cAMP-abhängige Aktivierung der Proteinkinase A zu einer reduzierten Öffnungswahrscheinlichkeit der Ryanodin-sensitiven Ca^{2+} -Kanäle im Arbeitsmyokard führen kann (Takasago et al. 1989). Eine Ausschaltung des BK-Kanals würde dementsprechend zu einer Reduktion der Herzfrequenz führen. Durch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studien zur Blutdruckerhöhung unter Inhibition der NOS mittels L-NAME kann zudem nicht ausgeschlossen werden, dass in den mitoBK-defizienten Tieren bereits unter physiologischen Bedingungen erhöhte NO-Spiegel vorliegen (für Details siehe Abschnitt 4.3.5). Erhöhte NO-Spiegel stellen im

Herzen den endogenen Gegenspieler der Katecholamin-vermittelten, β -adrenergen Stimulation dar und vermitteln cGMP/PKG I-abhängig negativ chronotrope und inotrope Effekte (Han et al. 1996, Massion et al. 2005). Die PKG I-Aktivierung führt dabei zur Membranhyperpolarisation, was eine Schließung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen verursacht, sowie zur Reduktion der Troponinsensitivität gegenüber Ca^{2+} (Massion and Balligand 2003, Rastaldo et al. 2007). Ein Ungleichgewicht aufgrund persistierend erhöhter NO-Spiegel in den mitoBK-Mausmutanten könnte zu einer reduzierten Herzfrequenz und myokardialen Kontraktilität sowie, insbesondere bei beeinträchtigtem Barorezeptorreflex (siehe oben), zu dem beobachteten Hypotonus führen.

4.2.3 Der mitoBK ist eine Komponente der kardioprotektiven Signalwege bei akutem Myokardinfarkt

Mit der Kardiomyozyten-spezifischen Ausschaltung des BK-Kanals konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Deletion des mitoBKs für die hohe Vulnerabilität der globalen BK-Knockouttiere gegenüber dem I/R-Schaden verantwortlich ist. Die beinahe identischen Infarktgrößen von globalen und Kardiomyozyten-spezifischen BK-Mutanten im akuten Myokardinfarktmodell bestätigen, dass der basale I/R-Schaden nur durch den mitoBK in den Kardiomyozyten bestimmt wird (siehe Abbildung 32B und 41B). Die erhöhten Troponinspiegel im Serum nach I/R korrelierten dabei sehr gut mit den Ergebnissen der Evans Blue/TTC-Färbung (Abbildung 41D). Bislang konnte die Bedeutung des mitoBKs für den I/R-Schaden nur durch entsprechende Studien an isolierten Kardiomyozyten bzw. kardialen Mitochondrien, die einer Hypoxie/Reoxygenierung ausgesetzt waren, vermutet werden (Sato et al. 2005, Soltysinska et al. 2014). Diese *in-vitro*-Studien stützen sich dabei auf die Befunde, dass der BK-Kanal in Kardiomyozyten exklusiv in der inneren Mitochondrienmembran exprimiert wird (siehe Abschnitt 1.7.1, (Xu et al. 2002, Singh et al. 2013, Soltysinska et al. 2014)). Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun erstmals *in vivo* gezeigt werden, dass die alleinige Deletion des kardiomyozytären mitoBKs die erhöhten I/R-Schäden bedingt. Der in Abschnitt 4.2.2 bereits diskutierte Blutdruckphänotyp der CMBK-KO kann die erhöhten Infarktgrößen nicht erklären, denn eine Reduktion des Blutdrucks führt zur besseren Durchblutung der Koronargefäße, was das kardiale Gewebe vor dem I/R-Schaden schützen sollte (Rochetaing and Kreher 2003). Des Weiteren präsentierten sich die globalen BK-KO mit einem identischen Ausmaß an I/R-Schaden (Abbildung 32B), jedoch mit einem Hypertonus unter physiologischen Bedingungen (Sausbier et al. 2005).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde stehen im klaren Widerspruch zur aktuellen Arbeit von Paul S. Brookes und seinen Mitarbeiter, die postulieren, dass nicht der mitoBK, sondern der BK-Kanal in intrinsischen kardialen Neuronen die Kardioprotektion triggert (Wojtovich et al. 2013). Wojtovich et al. zeigten in dieser Arbeit, dass Kardiomyozyten und Mitochondrien von globalen BK-Knockouttieren nach Administration der BK-Kanalöffner NS1619 und NS11021, vermutlich aufgrund BK-Kanal-unabhängiger Effekte, vor I/R-Schaden geschützt waren. Die NS-vermittelte Kardioprotektion in isolierten Langendorffherzen war hingegen sowohl vom BK-Kanal als auch von einer pharmakologischen Blockade der synaptischen Transmission durch Hexamethonium, einem Antagonisten am nikotinischen Acetylcholinrezeptor, abhängig (Wojtovich et al. 2013). Völlig unklar ist in diesem Zusammenhang wie die Protektion von den Neuronen auf die Kardiomyozyten übertragen wird. Im Widerspruch stehen auch die *in-vitro*- und Langendorffherzen-Befunde hinsichtlich der beobachteten BK-Kanal-unabhängigen Wirkungen von NS11021. Eine weitere Limitation dieser Studie stellt die isolierte Betrachtung von intrinsischen kardialen Neuronen ohne Berücksichtigung der zentralen afferenten und efferenten Nervenbahnen dar.

Die bisherigen Ergebnisse deuten auf einen kardioprotektiven Mechanismus der mitoBK-Kanäle, deren Lokalisation in der inneren Mitochondrienmembran mittlerweile weitgehend akzeptiert ist (Abbildung 8). Basierend auf den eigenen Erkenntnissen und Hinweisen aus der Literatur, lässt sich die mitoBK-abhängige Signaltransduktion bei I/R postulieren (Abbildung 75).

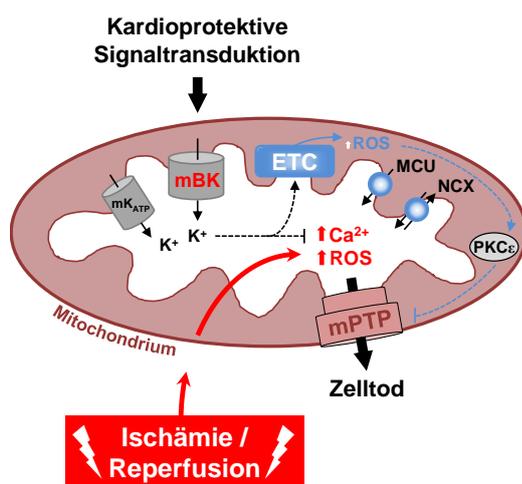


Abbildung 75: Schematische Darstellung der möglichen Signaltransduktion im Mitochondrium bei I/R

Ischämie und insbesondere der Beginn der Reperfusion führen zu einem massigen Anstieg an Ca^{2+} und ROS im Mitochondrium. Dies begünstigt die Öffnung der mPTP, was über verschiedene Mechanismen die Mitochondrien schädigt und letztlich zum Zelltod führt. Kardioprotektive Signalmechanismen führen zu einer Aktivierung des mitoBKs in der inneren Mitochondrienmembran. Der K^{+} -Einstrom verhindert zum einen durch Depolarisation der Membran die Ca^{2+} -Überladung und führt zum anderen zu einer Entkopplung der Atmungskette. Die unter diesen Bedingungen freigesetzten ROS-Mengen sind geringer und wahrscheinlich nicht zellschädigend. Vielmehr aktivieren sie die $\text{PKC}\epsilon$, wodurch letztlich die Öffnung der mPTP verhindert wird. ETC: Elektronentransportkette (Atmungskette); MCU: mitochondrialer Ca^{2+} -Uniporter; mBK: mitoBK; $m\text{K}_{\text{ATP}}$: mitochondrialer, ATP-abhängiger K^{+} -Kanal; mPTP: mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-pore; NCX: $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher; $\text{PKC}\epsilon$: Proteinkinase C epsilon; ROS: reaktive Sauerstoffspezies.

Während der Ischämie und insbesondere in den ersten Minuten der Reperfusion kommt es zu einer massiven Ca^{2+} -Überladung und ROS-Bildung in den kardialen Mitochondrien (Abbildung 1+3). Die erhöhten Ca^{2+} -Spiegel resultieren dabei primär aus einer Umkehrung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers (NCX, Abbildung 75), da unter Hypoxie der mitochondriale Ca^{2+} -Uniporter (MCU) vermutlich durch den Zusammenbruch des Membranpotentials inaktiviert wird (Suleiman et al. 2001). Die Deletion des MCUs bot in isolierten Mäuseherzen zudem keinen Schutz vor dem I/R-Schaden (Harrington and Murphy 2015). Ca^{2+} und ROS triggern vermutlich erst zu Beginn der Reperfusion die Öffnung der mPTP, die aufgrund des niedrigen pH-Wertes des Zytoplasmas während der ischämischen Phase geschlossen bleibt (Suleiman et al. 2001). Die Öffnung dieser unspezifischen Pore führt unter anderem zu einem Zusammenbruch des Membranpotentials, ATP-Verlust und der Freisetzung von Cytochrom C in das Zytoplasma der Herzmuskelzelle (siehe hierfür auch 1.3.2). Diese Stimuli resultieren in apoptotischen und nekrotischen Vorgängen, die zu irreversiblen Schädigungen und damit zum Zelltod führen.

Die physiologischen und pharmakologischen Eigenschaften des aus kardialen Mitochondrien isolierten mitoBKs sind vergleichbar mit denen der plasmamembranständigen BK-Kanälen (Xu et al. 2002, Ohya et al. 2005, Gu et al. 2007). Auch die Form muriner kardialer Mitochondrien zeigte sich nach einer Deletion des BK-Kanals unter dem Elektronenmikroskop unverändert (Soltysinska et al. 2014). Die Experimente an isolierten ventrikulären Kardiomyozyten von Meerschweinchen und Ratten lassen vermuten, dass eine Öffnung der kardiomyozytären BK-Kanäle durch kardioprotektive Stimuli der massiven Ca^{2+} -Überladung während der Hypoxie und Reoxygenierung entgegenwirkt und somit die Öffnung der mPTP in den Mitochondrien und den Zelltod minimieren kann (Sato et al. 2005, Kang et al. 2007). Dabei führt der K^+ -Einstrom in das Mitochondrium durch die Depolarisation der inneren Mitochondrienmembran zu einer Hemmung der Triebkraft für den Ca^{2+} -Einstrom. Außerdem verringert der K^+ -Einstrom das elektrische Potential, welches durch die Elektronentransportkette generiert wurde. Die hohen K^+ -Spiegel und das depolarisierte Membranpotential wirken auch dem Protoneninflux entgegen, was letztlich eine moderate Entkopplung der Atmungskette begünstigt (Stowe et al. 2006). Die hieraus entstehenden ROS könnten zu einer Aktivierung der $\text{PKC}\epsilon$ führen, welche ihrerseits eine Öffnung der mPTP verhindern kann (Costa and Garlid 2008).

In anderen Zelltypen wie beispielsweise einer humanen Glioblastomzelllinie und den Haarzellen der Cochlea wurde bereits ein Zusammenhang zwischen dem BK-Kanal und apoptotischen Vorgängen beobachtet (Ruttiger et al. 2004, McFerrin et al. 2012). Aus diesem Grund wurde das Ausmaß der Apoptose nach 30 min Ischämie und 120 min post-

ischämischer Reperfusion in den CMBK-Mutanten untersucht. Die Befunde bestätigen die Ergebnisse der kardialen Myokardinfarktschäden. In den CMBK-Knockouttieren war die Anzahl apoptotischer Zellen im Vergleich zu den Kontrollmäusen erhöht (Abbildung 42). Dabei korrelierte die Anzahl der apoptotischen Zellen mit dem Ausmaß der Infarktgröße in den Herzschnitten (Abbildung 43). Besonders in den Herzsektionen zwei bis fünf, in denen sich oftmals auch die größten Unterschiede in der Infarktgröße zwischen den Genotypen zeigten, waren die größten Differenzen im Ausmaß der Apoptose zwischen den CMBK-KO und -CTR zu beobachten. Der antiapoptotische Effekt des mitoBKs ist einerseits über eine Hemmung der mPTP (*siehe oben*) und andererseits über eine Stabilisierung der Integrität der IMM erklärbar (Douglas et al. 2006). Die Freisetzung von Cytochrom C als Folge des Zusammenbruchs des Membranpotentials und der mPTP-Öffnung löst den intrinsischen Apoptosesignalweg aus. Dieser ist durch die Bildung eines Apoptosoms, welches durch Aktivierung der Caspase-9 die proteolytische Aktivierung der Effektorcaspase-3 verursacht (Bayir and Kagan 2008), gekennzeichnet. Die Caspase-3 initiiert daraufhin die Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung. In Patch-Clamp-Experimenten wurde zudem von der Arbeitsgruppe um Detlef Siemen gezeigt, dass das antiapoptotische Bcl-xL-Protein, welches als integrales Membranprotein in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist (Nguyen et al. 1993), direkt mit der mPTP interagiert und diese hemmt (Cheng et al. 2011). Im Gegensatz hierzu aktiviert das proapoptotische Bax-Protein die Pore über eine Inhibition des mitoBKs (Cheng et al. 2008, Cheng et al. 2011). Im Einklang mit diesen Befunden steht der erstmals in der hier vorliegenden Arbeit gezeigte Zusammenhang zwischen der Deletion des mitoBKs und der erhöhten Apoptoserate von Kardiomyozyten nach I/R.

In der Vergangenheit wurde der K_{ATP} -Kanal (Abbildung 75), welcher in Kardiomyozyten ebenfalls in der inneren Mitochondrienmembran nachweisbar ist, für den K^+ -Einstrom und für den Schutz vor dem I/R-Schaden insbesondere bei entsprechendem Konditionierungsstimulus verantwortlich gemacht (Garlid et al. 1997, Liu et al. 1998, Akao et al. 2001, Costa and Garlid 2008). Mittlerweile sind diese Erkenntnisse umstritten. Im Gegensatz zum BK-Kanal ist der K_{ATP} -Kanal in den Kardiomyozyten auch im Sarkolemma ($sarck_{ATP}$) lokalisiert (Noma 1983, Trube and Hescheler 1984). Hier ist die Abundanz des K_{ATP} -Kanals gegenüber der mitochondrialen Lokalisation deutlich erhöht, weshalb die vermeintlich spezifische Modulation des $mitoK_{ATP}$ durch Diazoxid (Öffner) und 5-Hydroxydecanoat (Inhibitor) in den letzten Jahren bei I/R immer wieder kontrovers diskutiert wurde (Suzuki et al. 2002, Suzuki et al. 2003, Garlid and Halestrap 2012). Für Diazoxid ist sogar bereits eine direkte Interaktion mit der Succinatdehydrogenase der Atmungskette beschrieben worden, wodurch es ebenfalls zu dem

Entkopplungsmechanismus kommen kann, welcher mit einer moderaten ROS-Produktion und letztlich mit einer Hemmung der mPTP einhergeht (Hanley and Daut 2005). Die Untersuchung von Kir6.2-Knockoutmäusen zeigte keinen Einfluss der kardialen sarcK_{ATP}-Deletion auf die basalen Infarktgrößen nach I/R (Suzuki et al. 2002, Gumina et al. 2003). Um den tatsächlichen Einfluss des mitoK_{ATP}s auf den I/R-Schaden zu entschlüsseln, wären die Identifizierung seiner molekularen Struktur und die Generierung von spezifischen mitoK_{ATP}-Knockouttieren notwendig. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der mitoBK für die Vulnerabilität des Herzmuskels gegenüber I/R im akuten Myokardinfarkt verantwortlich ist und dass der K_{ATP}-Kanal, unabhängig von seiner Lokalisation in Kardiomyozyten, diese Vulnerabilität der mitoBK-defizienten Mäuse nicht kompensieren kann.

Der Signalweg der mechanischen Konditionierung bei I/R (Abbildung 4) involviert in der Triggerphase die mitochondrialen K⁺-Kanäle. Auch dieser Effekt wurde bislang hauptsächlich dem mitoK_{ATP}-Kanal zugeschrieben (Oldenburg et al. 2004, Qin et al. 2004, Ahmad et al. 2006, Costa et al. 2006). Anknüpfend an die Vorarbeiten in isolierten globalen BK-Knockoutherzen von Soltysinska et al. 2014 (siehe hierfür 4.2.1), konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit in CMBK-Tieren *in vivo* gezeigt werden, dass die Präkonditionierung (*iPre*) mit einer fünfminütigen ischämischen Phase, gefolgt von 10 min Reperfusion unmittelbar vor der I/R primär mitoBK-abhängig ist (Abbildung 44A). Dieser Befund unterstreicht die Bedeutung des kardiomyozytären mitoBKs für die fehlende Kardioprotektion nach *iPre* in den globalen BK-KO im nach Langendorff-perfundierten Mausmodell (Soltysinska et al. 2014). Interessanterweise ist die ischämische Präkonditionierung auch in kardialen sarcK_{ATP}-defizienten Mäusen, die über funktionelle vaskuläre sarcK_{ATP}- und mitoK_{ATP}-Kanäle verfügen, nicht möglich (Seharaseyon et al. 2000, Suzuki et al. 2002, Gumina et al. 2003). Die *iPre* stellt dabei einerseits ein wirksames Vorgehen zur Reduktion des I/R-Schadens im Tiermodell dar, weist aber andererseits wie bereits unter Abschnitt 4.2.1 erörtert nur geringe klinische Bedeutung auf. Aus diesem Grund wurde erneut zusätzlich die *iPost* in den CMBK-Tieren durchgeführt. Auch hier zeigte sich, dass der kardioprotektive Effekt der mechanischen Konditionierung in den CMBK-Mutanten signifikant abgeschwächt war (Abbildung 44A). Stellt man die Reduktion der Infarktgrößen der globalen und der CMBK-KO und ihrer Kontrollgruppen nach *iPost* direkt gegenüber (Abbildung 44B), so ist in den globalen BK-KO eine verbleibende Restprotektion der Intervention (ca. 10 %) verglichen mit der I/R-Bedingung ohne Konditionierung erkennbar. Naheliegend ist, dass dieser Effekt über K_{ATP}-Kanäle (sarcK_{ATP} und/oder mitoK_{ATP}) vermittelt wird. Dies könnte durch pharmakologische Hemmung des mitoK_{ATP}-Kanals mit 5-Hydroxydecanoat bzw. des sarcK_{ATP}-Kanals mit HMR-1098 (Fryer et al. 2000, Salloum et al. 2006, Wang et al. 2013)

zusätzlich zur iPost in den globalen BK-Mutanten bestätigt werden. Des Weiteren stellte sich die Infarktgrößenreduktion in den CMBK-KO ausgeprägter als in den Tieren mit einer globalen Deletion des BK-Kanals dar. Dies impliziert, dass neben der mitoBK-Fraktion weitere BK-Kanäle bei der iPost zumindest eine untergeordnete Rolle spielen könnten. Die globalen BK-Knockoutmäuse entwickeln beispielsweise eine Hypertonie und eine Aldosteronüberproduktion (Sausbier et al. 2005). Beide Parameter können unabhängig voneinander den I/R-Schaden und die Kardioprotektion durch iPost beeinflussen. So konnte bereits gezeigt werden, dass die Gabe von Aldosteron in Hunden einen negativen Einfluss auf die Auswirkungen einer Ischämie ausübt (Fujita et al. 2005). Unterstützend konnte die Arbeitsgruppe um Thomas Krieg nachweisen, dass die kardioprotektiven Effekte der Mineralkortikoidrezeptorantagonisten Canrenoat und Eplerenon, am Ende der ischämischen Phase appliziert, über die gleichen Signalwege zur Kardioprotektion führen wie die mechanische Konditionierung (Schmidt et al. 2010). In isolierten globalen BK-Knockoutherzen zeigte sich trotz einer Konditionierung während der Reperfusion keine Änderung der koronaren Flussrate, wohingegen die iPre in den Wildtypmäusen eine deutliche Verbesserung der Koronardurchblutung bewirkte (Soltysinska et al. 2014). An diesem Phänomen könnte der glattmuskuläre BK-Kanal beteiligt sein, dessen Deletion in den globalen BK-KO möglicherweise auch eine Dilatation der Koronargefäße verhindert und somit die Vulnerabilität dieser Tiere trotz konditionierendem Stimulus erhöht. Eine Untersuchung, ob die koronare Flussrate auch in mitoBK-defizienten Mäusen nach iPre verbessert ist, könnte diese Theorie bestätigen.

4.2.4 Die pharmakologische Modulation des BK-Kanals beeinflusst die Infarktgröße im I/R-Modell

Die Bedeutung des mitoBKs für die kardioprotektive Signaltransduktion im akuten Myokardinfarktmodell prädestiniert ihn als ein potentiellles Arzneimitteltarget zur Reduktion der I/R-Schäden.

Um die durch genetische Manipulation erhaltenen Ergebnisse nochmals pharmakologisch zu verifizieren, wurde den CMBK-Tieren der BK-Kanalblocker Paxilline verabreicht. Dabei wurde Paxilline (8 mg/kg) 25 min vor Beginn der Reperfusion appliziert, so dass von einem Anfluten des Wirkstoffes zum Zeitpunkt der LCA-Eröffnung ausgegangen werden konnte (siehe Abschnitt 2.5.3.7). Für diese Versuche wurde Paxilline verwendet, da es im Vergleich zu Iberiotoxin membranpermeabel ist, und somit auch intrazelluläre BK-Kanäle effektiv blockieren sollte. Generell ist natürlich zu bedenken, dass Paxilline kein mitoBK-selektiver Inhibitor ist, sondern potentiell ubiquitär BK-Kanäle im Organismus blockiert.

Zusätzlich wurde für Paxilline eine Hemmung von SERCA *in vitro* postuliert, die in den im Rahmen der I/R-Versuche eingesetzten Konzentrationen möglicherweise relevant ist (Bilmen et al. 2002). Paxilline hatte in den CMBK-KO jedoch keinen Einfluss auf den I/R-Schaden, was die Vermutung aufwirft, dass die Paxilline-vermittelte SERCA-Blockade sowie die pharmakologische Hemmung von kanonischen BK-Kanälen zumindest *in vivo* nur eine untergeordnete Rolle auf die basale I/R-Vulnerabilität spielt. Die Tatsache, dass die Gabe von Paxilline die Infarktgröße in den Kontrolltieren auf Knockoutniveau ansteigen lässt (Abbildung 45), bringt außerdem Klarheit in eine bislang sehr kontrovers geführte Diskussion. In der Literatur sind sowohl direkte negative Auswirkungen von Paxilline auf das Überleben von hypoxischen Kardiomyozyten als auch Paxillineeffekte, die erst durch eine fehlende Konditionierung bei Koapplikation mit Sildenafil im Langendorffmodell beobachtet werden konnten, beschrieben (Borchert et al. 2011, Behmenburg et al. 2015). Diese vorangegangenen Studien wurden jedoch an Kardiomyozyten bzw. isolierten Herzen durchgeführt und die *ex vivo* eingesetzten Konzentrationen von 1 μM (Behmenburg et al. 2015) bzw. 2 μM (Borchert et al. 2011) unterscheiden sich deutlich von den in dieser Arbeit sowie in der Literatur (Imlach et al. 2008, Lai et al. 2014) *in vivo* verwendeten Konzentrationen von ca. 300 μM (8 mg/kg, Umrechnung siehe Abschnitt 2.5.3.7). Ein Einfluss des DMSO-haltigen Lösungsmittels konnte durch geeignete Kontrollexperimente ausgeschlossen werden (Abbildung 45). Anhand der im Zuge dieser Dissertation gewonnenen Befunde kann somit postuliert werden, dass der mitoBK, im Gegensatz zum mitoK_{ATP}- bzw. sarcK_{ATP}-Kanal (Suzuki et al. 2002, Gumina et al. 2003, Wang et al. 2015), bereits bei I/R ohne konditionierenden Stimulus eine wichtige Rolle übernimmt.

Von größerem pharmakologischem Interesse ist natürlich die Öffnung des mitoBKs mit dem Ziel, die negativen Auswirkungen eines akuten Myokardinfarkts zu reduzieren. Hierfür wurde der zurzeit spezifischste BK-Kanalöffner NS11021, für den bereits einige positive *ex-vivo*-Studien vorliegen (Bentzen et al. 2009, Wojtovich et al. 2013), im akuten Myokardinfarktmodell erstmals *in vivo* getestet. Die selektive Aktivierung von mitochondrialen Ca²⁺-abhängigen Kaliumkanälen mit NS11021 moduliert sowohl die K⁺-Aufnahme in das Mitochondrium als auch dessen Volumen, wobei das Membranpotential aufrechterhalten wird (Aon et al. 2010). Diese Eigenschaften sind laut der Arbeitsgruppe um Brian O'Rourke vermutlich entscheidend für die kardioprotektiven Effekte von NS11021, in dessen Gegenwart die oxidative Phosphorylierung auch während der Regenerierung von metabolischem Stress aufrechterhalten bleibt (Aon et al. 2010). Da Informationen zur Pharmakokinetik von NS11021 sehr limitiert sind, wurde als Applikationsart zunächst die intravenöse Injektion gewählt. Diese stellte sicher, dass der Wirkstoff direkt im Blut verfügbar war. Die Applikation von NS11021 erfolgte fünf Minuten

vor dem Beginn der Reperfusion, so dass genug Zeit für eine Distribution des Wirkstoffes in das kardiale Gewebe, jedoch nur ein geringes Fenster für Metabolisierungsprozesse zur Verfügung stand. Die gewählte Dosierung von 92 µg/kg entsprach der *in vitro* eingesetzten Konzentration von 3 µM (unveröffentlichte Daten von Prof. Dr. Søren-Peter Oelsen, University of Copenhagen; Bentzen et al. 2009). Über diesen Applikationsweg verabreicht ging von NS11021 jedoch kein Infarktgrößen-limitierender Effekt aus (Abbildung 46A). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass der BK-Kanalöffner seinen Wirkort in den Kardiomyozyten nicht erreicht hatte beispielsweise aufgrund einer hohen Plasmaeiweißbindung, einem rasanten Abbau in inaktive Spaltprodukte oder einer äußerst hohen Eliminationsrate. Um diese potentiellen Beeinträchtigungen der Wirkspiegel zu verringern, wurde die Applikationsart auf intraatrial geändert. Hier zeigte NS11021 dosisabhängig zwei Effekte. Einerseits konnte mit der Applikation von 92 µg/kg eine beeindruckende Reduktion der Infarktgröße in den CMBK-CTR erreicht werden. Andererseits verstarb ca. ein Drittel der operierten Tiere während der 120-minütigen Reperfusion (Abbildung 46A+B). Da sowohl CMBK-KO als auch -CTR die Reperusionsphase nicht überlebten, deutete dies auf eine mitoBK-unabhängige Toxizität hin. Die leicht erhöhte Sterbequote der CMBK-KO liegt vermutlich an der bereits basal beeinträchtigten Herzfunktion (Abbildung 39) sowie der erhöhten Vulnerabilität dieser Tiere gegenüber dem I/R-Schaden (Abbildung 41). Die toxischen Nebeneffekte des BK-Kanalöffners NS11021, die sich vor allem durch eine Bradykardie bis hin zum Herzstillstand äußerten, könnten durch eine zusätzliche Inhibition kardialer L-Typ-Ca²⁺-Kanäle bedingt sein, die bereits für NS1619 beschrieben sind (Park et al. 2007). In isolierten Mitochondrien konnte zudem beobachtet werden, dass in nanomolaren Konzentrationen die kardioprotektiven Effekte von NS11021 Paxilline-sensitiv waren. Im mikromolaren Bereich hingegen führte NS11021 zu einer Depolarisation der Mitochondrienmembran, die weder Kalium-abhängig noch sensitiv für Paxilline war (Aon et al. 2010). Als weiteren BK-Kanal-unabhängigen Mechanismus beobachteten Miguel A. Aon und Mitarbeiter, dass NS11021 (1 µM) eine Reduktion des respiratorischen Kontrollindex (Quotient State 3/State 4 der Atmungskette), der eine Aussage über die Kopplung zwischen Substratoxidation und ATP-Bildung ermöglicht, bedingt. Im Gegensatz dazu verminderte die Aktivierung des BK-Kanals mit NS11021 im nanomolaren Bereich den State 4 und führte damit zu einer Verbesserung des respiratorischen Kontrollindex (Aon et al. 2010). Die Konzentrationsabhängigkeit der NS11021-Effekte konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch *in vivo* durch die Reduktion der ursprünglich applizierten Dosis um den Faktor 10 auf 0,3 µM bestätigt werden. Von dieser Konzentration ging bei einer Überlebensrate von 100 % eine signifikante, wenn auch im Vergleich zu der Konzentration von 3 µM geringer

ausfallenden Reduktion der Infarktgröße in den CMBK-Kontrolltieren aus (Abbildung 46C). Der leicht protektive Einfluss von NS11021 in den CMBK-Mutanten geht vermutlich auf die beschriebene BK-Kanal-unabhängige Depolarisation der Mitochondrienmembran sowie auf die Beeinflussung des respiratorischen Kontrollindex zurück (Aon et al. 2010). Im Rahmen dieser Dissertation konnte somit zum ersten Mal eine konzentrationsabhängige Reduktion der Infarktgröße mit NS11021 *in vivo* gezeigt werden. Neben den fehlenden Studien zur Pharmakokinetik und -dynamik ergibt sich aus den beobachteten toxischen Nebenwirkungen erheblicher Optimierungsbedarf bevor an die Translation der Befunde in ein klinisches Setup gedacht werden darf. Zusätzlich muss bedacht werden, dass eine ubiquitäre Öffnung des BK-Kanals, insbesondere bei einer chronischen Aktivierung, auch pathologische Mechanismen in anderen Geweben beeinflussen und damit beispielsweise das Auftreten von generalisierten Epilepsien und paroxysmalen Dyskinesien oder die Migration von Tumorzellen begünstigen kann (Du et al. 2005, Edalat et al. 2016).

4.2.5 Die Ausschaltung des mitoBKs beeinflusst die ROS-Bildung während I/R

Die ROS übernehmen eine duale Rolle. Zum einen fungieren sie unter physiologischen Bedingungen als ein wichtiges Signalmolekül innerhalb der Zelle. Zum anderen schädigen sie redoxsensitive Strukturen und leiten damit Zelltod-induzierende Prozesse ein (O'Rourke et al. 2005). Mitochondriale ROS stellen dabei ein Schlüsselement für die mitochondriale Dysfunktion und Pathologie verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen wie Arteriosklerose, kardiale Hypertrophie, chronische Herzinsuffizienz, ventrikuläre Umbauprozesse und I/R-Schaden dar (Sawyer and Colucci 2000, Morrell 2008, Hausenloy and Yellon 2013). Die mitochondriale ROS-Bildung geht dabei primär von Komplex I und Komplex III der Atmungskette aus (Turrens 2003). Neuere Studien haben einen Zusammenhang zwischen der mitochondrialen Atmungskette und der BK-Kanalaktivierung gezeigt. Eine Öffnung des Kanals mit NS1619 oder NS11021 führte zu einer Steigerung der Respiration (Heinen et al. 2007b, Bednarczyk et al. 2013). Bednarczyk et al. 2013 konnten zudem in dieser Arbeit in Astrozytomzellen zeigen, dass die BK-Kanaluntereinheiten direkt mit der Elektronentransportkette in der Mitochondrienmembran assoziiert sind und dass eine gesteigerte Respiration den BK-Kanal inaktivieren kann. Ob die Vulnerabilität der mitoBK-defizienten Mäuse gegenüber I/R in Zusammenhang mit einer erhöhten ROS-Generierung steht, wurde im Rahmen dieser Arbeit *in vivo* untersucht. Eine elegante Möglichkeit, die äußerst flüchtigen ROS im

lebenden Organismus zu bestimmen, wurde von der Arbeitsgruppe von Michael P. Murphy, Cambridge (UK) entwickelt (Cocheme et al. 2011). Hierbei wird die H_2O_2 - und ONOO⁻-abhängige Umwandlung von MitoB zu MitoP quantifiziert (Abbildung 24). Die Akkumulation des Indikators MitoP in den Mitochondrien erlaubt daher eine Aussage über die mitochondriale ROS-Generierung in einem bestimmten Zeitraum. Der signifikante Anstieg an ROS insbesondere zu Beginn der Reperfusionphase (siehe Abschnitt 1.2.2, Abbildung 3) war in beiden Genotypen der CMBK-Tiere bei einem Vergleich der Basalwerten und der Werte nach I/R zu erkennen (Abbildung 53). Der sGC-Aktivator Cinaciguat, dessen kardioprotektive Wirkung über den mitoBK vermittelt wird (Abbildung 50), führte überraschenderweise in beiden Genotypen zu einer signifikanten Reduktion der ROS-Spiegel nach der 120-minütigen Reperfusionphase verglichen mit I/R (Abbildung 53). Offensichtlich verhindert die pharmakologische Präkonditionierung über den cGMP-abhängigen Signalweg mittels Cinaciguat den massiven mitochondrialen ROS-Anstieg. Die Wirkung von Cinaciguat/cGMP scheint hierbei jedoch mitoBK-unabhängig zu sein. Dieser Befund ist nur schwer mit der Erkenntnis, dass die CMBK-KO im Infarktmodell nicht auf den kardioprotektiven Stimulus durch Cinaciguat ansprechen (Abbildung 50), in Einklang zu bringen. Auch ohne den konditionierenden Stimulus zeigten die mitoBK-Mutanten nur eine Tendenz zu erhöhten ROS-Spiegeln im Vergleich zu ihren Wurfgeschwisterkontrollen. Mit der Normalisierung der ROS-Werte nach I/R bezogen auf die jeweiligen Basalwerte konnte allerdings ein signifikanter Unterschied zwischen den CMBK-KO und Kontrolltieren herausgearbeitet werden (Abbildung 54). Damit konnten die Befunde aus der Literatur, die in isolierten kardiomyozytären Mitochondrien von globalen BK-KO nach Anoxie und Reoxygenierung deutlich erhöhte ROS-Spiegel beobachteten (Soltysinska et al. 2014), zumindest teilweise bestätigt werden. Das unterschiedliche Versuchsdesign, die Detektion der ROS mittels MitoB *in vivo* einerseits und mittels Oxygraph in isolierten Mitochondrien andererseits, sowie zusätzliche Kompensationsmechanismen *in vivo* können für diese Diskrepanz verantwortlich sein. Eine weitere Ursache könnte in der langen Reperfusionphase, an deren Ende die Herzproben und somit die ROS konserviert wurden, liegen, in der bereits Abbauprozesse vorangeschritten sein könnten. Orientiert an den Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe um Michael P. Murphy wurde eine erste Messreihe mit einer verkürzten Reperfusionzeit von 15 min durchgeführt (Annex-Abbildung 7B). Entgegen der Erwartungen lagen hier die ROS-Spiegel unter den Basalwerten und generell weit unter den in der Literatur publizierten ROS-Werten bei kardialer I/R (Chouchani et al. 2014). Dass zudem die CMBK-Knockouttiere geringere ROS-Spiegel zu Beginn der Reperfusionphase aufwiesen, lässt sich mit den bisherigen Erkenntnissen aus der Literatur und den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten nicht interpretieren und ist

vermutlich auf die technischen und organisatorischen Schwierigkeiten beim Versuchsablauf¹ zurückzuführen. Die erneute Durchführung dieser Messreihe ist daher essentiell.

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass in den CMBK-Mutanten der Abbau der ROS beeinflusst ist, wurde die Expression der Superoxiddismutasen, welche die wichtigsten Enzyme für die Degradation der ROS darstellen, untersucht (Abbildung 55). Hierbei scheint die mitochondriale MnSOD primär für die Disproportionierung der durch Komplex I in der Matrix entstandenen Radikale und die CuZnSOD für die von Komplex III generierten ROS im Intermembranraum verantwortlich zu sein (Szewczyk et al. 2009). Dass weder unter basalen Bedingungen noch nach I/R veränderte Expressionen der MnSOD und der CuZnSOD in den CMBK-KO und ihren Wurfgeschwisterkontrollen beobachtet werden konnten (Abbildung 55), zeigte, dass Unterschiede in den ROS-Spiegel nicht grundsätzlich auf ein verändertes Expressionsmuster der ROS-abbauenden Enzyme zurückzuführen sind. Allerdings lassen die hier durchgeführten Proteinbestimmungen keine Aussage über die Aktivität der Enzyme zu. Insbesondere die MnSOD kann durch Phosphorylierungen und posttranslationale Modifikationen wie Acetylierungen und Methylierungen in ihrer Aktivität reguliert werden (Candas and Li 2014). Letztlich müssen zukünftig durchzuführende Aktivitätsassays Aufschluss über die ROS-Dynamik liefern. Hier wird sicherlich auch eine differenzierte Betrachtung der Aktivitäten von Gesamt-ROS und SOD-Unterformen interessant. Erst kürzlich wurde eine neue Biosensormaus präsentiert, die die differenzierte Analyse von kardiomyozytären Redoxmechanismen des Glutathionsystems in der mitochondrialen Matrix und im Zytoplasma ermöglicht (Swain et al. 2016). Die Arbeitsgruppe um Dörthe M. Katschinski zeigte in dieser Arbeit oxidative Veränderungen in der mitochondrialen Matrix, nicht aber im Zytoplasma, von isolierten Kardiomyozyten 7 bzw. 14 Tage nach einer *in vivo* induzierten permanenten Ligatur der LCA und unterstreicht damit erneut die Bedeutung der Mitochondrien als primäre ROS-Quelle beim akuten Myokardinfarkt.

4.2.6 Die mitoBK-abhängige Kardioprotektion und das *Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)*-System

Die Aktivierung des RISK-Signalweges spielt bei der Konditionierung des Herzens eine wichtige Rolle. So werden nach heutigem Kenntnisstand die kardioprotektiven Effekte der mechanischen Konditionierung über eine Phosphorylierung der Hauptkinasen des RISK-Signalweges ERK und Akt vermittelt (siehe hierfür Abschnitt 1.5 und Abbildung 4). Auch

¹ Zeitspanne von >4 Monaten zwischen der Aufarbeitung der Proben und deren LC-MS/MS-Analyse

pharmakologische Mechanismen beispielsweise über Sildenafil vermittelt, induzieren die Phosphorylierung von ERK in isolierten Mäuseherzen unter I/R (Das et al. 2009). Der RISK-Signalweg ist jedoch zudem in die protektive Signaltransduktion beim akuten Myokardinfarkt ohne Konditionierungsstimuli involviert. Zu Beginn der Reperfusion kann ein Anstieg in der Phosphorylierung der Haupteffektorinasen ERK und Akt beobachtet werden, welche mit der Zeit wieder abflacht (Nagata et al. 2015). Ob die Deletion des mitoBKs und der daraus resultierende signifikant erhöhte I/R-Schaden durch eine verminderte Aktivierung des RISK-Signalweges bedingt wird, wurde im Rahmen dieser Arbeit im akuten Infarktmodell nach 30 min Ischämie und 10 min Reperfusion (I₃₀/R₁₀) untersucht. Dabei zeigte sich die Expression der Mediatoren ERK und Akt des RISK-Signalweges sowohl basal als auch nach I₃₀/R₁₀ unbeeinflusst von der kardiomyozytären Ausschaltung des BK-Kanals (Abbildung 56+57). Eine chronische Deletion des mitoBKs führt demnach nicht per se zu einer veränderten Proteinexpression dieser Faktoren. Bei Betrachtung der Aktivität der „Survival“-Kinasen ERK und Akt im akuten Myokardinfarktmodell zeigte sich nach I₃₀/R₁₀ ausschließlich in den CMBK-Kontrolltieren ein signifikant erhöhter Phosphorylierungsstatus der Kinasen (Abbildung 56+57). Die CMBK-KO wiesen nur einen marginalen und nicht signifikanten Anstieg in den Phosphorylierungen im Vergleich zu den basalen Leveln auf. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Signaltransduktionsmechanismen der mitoBK-abhängigen Kardioprotektion bei I/R. Vermutlich kann die Öffnung der mitochondrialen BK-Kanäle zu Beginn der Reperfusion bereits ohne einen konditionierenden Stimulus die in Abbildung 4 als „Mediatorphase“ beschriebene Signalkaskade (über derzeit noch unklare Signalwege) aktivieren. Diese beinhaltet wie bereits in Abschnitt 1.5.1 erörtert die Aktivierung der zentralen Effektorinasen ERK und Akt, die im phosphorylierten Zustand die GSK3 β phosphorylieren und damit die Öffnung der Zelltod-induzierenden mPTP verhindern (Costa et al. 2008). Um diesen Signalweg mechanistisch noch detaillierter aufzuklären, wäre zum einen die Untersuchung der Phosphorylierungslevel von GSK β und PKC ϵ von großem Interesse. Zum anderen sollte die Kinetik der Phosphorylierungsereignisse durch Analyse zusätzlicher Zeitpunkte während der Reperfusionphase untersucht werden, da nur so das maximale Ansprechen sowie Signaldauer und -ende erfassbar sind. Auch die Beteiligung des RISK-Signalweges für die iPost (Abbildung 44) und/oder cGMP-abhängigen Signalwege (Abbildung 49+50) der Kardioprotektion durch den mitoBK muss in zukünftigen Studien noch verifiziert werden.

Der JAK-STAT3-Signalweg (*JAK: Januskinase, STAT: signal transducers and activators of transcription*) zählt neben dem RISK-Signalweg zu einem der wichtigsten „pro-survival“-Signalwege während I/R. Mäuseherzen mit einer spezifischen Deletion von STAT3 zeigten signifikant erhöhte Infarktgrößen, einen Anstieg apoptotischer Vorgänge und eine

gesteigerte Mortalität (Hilfiker-Kleiner et al. 2004). STAT3 ist zudem an Signalprozessen durch Konditionierungsstimuli zur Reduktion des I/R-Schadens beteiligt (Hattori et al. 2001, Xuan et al. 2001, Smith et al. 2004, Boengler et al. 2008). Erst in den letzten Jahren wurde eine direkte Assoziation von STAT3 mit dem Komplex I der Atmungskette in den Mitochondrien und dessen Einfluss auf die Respiration, Apoptoseregulation und die Inhibierung einer Öffnung der mPTP demonstriert (Boengler et al. 2010, Heusch et al. 2011). Ob eine Aktivierung des JAK-STAT3-Signalweges in Verbindung mit einer Öffnung des mitoBKs steht, wurde bislang noch nicht untersucht. Die Injektion von Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF, 10-100 µg/kg/d s.c. für 5 Tage, (Harada et al. 2005)) in mitoBK-Mutanten im Myokardinfarktmodell unter Bestimmung der Aktivierung von STAT3 und der Infarktgrößen könnte hier interessante Erkenntnisse liefern.

4.3 Der mitoBK als Effektormolekül des kardioprotektiven NO/cGMP/PKG I-Signalweges im akuten Myokardinfarkt

Die kardioprotektiven Wirkungen des NO/cGMP/PKG I-Signalweges im akuten Myokardinfarkt sind durch eine Vielzahl von *in-vivo*- und *in-vitro*-Studien belegt (siehe Abschnitt 1.6.7). Die PKG I und die sGC stellen dabei Schlüsselstrukturen in dieser Signalkaskade dar. Dabei sind die an diesem Mechanismus beteiligten *Downstream*-Effektormoleküle der PKG I weitestgehend unklar. Eine schematische Übersicht der postulierten Signaltransduktion ist in Abbildung 76 gezeigt.

Interessante *in-vivo*-Befunde demonstrieren eine Beteiligung der kardiomyozytären PKG I an protektiven Mechanismen während eines akuten Myokardinfarkts (Methner et al. 2013b). Eine Regulation der Expression der PKG I nach 30 min Ischämie, gefolgt von 10 min Reperfusion war weder in den Kontrolltieren noch in den mitoBK-Mutanten zu erkennen (Abbildung 47). Dafür zeigte sich ein leichter, genotypunabhängiger Anstieg in der Phosphorylierung von VASP, einem weitverbreiteten Biomarker für die Aktivität der PKG I. In Kardiomyozyten und isolierten Mitochondrien wurde im Jahr 2005 von der Arbeitsgruppe um Stuart D. Critz gezeigt, dass eine Aktivierung der PKG I in der Öffnung mitochondrialer K_{ATP}-Kanälen, denen eine große Rolle in der Protektion des Herzens vor I/R-Schaden zugeschrieben wird, resultiert (Costa et al. 2005). Die vorliegenden Befunde machen eine Anpassung und Erweiterung dieses Modells um den mitoBK als weitere Komponente der kardioprotektiven Wirkungen von cGMP notwendig. Unberührt davon ist die These, dass der cGMP-abhängige Signalweg den mitochondrialen K⁺-Kanälen vorgeschaltet ist.

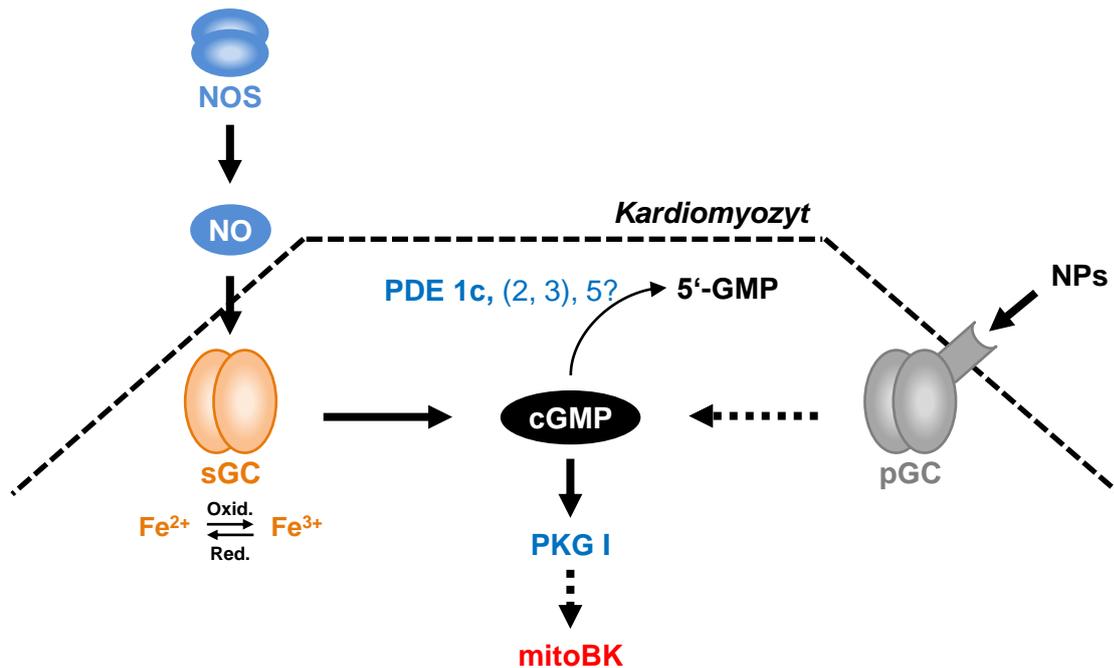


Abbildung 76: Darstellung der kardioprotektiven cGMP-abhängigen Signalkaskade

Das von NOS gebildete gasförmige NO diffundiert in die Kardiomyozyten, bindet und aktiviert die sGC, welche global in Kardiomyozyten verfügbares cGMP bildet. cGMP wiederum aktiviert die PKG I, die ihrerseits die Öffnung des mitoBKs stimuliert. PDEs fördern die Hydrolyse von cGMP zu 5'-GMP. 5'-GMP: Guanosin-5'-monophosphat; cGMP: zyklisches Guanosin 3',5'-monophosphat; eNOS: endotheliale NO-Synthase; NO: Stickstoffmonoxid; NPs: natriuretische Peptide; pGC: membranständige Guanylatzyklase; PKG I: cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I; sGC: lösliche Guanylatzyklase.

Ein weiterer PKG I-vermittelter Mechanismus zur Reduktion des I/R-Schadens bei iPost ist die verzögerte Phosphorylierung des sarkoplasmatischen Proteins Phospholamban (PLN), das die Ca²⁺-Aufnahme ins SR steuert (Abdallah et al. 2005, Bibli et al. 2015, Inserte and Garcia-Dorado 2015). Die Phosphorylierung von PLN durch die PKA und die Ca²⁺/CaM-abhängige Proteinkinase fördern die Bildung von zellschädigenden Ca²⁺-Oszillationen zu Beginn der Reperfusion (siehe Abschnitt 1.2.2, (Siegmond et al. 1997, Inserte and Garcia-Dorado 2015)). Da der PKG I/PLN-Signalweg wahrscheinlich ohne Beteiligung mitochondrialer K⁺-Kanäle abläuft (Bibli et al. 2015), wurde er im Zuge dieser Dissertation nicht weiter untersucht.

Die Bedeutung der kardiomyozytären sGC ist weitgehend unbekannt, da durch die pleiotropen Effekte der sGC-Modulatoren keine Rückschlüsse auf das entsprechende Molekül in den Kardiomyozyten gezogen werden kann. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Untersuchung von Mäusen mit einer Kardiomyozyten-spezifischen Deletion der sGC.

4.3.1 Die kardiomyozytäre sGC ist eine wichtige Komponente der Blutdruckregulation

Im kardiovaskulären System ist die sGC für die Relaxation der glatten Muskulatur von Bedeutung. Ihre genetische Ausschaltung induzierte in Mäusen einen massiven Anstieg des systolischen Blutdrucks um knapp 30 mmHg (Groneberg et al. 2010). Eine globale Deletion der α_1 -Isoform verursachte hingegen nur ca. 25 % dieser Blutdruckerhöhung (Mergia et al. 2006). Durch die pharmakologische Blockade der NOS mittel L-NAME konnte die Bedeutung der sGC für den Blutdruck bestätigt werden (Abbildung 51+72). Interessanterweise spielt auch das sGC-Holoenzym in Kardiomyozyten für die Blutdruckregulation eine Rolle, denn die Deletion der kardiomyozytären sGC führte zu einer signifikanten Erhöhung des systolischen und diastolischen Blutdrucks um jeweils ca. 10 mmHg (Abbildung 69A+B). Die telemetrische Blutdruckmessung wurde hier wie bereits in den CMBK-Tieren für eine bessere Vergleichbarkeit der Daten ausschließlich an männlichen Tieren durchgeführt. Dass neben dem Hintergrund auch das Geschlecht auf den Blutdruck einen bedeutenden Einfluss haben kann, wurde bereits in sGC α_1 -Knockoutmäusen gezeigt, wo nur männliche Tiere einen Androgen-abhängigen Blutdruckanstieg von ca. 20 mmHg aufwiesen (Buys et al. 2008). Die observierten Blutdruckanstiege der Kardiomyozyten-spezifischen sGC-KO könnten durch den Wegfall des modulatorischen Einflusses der sGC-1 ($\alpha_1\beta_1$ -Isoform) auf die Herzfunktion bedingt sein. So konnten im Langendorffmodell nach globaler sGC α_1 -Deletion positiv inotrope und lusitrope Effekte beobachtet werden (Sips et al. 2011). Der NO/sGC/cGMP-Signalweg ist dabei an der myokardialen Kontraktilität beteiligt (Rastaldo et al. 2007). Die Arbeitsgruppe um David A. Kass konnte mit ihren Untersuchungen an speziellen eNOS-Knockoutmäuse, in denen erst die eNOS global deletiert und anschließend die kardiomyozytäre eNOS mittels adenoviraler Transfektion wieder in das Genom eingebracht wurde, zeigen, dass auch kardiomyozytär-gebildetes NO eine wichtige Rolle für die Herzfunktion *in vivo* spielt (Champion et al. 2004). Niedrige NO-Spiegel führen über eine verringerte sGC-Aktivierung/cGMP-Bildung zu einer verstärkten Inhibition der PDE3, was in einer Akkumulation von cAMP in den Herzmuskelzellen resultiert (siehe hierfür auch Abschnitt 1.6.4, (Kojda et al. 1996, Kojda 2001)). Die cAMP-abhängige Aktivierung der PKA führt letztlich zur Öffnung Ryanodin-sensitiver Ca²⁺-Kanäle und damit zur positiven Inotropie (Marx et al. 2000). Die auf der verringerten kardiomyozytären cGMP-Bildung basierenden positiv inotropen Effekte müssen in den CMSGC-Knockoutmäusen so stark ausgeprägt sein, dass keine Kompensation des daraus resultierenden Hypertonus durch die Niere oder Widerstandsgefäße möglich ist. Die Herzfrequenz war in den CMSGC-KO allerdings nur in der aktiven Phase der Tiere leicht beeinträchtigt (Abbildung 69D). Die Bestimmung von Herzleistungsparametern, insbesondere der Verkürzungsfraktionen und

Auswurffractionen, in den CMsGC-Mausmutanten mittels echokardiographischer oder Druck-Volumen-Messungen wäre notwendig um die Rolle der kardiomyozytären sGC bei der myokardialen Kontraktilität *in vivo* zu untersuchen und damit den beobachteten Blutdruckphänotyp erklären zu können.

4.3.2 Die Reduktion des I/R-Schadens durch iPost ist CMsGC-abhängig

Da in dieser Arbeit neben dem mitoBK die Rolle der kardiomyozytären sGC beim akuten Myokardinfarkt im Fokus stand, wurden die CMsGC-Tiere dem akuten Myokardinfarktmodell unterzogen. Hierbei zeigte sich nach 30-minütiger Ischämie und 120-minütiger Reperfusion kein Unterschied in der Infarktgröße zwischen den CMsGC-KO und ihren Wurfgeschwisterkontrollen. Analoge Befunde wurden nach Deletion der im Herzen dominanten α_1 -Untereinheit im Langendorffmodell erhoben (Sips et al. 2011). Sips und seine Kollegen postulierten in dieser Studie zudem, dass die sGC-1-Isoform nicht in die Signalkaskade der iPre involviert ist, da die sGC α_1 -defizienten Herzen gut auf den mechanischen Konditionierungsstimulus reagierten. Eine kompensatorische Hochregulation der verbleibenden sGC-2 ($\alpha_2\beta_1$ -Isoform) konnten sie dabei nicht beobachten. Im Gegensatz dazu implizieren die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen *in vivo*-Befunde, dass die kardiomyozytäre sGC für die Kardioprotektion durch iPost essentiell ist (Abbildung 70). In diesen Mäusen wurde durch Ausschaltung der β_1 -Untereinheit der sGC sowohl das sGC-1- als auch das sGC-2-Holoenzym selektiv in den Kardiomyozyten ausgeschaltet. Denkbar ist, dass die geringe kardiale Expression der sGC-2 in dem sGC α_1 -Knockoutmodell von Sips et al. 2011, welches zum Funktionsverlust der sGC-1 führt, ausreicht um den kardioprotektiven Stimulus zu vermitteln. Wie bereits unter Abschnitt 1.6.3.1 beschrieben, kann die sGC-2 einige Dysfunktionen, die durch eine globale sGC α_1 -Deletion verursacht werden, kompensieren (Mergia et al. 2006). Dass die Signalkaskaden der iPre und iPost grundsätzlich über unterschiedliche Mechanismen vermittelt werden ist eher unwahrscheinlich. Hierfür fehlen zum einen Hinweise aus der Literatur und zum anderen sprechen die im nachfolgenden Abschnitt 4.3.4 diskutierten Befunde zur Rolle der sGC-Modulatoren bei I/R dagegen. Die Befunde aus der vorliegenden Arbeit zur mechanischen Konditionierung in den CMsGC-Tieren stehen im Kontrast zu einigen Studien mit dem sGC-Inhibitor ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one), dessen hemmende Wirkung auf die Kardioprotektion durch iPre und iPost allgemein umstritten ist. (Penna et al. 2006, Sips et al. 2011, Methner et al. 2013b, Sun et al. 2013). Die Inhibierung der sGC mit ODQ erfolgt durch Oxidierung des Hämeisens, eine Reaktion, die nach ODQ-Applikation wahrscheinlich nicht spezifisch für

die Hämgruppe der sGC ist (Zhao et al. 2000a), weshalb der sinnvolle Einsatz der Substanz in *in-vivo*-Studien generell fraglich ist.

Der Vergleich der sGC- und mitoBK-defizienten Kardiomyozytenmodelle mit der Ausschaltung der PKG I in den Kardiomyozyten (Methner et al. 2013b) bei I/R ± iPost, liefert ein interessantes Bild. So hatten die Deletionen der sGC und der PKG I in den Kardiomyozyten keinen Einfluss auf die Größe des basalen I/R-Schadens, wohingegen die mitoBK-defizienten Herzen signifikant erhöhte Infarktgrößen aufwiesen. Diese Befunde legen die Vermutung nahe, dass eine Dysfunktion des NO/cGMP/PKG I-Signalweges nicht grundsätzlich die Vulnerabilität der Herzen gegenüber I/R erhöht. Die schützende Wirkung des BK-Kanals *in vivo* erfolgt demnach in dem akuten Myokardinfarktmodell (ohne Konditionierung) cGMP-unabhängig. Eventuell erfolgt die Aktivierung des mitoBKs unter diesen Bedingungen über andere Mechanismen. Denkbar ist eine direkte Stimulation über die bei I/R erhöhten Ca²⁺-Konzentrationen sowie über den RISK-Signalweg. Die Postkonditionierung zeigte sich in der vorliegenden Arbeit sowohl mitoBK- als auch CMsGC-abhängig. Dagegen konnte die Arbeitsgruppe um Thomas Krieg in ihren Studien keine Evidenz für die Beteiligung der CM-PKG I finden und postulierte eine mögliche Kompensation der kardiomyozytären PKG I durch andere Isoformen, vergleichbar der sGC-Isoformen im Herzen (Methner et al. 2013b). Des Weiteren könnte auch eine hohe Kompartimentalisierung der beteiligten Komponenten in den Kardiomyozyten (Castro et al. 2006) und damit die subzelluläre Lokalisation der cGMP-Bildung bei I/R eine wichtige Rolle spielen (siehe auch Abschnitt 4.3.3).

Weitere Evidenzen für einen Zusammenhang zwischen dem mitoBK und der kardialen NO/cGMP/PKG I-Signalkaskade bei I/R *in vivo* (Abbildung 76), wurden im Zuge dieser Arbeit mittels pharmakologischer Modulation der PDEs und der sGC sowie der NOS generiert (siehe Abschnitte 4.3.3-5).

4.3.3 Infarktlimitierende Effekte der pharmakologischen PDE5-Hemmung hängen von der kardiomyozytären sGC und dem mitoBK ab

Neben dem Einsatz zur Behandlung der erektilen Dysfunktion ist das Interesse an Sildenafil zur Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen stark gestiegen. Im Jahre 2006 erhielt der Wirkstoff die Zulassung für die Therapie der pulmonalen arteriellen Hypertonie. Während im Tierversuch bereits eine deutliche Reduktion des I/R-Schadens gezeigt werden konnte (Salloum et al. 2007, Das et al. 2009, Methner et al. 2013b), überzeugte Sildenafil in klinischen Studien bisher kaum (Andersen et al. 2013). Um diese Diskrepanz zu verstehen, ist es von immenser Bedeutung die genauen Wirkmechanismen

von Sildenafil beim akuten Myokardinfarkt zu identifizieren. Die PDE5 ist im Herzen neben anderen PDEs an der Hydrolyse von cGMP beteiligt, welchem eine wichtige Rolle in der kardioprotektiven Signaltransduktion zugeschrieben wird (Abbildung 76). Die Injektion des PDE5-Hemmers Sildenafil führt folglich zu einer Aktivierung des cGMP/PKG I-Signalweges, dessen mitochondriales Effektorprotein vermutlich der mitoBK darstellt. Erste *in-vitro*-Studien, in denen Paxilline-sensitive Sildenafilwirkungen bei I/R in isolierten Langendorffherzen gezeigt wurden, wurden im Laufe des vorletzten Jahres veröffentlicht (Behmenburg et al. 2015). Diese konnten im Zuge dieser Dissertation im akuten Myokardinfarktmodell in globalen und in mitoBK-Knockoutmäusen bestätigt werden, denn sowohl die Infarktgrößen der globalen als auch der mitoBK-Mutanten zeigten sich nach Sildenafilgabe unverändert, wohingegen die Wildtyp-/Kontrolltiere weitestgehend vor dem I/R-Schaden geschützt waren (Abbildung 33B+49A). Diese Daten lieferten damit den ersten *in-vivo*-Beweis dafür, dass der mitoBK ein Effektormolekül des Sildenafil-induzierten Schutzmechanismus bei I/R darstellt.

Die Konditionierung mit Sildenafil zeigte sich interessanterweise auch von der kardiomyozytären sGC (Abbildung 71A) und der PKG I (Methner et al. 2013b) abhängig. Die Befunde für eine Beteiligung der CM-PKG I implizieren, dass Sildenafil über eine Aktivierung des cGMP/PKG I-Signalweges kardioprotektiv wirkt. Es konnte bereits nach Ischämie und Reoxygenierung gezeigt werden, dass sowohl eine Überexpression der PKG I α als auch eine Sildenafil-induzierte Steigerung der PKG I-Aktivität über ERK- und Akt-Phosphorylierung, sowie Inaktivierung der GSK3 β letztlich zur Verschiebung des Bcl-2/Bax-Verhältnisses in Richtung des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 führt (Das et al. 2005, Das et al. 2006). Die Relevanz der CMsGC in dem Sildenafil-induzierten Schutzmechanismus impliziert, dass zumindest basales oder NO-stimuliertes cGMP über diesen Signalweg gebildet werden muss, damit Sildenafil über PDE5-Hemmung kardioprotektiv wirkt. Dies steht in Einklang mit der Auffassung, dass cGMP in der Zelle kompartimentalisiert vorliegt und lokale cGMP-Pools, welche durch die membranständige pGC gebildet werden, nicht den Ausfall des globalen, sGC-generierten cGMP-Pools kompensieren können (Fischmeister et al. 2006). Die Bedeutung der cGMP-Pools bei I/R sowie deren Kopplung an unterschiedliche subzelluläre Strukturen wären mittels kürzlich generierter cGMP-Sensormassensysteme bereits *ex vivo* untersuchbar (Gotz et al. 2014). Wie bereits zu Beginn dieser Arbeit erörtert, ist die Expression der PDE5, dem vermutlich primären Arzneimitteltarget von Sildenafil, in den Kardiomyozyten durchaus umstritten (Wallis et al. 1999, Kass et al. 2007, Lukowski et al. 2010). Alternativ könnte Sildenafil die PDE5 in Endothelzellen und Myofibroblasten hemmen (Lukowski et al. 2014), was über cGMP und einer Aktivierung der PKG I zur Freisetzung parakrin wirkender Mediatoren und Signalmoleküle führen könnte, welche daraufhin in den Kardiomyozyten

sGC-abhängig die Kardioprotektion auslösen könnten. Für diese Hypothese, insbesondere für die Sildenafil-induzierte Bildung von NO in den nicht-kardiomyozytären Zellen, gibt es bisher jedoch nur wenige konkrete Anhaltspunkte. Des Weiteren lässt sich nicht ausschließen, dass es im Zuge der in dieser Arbeit durchgeführten Sildenafilapplikationen zur Hemmung weiterer PDEs in den Kardiomyozyten gekommen ist (siehe hierfür auch 3.9.2). Bezogen auf das Gesamtblutvolumen der Maus betrug die hier eingesetzte Sildenafilkonzentration ca. 67 nM. Aufgrund der intraatrialen Injektion mussten jedoch deutlich höhere lokale kardiale Wirkspiegel angenommen werden. Insbesondere eine zusätzliche Blockade der kardiomyozytären PDE1C mit einem IC₅₀-Wert von 400 nM erscheint damit plausibel (Lukowski et al. 2010). Vandeput et al. postulierten bereits 2009, dass eine Vielzahl der beobachteten Sildenafilwirkungen in Mausmodellen zu kardiovaskulären Erkrankungen auf eine Inhibition der PDE1 zurückgehen (Vandeput et al. 2009). Da derzeit keine selektiven PDE1-Inhibitoren zur Verfügung stehen, wurde zusätzlich noch die Wirkung des Wirkstoffes Tadalafil, einem selektiven PDE5-Hemmer mit längerer Halbwertszeit, im akuten Myokardinfarktmodell untersucht. Tadalafil bindet mit einer 10.000-fach höheren Selektivität an die PDE5 als an die PDEs 1-4 (Padma-Nathan 2003). Durch die intraperitoneale Applikation von Tadalafil wurden hohe lokale Konzentrationen im kardialen Gewebe vermieden (siehe hierfür 2.5.3.7). Interessanterweise hatte Tadalafil die gleichen kardioprotektiven Effekte wie Sildenafil (Abbildung 49B+71). So führte Tadalafil in den Kontrolltieren zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße, wohingegen in den CMsGC-KO keine Kardioprotektion nachgewiesen werden konnte. Die Arbeitsgruppe um Rakesh C. Kukreja demonstrierte 2009, dass die Tadalafil-induzierte Reduktion der Infarktgröße von der PKG I-vermittelten Generierung von Schwefelwasserstoff (H₂S) abhängig ist (Salloum et al. 2009). H₂S wirkt im Tiermodell bei I/R kardioprotektiv und vermittelt seine Infarkt-reduzierende Wirkung neben einer direkten Modulation der mitochondrialen Respiration über eine Aktivierung von mitochondrialen K⁺-Kanälen (*bisher*: mitoK_{ATP}) (Elrod et al. 2007, Zhang et al. 2007b, Ji et al. 2008). Die Versuchsreihen mit dem sog. PDE5-Hemmer Sildenafil sowie mit Tadalafil implizieren, dass die pharmakologische Prä- und Postkonditionierung im akuten Myokardinfarktmodell CMsGC- und mitoBK-abhängig ist. Die genaue Lokalisation der bei I/R relevanten PDE5 bleibt jedoch ungeklärt und wurde auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht.

Alternativ wird der bei I/R zum mitoBK signalisierende cGMP-Pool auch von der PDE3 (*hier*: PDE3B) kontrolliert. So zeigten PDE3B^{-/-}, nicht aber PDE3A^{-/-}-Mäuse eine Paxilline-sensitive Reduktion der Infarktgröße. Unterschiede in der zellulären Lokalisation dieser PDEs könnten dabei ursächlich für die Paxillinwirkung sein. So ist die PDE3A vor allem

mit SERCA kolokalisiert, wohingegen die PDE3B in den T-Tubuli in unmittelbarer Nähe der kardialen Mitochondrien vorkommt. (Chung et al. 2015)

Um Differenzen in der Hämodynamik der Mauslinien als Ursache für die signifikanten Unterschiede in den Infarktgrößen nach Applikation der cGMP-erhöhender Substanzen auszuschließen, wurden repräsentativ die Blutdruckänderungen nach Tadalafilinjektion bestimmt. Der Blutdruck wurde nach Tadalafingabe über ein Zeitintervall von 210 min, welches dem Zeitfenster von der Injektion bis zum Ende der Reperfusion entsprach (Abbildung 27A), telemetrisch ermittelt. Hierbei zeigte sich eine Reduktion des mittleren arteriellen Blutdrucks um ca. 10 mmHg in den CMsGC- und mitoBK-defizienten Mauslinien sowie in den jeweiligen Wurfgeschwisterkontrollen (Abbildung 49+71). Hämodynamische Effekte können demnach als Ursache für die unterschiedlichen Infarktareale nach Gabe der cGMP-erhöhenden Substanzen ausgeschlossen werden.

4.3.4 Die pharmakologische Modulation der sGC triggert mitoBK-abhängige Schutzmechanismen bei I/R

Die Entwicklung der sGC-Aktivatoren bzw. -Stimulatoren, zu deren wichtigsten Vertretern Cinaciguat und Riociguat zählen, eröffnet neben der klinischen Bedeutung der Substanzen auch neue Möglichkeiten der Modulation des NO/cGMP/PKG I-Signalweges. Wie bereits erörtert, wurden beide sGC-Modulatoren bereits in *in-vivo*- und *ex-vivo*-Studien auf ihre kardioprotektive Wirkung hin untersucht. Interessanterweise können sowohl sGC-Aktivatoren als auch -Stimulatoren zu einer Reduktion der Infarktgröße führen (Ockaili et al. 2008, Salloum et al. 2012, Methner et al. 2013b, Bice et al. 2014).

Für den sGC-Stimulator Riociguat konnten Methner et al. 2013a zeigen, dass eine einmalige intravenöse Gabe fünf Minuten vor Beginn der Reperfusion im Myokardinfarkt sowohl zu einer akuten Reduktion der Infarktgröße als auch nach einer 28-tägigen Reperusionsphase zu einer deutlich verbesserten kardialen Auswurfraction führt. Dabei konnte die Kardioprotektion durch die Gabe des PKG-Inhibitors KT5823, nicht aber durch den NO-Synthaseblocker L-NAME verhindert werden (Methner et al. 2013a). Dieser Befund weist auf eine NO-unabhängige Stimulation der sGC, sowie eine weiterführende Signaltransduktion über die PKG I, durch Riociguat bei I/R hin. Wie bereits unter Abschnitt 1.6.7 beschrieben ist die reduzierte Hämgruppe essentiell für die sGC-Stimulation, die sowohl NO-unabhängig als auch synergistisch mit NO ablaufen kann (Friebe et al. 1996). Die Infarktgrößenreduktion durch die Riociguatinjektion konnte im Rahmen der vorliegenden Studien in den CMBK-Kontrollmäusen bestätigt werden (Abbildung 50). Zudem konnte erstmals ein Zusammenhang zwischen einer Stimulation der sGC und dem

mitoBK hergestellt werden, denn in den CMBK-KO war die Riociguat-vermittelte Kardioprotektion deutlich reduziert.

Unter oxidativem Stress verschiebt sich das Redoxgleichgewicht der Hämgruppe von der reduzierten Form (Fe^{2+}) zur oxidierten Form (Fe^{3+}). Dies geht mit einem Verlust des Häms einher, weshalb eine Bindung von NO nicht mehr möglich ist (Stasch et al. 2006, Roy et al. 2008, Zhou et al. 2008). Im akuten Myokardinfarkt ist die Präsenz von ROS und der damit verbundene oxidative Stress ursächlich für einen großen Prozentsatz des entstehenden I/R-Schadens (siehe hierzu Abschnitt 1.3.2, (Heusch et al. 2008)). Daraus ergibt sich die Annahme, dass während der I/R das Gleichgewicht zu Gunsten der oxidierten Form der sGC, die insensitive für die sGC-Stimulatoren ist, verschoben wird (Bice et al. 2014). Ob diese Hypothese *in vivo* von Bedeutung ist, ist aufgrund der guten kardioprotektiven Wirkung von Riociguat fraglich. Da auch die mitoBK-Mutanten mit Riociguat eine leichte Reduktion der Infarktgröße zeigten, scheint der sGC-Stimulator noch weitere Effekte zu vermitteln, die unabhängig von der kardiomyozytären sGC und/oder dem mitoBK sind. Ursächlich hierfür könnte zum einen die Stimulation weiterer, nicht kardiomyozytärer sGCs sein. Zum anderen konnte die Arbeitsgruppe um Thomas Krieg zeigen, dass die Injektion von Riociguat unmittelbar zu einer milden Reduktion des systolischen Blutdrucks führt (Methner et al. 2013a). Dies stellt einen wichtigen Einflussfaktor für die Größe des I/R-Schadens dar, da eine langsamere Wiederdurchblutung der Koronargefäße zu Beginn der Reperfusion den akuten Anstieg von ROS unterbinden könnte.

Während die sGC-Stimulatoren im oxidierten Zustand der sGC keine Wirkung zeigen, können die sGC-Aktivatoren mit einer hohen Affinität in die unbesetzte Hämtasche der sGC binden und dadurch das Enzym stabilisieren. Dadurch bleibt die sGC auch im oxidierten, NO-insensitiven Zustand funktional und ihr Ubiquitin-abhängiger Abbau wird verhindert. Die cGMP-erhöhende Wirkung der sGC-Aktivatoren ist dabei primär auf die erhöhte Aktivität der cGMP-bildenden sGC zurückzuführen, der Einfluss auf die cGMP-degradierenden PDEs ist wahrscheinlich vernachlässigbar. (Stasch et al. 2006)

Somit erscheinen sGC-Aktivatoren prinzipiell besser geeignet für die Therapie eines Myokardinfarkts. Sowohl in den CMBK- als auch in den CMsGC-Kontrolltieren führte die Applikation von Cinaciguat zu einer prominenten Reduktion der Infarktgröße (Abbildung 50+73B). Dabei ergab der direkte Vergleich zwischen der Riociguat- und Cinaciguat-Behandlungsgruppe der CMBK-CTR eine noch ausgeprägtere Kardioprotektion und geringere Schwankungen in der Infarktgröße innerhalb der mit dem sGC-Aktivator behandelten Kohorte (Abbildung 50B). Abgesehen von den bereits ausgeführten pharmakodynamischen Effekten der Substanzen könnten auch die unterschiedlichen Applikationsschemata Einfluss auf die Infarktareale haben. Die hier verwendeten

Applikationsprotokolle orientierten sich dabei an bereits etablierten Schemata (Salloum et al. 2012, Methner et al. 2013a). Cinaciguat wurde dementsprechend 30 min vor der ischämischen Phase intraperitoneal injiziert, wohingegen Riociguat intravenös unmittelbar vor dem Beginn der Reperfusion verabreicht wurde. Identische Anwendungen wurden nicht untersucht, da der Fokus dieser Arbeit auf die Identifizierung von Signalmechanismen und nicht auf pharmakokinetische und -dynamische Wirkstoffuntersuchungen gelegt war.

Zusammengenommen deuten diese Befunde daraufhin, dass eine Stimulation bzw. Aktivierung der sGC sowohl präkonditionierend als auch von größerer experimentell-klinischer Bedeutung postkonditionierend das Herz vor I/R-Schaden schützt. Die Koadministration eines Stimulators mit einem Aktivator um gleichzeitig die reduzierte und die oxidierte Form der sGC zu adressieren, zeigte in der Literatur keine weiteren positiven Effekte (Bice et al. 2014). Die Applikation von Cinaciguat in den CMsGC-KO verifiziert dabei die Bedeutung der endogenen sGC in den Kardiomyozyten für die pharmakologische Kardioprotektion. Eine Reduktion der Infarktgröße mit Cinaciguat durch die Aktivierung der sGC war dementsprechend nur in den CMsGC-CTR beobachtbar (Abbildung 73B). Die bis dato durchgeführten pharmakologischen Studien konnten eine Beteiligung der sGCs in weiteren Zelltypen wie beispielsweise in Endothelzellen nicht ausschließen. Dies ist in Einklang mit den Befunden von Methner et al., die die protektive Wirkung von Cinaciguat in Abhängigkeit der kardiomyozytären PKG I demonstrierten (Methner et al. 2013b).

Der mitochondriale BK-Kanal konnte auch in diesem Setup als Effektormolekül der zytosolischen Signalkaskade identifiziert werden. In den mitoBK-defizienten Tieren war kein schützender Effekt durch die Applikation des sGC-Aktivators zu erkennen (Abbildung 50, rechts). Damit lässt sich bei I/R ein direkter Zusammenhang zwischen der kardiomyozytären sGC und dem mitoBK postulieren. Ob eine Reduktion der Infarktgröße durch eine pharmakologische Öffnung des mitochondrialen BK-Kanals in den CMsGC-defizienten Mäusen möglich ist, wurde in einem weiteren Setup untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die kardioprotektiven Effekte des BK-Kanalöffners NS11021 unabhängig von der kardiomyozytären sGC vermittelt werden (Abbildung 74). Dieser Befund bestätigt, dass der mitoBK der postulierten cGMP-abhängigen Signalkaskade nachgeschaltet ist. NS11021 wirkt über eine Erhöhung der spannungsabhängigen Öffnungswahrscheinlichkeit des BK-Kanals bei negativen Potentialen (Bentzen et al. 2007). Dieser kardioprotektive Mechanismus ist offensichtlich unabhängig von einer Modulation des mitoBKs durch den NO/cGMP/PKG I-Signalweg (siehe Abschnitt 4.3.2) und bleibt daher auch nach der Deletion der kardiomyozytären sGC intakt.

4.3.5 Kardioprotektionen durch iPost und Sildenafil sind abhängig von einer funktionalen NO-Synthese

Bislang wurden die kardiomyozytäre sGC sowie deren potentielle Effektoren (*hier*: PKG I und mitoBK) im Kontext des I/R-Schadens betrachtet. Inwiefern die beobachteten kardialen Phänotypen von der Bildung des endogenen Botenstoffs NO abhängen, sollte mittels L-NAME, einem Inhibitor der konstitutiven NO-Synthasen, untersucht werden. Die Messung des Blutdrucks unter L-NAME bestätigte die Wirkung in der verwendeten Applikation von 5 mg/ml im Trinkwasser für 4-5 Tage. Der bereits in der Literatur beschriebene Blutdruckanstieg konnte sowohl in den CMsGC- als auch in den CMBK-Tieren in beiden Genotypen observiert werden (Abbildung 51B+72B). Dieser lässt sich eindeutig auf die Blockade der NOS zurückzuführen, die unter physiologischen Bedingungen durch die Bildung von NO eine bedeutende Rolle für die Blutdruckregulation spielt (Huang et al. 1995). Die Behandlung mit L-NAME führte zudem zu einer deutlichen Reduktion der Herzfrequenz (Abbildung 51D+72D). Ein Auslöser hierfür könnte eine kompensatorische Aktivierung des Barorezeptorreflex als Antwort auf den erhöhten Blutdruck darstellen (Obst et al. 2006). Des Weiteren wird ein direkter Einfluss von L-NAME auf die Regulation der Herzfrequenz im Sinusknoten postuliert. NO hat dabei vermutlich einen direkten stimulatorischen Effekt auf die Aktionspotentialgenerierung am Sinusknoten (Musialek et al. 1997). Dieser Effekt könnte in Mäusen durch die spezielle anatomische Lage des Sinusknotens an der Stelle in der *Vena cava superior*, wo sie in das rechte Atrium zweigt, noch ausgeprägter sein, da Faktoren, die dem Blutfluss folgen, einen direkten Einfluss auf die Zellen am Sinusknoten ausüben könnten (Janssen and Smits 2002). Bei einer genaueren Betrachtung der Blutdruckwerte der CMBK-Tiere fällt auf, dass sich die Blutdruckwerte zwischen den CMBK-KO und ihren Kontrolltieren, die sich unter physiologischen Bedingungen noch signifikant unterschieden, unter L-NAME annähernd identisch waren (Abbildung 51). Eine mögliche Schlussfolgerung ist, dass die Kontrolltiere über einen besseren Kompensationsmechanismus bei Blutdruckschwankungen verfügen. Alternativ könnten die Unterschiede in den Blutdruckwerten unter physiologischen Bedingungen bereits durch erhöhte NO-Spiegel ausgelöst werden, was letztlich in einer höheren L-NAME-Sensitivität der CMBK-KO resultieren würde (siehe hierfür auch Abschnitt 4.2.2). Um dieser Vermutung nachzugehen, wäre es notwendig die endogenen NO-Spiegel in den CMBK-KO und -CTR zu bestimmen. Hierfür kann beispielsweise 4,5-Diaminofluoresceindiacetat, ein zellpermeabler, fluoreszierender Detektor von NO in lebenden Zellen, verwendet werden. Die Gabe von NO-Donatoren (z.B. Molsidomin, Isosorbidmononitrat) *in vivo* würde zur Aufklärung der Rolle der CMsGC und des mitoBKs für die NO-vermittelten Blutdruckänderungen beitragen. Des Weiteren wäre es von Interesse, Untersuchungen zu den Expressionsmuster und Aktivitäten der

NO-Synthasen, insbesondere der eNOS, in Kardiomyozyten sowie in nicht-kardiomyozytären Zellen (z.B. Fibroblasten, Endothelzellen) durchzuführen.

Über die Blutdruckmessungen wurden die NOS-Blockade und damit die Hemmung der endogenen NO-Bereitstellung zum Zeitpunkt des Myokardinfarkts sichergestellt. Interessanterweise hatte L-NAME per se keinen Einfluss auf den I/R-Schaden (Abbildung 52A+73A). Dies korreliert gut mit den vorangegangenen Befunden zur Rolle des kardioprotektiven sGC/cGMP/PKG I-Signalweges, der erst durch konditionierende Stimuli aktiviert wird, sowie mit Studien aus der Literatur (Takano et al. 1998, Yang et al. 2004, Zhang et al. 2014). Auch die Reduktion der Infarktgröße durch den BK-Kanalöffner NS1619 zeigte sich in perfundierten Langendorffherzen nicht L-NAME-sensitiv (Wang et al. 2004), was ein weiterer Hinweis auf die cGMP-abhängigen und -unabhängigen Effekte des mitoBKs bei I/R ist. In einer klinischen Studie mit 118 STEMI-Patienten (NIAMI) hatte die Infusion von Natriumnitrit, das zu NO reduziert und damit bioaktiviert werden kann, unmittelbar vor der PTCA keinen Benefit in den gesetzten Endpunkten (Siddiqi et al. 2014). In anderen präklinischen Studien wurde dagegen ein L-NAME-vermittelter Anstieg der Infarktgröße in Verbindung mit erhöhter Apoptose bereits nach I/R in isolierten Langendorffherzen beobachtet (Weiland et al. 2000, Andelova et al. 2005). Die Aktivität der NOS ist während der ischämischen Phase eingeschränkt, da sie Sauerstoff als Substrat benötigt. Es ist jedoch bekannt, dass das intrinsische Signalmolekül Nitrit während einer Unterversorgung mit Sauerstoff zu NO reduziert wird und dadurch apoptotische und zytotoxische Effekte, die durch die Reperfusion induziert werden, in Herz-, Leber- und Gehirnzellen limitiert (Webb et al. 2004, Duranski et al. 2005, Jung et al. 2006). Dabei sind die pathologischen Bedingungen während I/R mit der limitierten Sauerstoffzufuhr und dem sauren Gewebe-pH-Wert (Abbildung 1) optimal für die Reduktion von Nitrit zu NO (Shiva et al. 2007). Die Arbeitsgruppe um Mark T. Gladwin postulierte, dass Nitrit dosisabhängig den Komplex I der Atmungskette durch S-Nitrosylierung modifizieren kann und somit einerseits die ROS-Generierung verringern und andererseits die oxidative Phosphorylierung verbessern kann (Shiva et al. 2007).

Die eigenen Ergebnisse implizieren, dass sowohl die iPost als auch die Sildenafil-vermittelte Kardioprotektion durch Blockade der endogenen NO-Bildung aufhebbar sind (Abbildung 52). Da die CMBK-KO generell nicht auf die pharmakologischen Konditionierungen ansprachen, hatte hier L-NAME erwartungsgemäß keinen weiteren Effekt auf das Infarktareal.

4.3.6 Limitationen der akuten I/R-Studie zur Bedeutung des NO/cGMP/PKG I/mitoBK-Signalweges

Die PKG I in den Kardiomyozyten stellt eine Schlüsselkomponente der NO/cGMP/PKG I/mitoBK-Kaskade dar. Ungeklärt ist jedoch noch, wie diese zur Innenmembran des Mitochondriums signalisiert. Die Poren der äußeren Membran der Mitochondrien erlauben grundsätzlich den Austausch von Molekülen zwischen Zytosol und Intermembranraum. Die porenformenden Transmembranproteine in der äußeren Membran limitieren die Größe der Moleküle für den Austausch jedoch auf 8 kDa (Zalman et al. 1980). Es ist also nur schwer vorstellbar, dass die PKG I (M_w ca. 78 kDa) über diesen Mechanismus den mitoBK erreichen kann. Ungelöst ist auch die Frage nach der Orientierung des mitoBKs in der inneren Mitochondrienmembran. Aufgrund aktueller Patch-Clamp-Studien mit den BK-Kanalblockern Iberiotoxin und Charybdotoxin wird eine Ausrichtung des mitoBKs mit dem C-Terminus in Richtung der Mitochondrienmatrix postuliert (Balderas et al. 2015). Diese Orientierung wäre entgegengesetzt der Ausrichtung des BK-Kanals an der Plasmamembran. Bislang identifizierte PKG I-Phosphorylierungsstellen im BK-Kanal befinden sich allerdings am C-Terminus der α -Untereinheit (Kyle et al. 2013). Es lässt sich jedoch die Existenz einer weiteren, bislang unidentifizierten Phosphorylierungsstelle am N-Terminus des mitoBKs postulieren. Diese wäre im Intermembranraum zumindest potentiell von einer dort lokalisierten PKG I erreichbar. Der Transport des BK-Kanals über die äußere Mitochondrienmembran konnte wie bereits unter Abschnitt 1.7.1 beschrieben über die Ausbildung der DEC-Spleißvariante und einer Interaktion mit Strukturen des TOM-Komplexes entschlüsselt werden und findet kotranslational statt (Singh et al. 2013, Zhang et al. 2016). Eine Möglichkeit der Signalübermittlung wäre ein mitochondrialer Pool der PKG I, der ebenso über den TOM-Transportweg in den Zwischenmembranraum der Mitochondrien transloziert und durch die Diffusion von cGMP über die äußere Mitochondrienmembran aktiviert wird (Costa et al. 2005). In isolierten Mitochondrien konnte die Arbeitsgruppe um Stuart D. Critz in dieser Studie zeigen, dass die exogene Applikation von der PKG I und von cGMP ein Anschwellen der Mitochondrien in Abhängigkeit einer Öffnung des K_{ATP} -Kanals bedingt. Ob die in Abhängigkeit der PKG I und cGMP beschriebenen Effekte tatsächlich eine Öffnung des mito K_{ATP} s und nicht des mitoBKs bzw. beider K^+ -Kanäle bedingen, wurde bereits in Abschnitt 4.2.3 ausführlich diskutiert und muss im Rahmen zukünftiger Arbeiten endgültig geklärt werden. Es fehlen auch direkte Evidenzen für die ko- oder post-translationalen Translokation der PKG I vom Zytoplasma in den Intermembranraum der Mitochondrien. Wahrscheinlicher ist daher die Beteiligung weiterer Moleküle an der Signaltransduktion. Hier ist die mitochondriale PKC ϵ 1 als Vermittler der kardioprotektiven Signaltransduktion zwischen der zytosolischen PKG I und den mitochondrialen

K_{ATP}-Kanälen in den Fokus gerückt (Costa et al. 2008). Eine direkte Regulation der Aktivität des plasmamembranständigen BK-Kanals durch PKC-Isoformen ist bereits gezeigt (Zhou et al. 2010).

Eine Aktivierung der PKG I über natriuretische Peptide ist bereits mehrfach in der Literatur beschrieben. So konnten die Administrationen der natriuretischen Peptide ANP und BNP im Tiermodell das Herz vor I/R-Schaden schützen (Yang et al. 2006, Ren et al. 2007). Ob die ANP/BNP-vermittelte Kardioprotektion ebenfalls mitoBK-abhängig ist, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

Erst kürzlich wurde eine altersabhängige Aktivierung des BK-Kanals bei I/R durch die PKA postuliert (Heinen et al. 2014). Diese Studie ist spannend, einige Aspekte sollten jedoch vorsichtig interpretiert werden. Zum einen haben die Autoren Forskolin, das neben einer Aktivierung der PKA eine Reihe von cAMP-unabhängigen Modulationen von Membrantransportproteinen und Kanälen stimuliert (Laurenza et al. 1989), für die Induktion der Kardioprotektion eingesetzt. Zum anderen wurden die I/R-Studien mit dem unspezifischeren BK-Kanalöffner NS1619 und dem für die Hemmung des mitoBKs ungeeigneten BK-Kanalblocker Iberitoxin durchgeführt (siehe hierfür Abschnitt 1.7.4). Für den endgültigen Nachweis eines cAMP/PKA/mitoBK-Signalweges erscheint demnach die Untersuchung genetisch veränderter, BK-Kanal-defizienter Mäuse notwendig. Ein interessanter Ansatz von Heinen et al. 2014 ist auch die Studie an jungen und älteren Tieren, da Mortalität und Morbidität nach akutem Myokardinfarkt mit dem Alter der Patienten ansteigen (Maggioni et al. 1993). Neben den auftretenden Komorbiditäten könnte dies auch auf altersabhängige Defekte in den kardioprotektiven Signalkaskaden zurückzuführen sein und eine Erklärung darstellen, warum die iPost in klinischen Studien häufig nicht zum gewünschten Erfolg führt, jedoch in Tiermodellen mit „optimierten Patienten“ eine überzeugende Reduktion des I/R-Schadens hervorruft (siehe hierfür 4.2.1).

4.4 Langzeitfolgen der mitoBK-Ablation post-MI

Für die Klinik sind neben den akuten Auswirkungen eines Myokardinfarkts, auch die Langzeitfolgen sowie das Langzeitüberleben der Patienten von großem Interesse. Insbesondere der Erhalt der Funktionsfähigkeit des Herzens ist entscheidend für die post-MI Lebensqualität der Patienten. Präklinisch kann die Bestimmung des Überlebens, der funktionsgestörten Myokardregion sowie des post-MI Remodelings in chronischen Myokardinfarktmodellen untersucht werden. In einem ersten Setup wurden die Auswirkungen der Kardiomyozyten-spezifischen Deletion des BK-Kanals nach

permanenter Ligatur der LCA für 24 Stunden untersucht. Dieses Modell unterscheidet sich von den anderen Myokardinfarktmodellen dahingehend, dass es ausschließlich die Größe des Ischämie-, nicht aber des Reperfusionsschadens betrachtet. Diese Differenzierung erlaubt letztlich Aussagen zur Krankheitsrelevanz des BK-Kanals für die entsprechenden pathologischen Trigger. Das permanente Okklusionsmodell entspricht damit einem Patientenkollektiv, bei welchem die Reperfusion nicht rechtzeitig durchgeführt werden kann und eine Begrenzung des Ischämieschadens durch pharmakologische Intervention einen großen Benefit darstellen würde. Die permanente Ligatur resultierte in den CMBK-Kontrolltieren in einem deutlichen Infarktgrößenanstieg von ca. 100 % im Vergleich zum akuten Modell (siehe Abbildung 41A und 58C). Dies unterstreicht bereits die generelle Bedeutung der schnellen Revaskularisierung des okkludierten Gefäßes. Nach der permanenten Ligatur war in den mitoBK-defizienten Tieren eine Tendenz zu höheren Infarktgrößen erkennbar. Dieser Unterschied erreichte allerdings aufgrund der großen Streuung der Ergebnisse keine Signifikanz. Bereits nach 24-stündiger Ligatur zeigten >50 % der CMBK-Knockoutherzen deutliche Anzeichen einer Dilatation, wohingegen in den Kontrolltieren nur 14 % der Herzen ähnlich stark dilatiert waren (Abbildung 58A+B). Aussagen zur Funktionsfähigkeit der mitoBK-defizienten Herzen nach dem Ischämieschaden können akut noch nicht getroffen werden. Zur Darstellung der zu erwartenden Funktionseinschränkungen sollten echokardiographische Messungen jeweils vor und 24 Stunden nach der Ligatur durchgeführt werden. Eine Blockade des mitoK_{ATP}-Kanals mit 5-HD beeinflusste die Infarktgröße nach 24-stündiger Ligatur nicht, allerdings waren Präkonditionierungen mit Isofluran und Dodecafluoropentane mitoK_{ATP}-abhängig (Lucchinetti et al. 2008, Strom et al. 2014).

Da für den mitoBK vor allem ein protektiver Einfluss auf den Reperfusionsschaden postuliert wird, war die erstmalige Durchführung des chronischen Myokardinfarktmodells mit 30 min Ischämie und 4 Wochen Reperfusion (I₃₀/R_{4Wo}) in den CMBK-Tieren ein weiterer interessanter Ansatz. Aufgrund der hohen technischen Anforderungen dieses Modells (siehe Abschnitt 3.14 für weitere Details) wurden alle Herzproben am Versuchsende unabhängig von drei Wissenschaftlern begutachtet und bewertet. So konnte sichergestellt werden, dass nur tatsächlich infarzierte Herzen für die statistische Auswertung der erhobenen Daten berücksichtigt wurden. Ein Vergleich der basalen Herzgewichte mit den Herzgewichten 4 Wochen post-MI, zeigte einen signifikanten, aber genotypunabhängigen Anstieg (siehe Tabelle 6 und 7). Die echokardiographischen Messungen ergaben außerdem signifikant reduzierte Auswurf- und Verkürzungsfraktionen post-MI und bestätigten die erhöhten Massen der linken Ventrikel beider Genotypen (Abbildung 59+60). Die basalen Unterschiede in den Herzfunktionen zwischen den CMBK-KO und -CTR hatten sich nach I₃₀/R_{4Wo} angeglichen. Die Bedeutung dieser

Beobachtung ist unklar, da es aufgrund der logistischen Herausforderungen und Quarantänebedingungen unmöglich war die echokardiographischen Messungen in denselben Tieren prior- und post-MI durchzuführen. Dies wäre jedoch notwendig um den direkten Einfluss eines Myokardinfarkts auf jedes Tier individuell bestimmen zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zudem die Eignung der konventionellen echokardiographischen Auswertemethode für die post-MI Herzen überprüft. Nachteilig an dieser Methode ist, dass die Ermittlung sämtlich Parameter im sog. M-Mode über eine vertikale Linie des Ventrikels im B-Mode verläuft (Ram et al. 2011). Diese Linie halbiert orthogonal die Strecke zwischen Apex und Aortenklappe (Abbildung 31B). Lokale Ereignisse, die nur bestimmte Areale des Herzmuskels betreffen, wie beispielsweise die Okklusion der LCA, sind mit dieser Methode daher nur schwer darstellbar. Diese Feststellung haben aktuelle Arbeiten bestätigt (Peng et al. 2009, Bauer et al. 2011, Shepherd et al. 2016). Aus diesem Grund wurden die echokardiographischen Messungen auch mit der „Vevo Strain 2100“-Auswertemethode, die als deutlich sensitiver als die konventionelle Methode gilt (Hashimoto et al. 2003, Bauer et al. 2011, Bauer et al. 2013, Shepherd et al. 2016), durchgeführt. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass das gesamte Endokard des linken Ventrikels erfasst wird (Abbildung 61B). Der direkte Vergleich der ermittelten Auswurffractionen beider Methoden machte deutlich, dass die konventionelle Methode nicht zur Bestimmung der Herzfunktionsparameter nach einem Myokardinfarkt geeignet zu sein scheint. So zeigte sich, dass mit der konventionellen Methode deutlich höhere Auswurffractionen als mit der „Vevo Strain 2100“-Auswertemethode ermittelt (Abbildung 61C) und somit bestehende Dysfunktionen post-MI nicht erfasst wurden. Unter basalen Bedingungen lieferten beide Methoden vergleichbare Ergebnisse, was ihre grundsätzliche Eignung zur Erfassung der Herzfunktionsparameter klar bestätigt. Aufgrund der bezeichneten Vorteile wurde die „Vevo Strain 2100“-Auswertemethode verwendet um eine detaillierte Segmentanalyse der Herzmuskelregionen post-MI durchzuführen. Die Einteilung des Endokards in sechs Segmente zeigte dabei während Systole und Diastole in den Kontrolltieren unter basalen Bedingungen einen synchronisierten Wellenverlauf der longitudinalen Verformung der einzelnen Segmente zueinander (Abbildung 63A). Die Verformung der Längsachse, die die endokardiale Verkürzung der myokardialen Fasern charakterisiert, zählt zu den ersten und sensitivsten Markern einer kardialen Dysfunktion (Hashimoto et al. 2003, Mizuguchi et al. 2008, Cottrell and Kirkpatrick 2010). Die Synchronizität der longitudinalen Verformung war in den CMBK-KO bereits unter physiologischen Bedingungen beeinträchtigt, was die kardiale Funktionsstörung dieser Tiere weiter unterstreicht (siehe Abschnitt 4.2.2). Nach I_{30}/R_{4w0} wurde ein eher disharmonischer Verformungsablauf in beiden Genotypen offensichtlich, der sich in den CMBK-KO deutlich prominenter darstellte (Abbildung

63C+D). Die Verformung der Längsachse ergab wie erwartet die größten genotypspezifischen Unterschiede post-MI. Diese Ergebnisse wurden durch die Quantifizierung der prozentualen Verformung in der Längsachse verifiziert (Abbildung 65). Die longitudinale Verformungsrate und die Geschwindigkeit, sowie die radialen Werte dieser Parameter waren weniger charakteristisch verändert (Annex-Abbildung 9-19).

Auch das Ausmaß der krankhaften Herzmuskelfibrosierung war in den CMBK-KO nach I_{30}/R_{4wo} signifikant erhöht (Abbildung 68). Die vermehrte Produktion von interstitiellem Bindegewebe, die sich in den Tieren vier Wochen post-MI größtenteils in der Ausbildung von charakteristischem Narbengewebe äußerte, stellte vermutlich die Ursache für die verringerte Verformbarkeit der Herzen und die allgemein reduzierte Herzfunktion dar. So geht die Ausbildung von Fibrose, in dem am stärksten vom I/R-Schaden betroffenen Gewebe, mit einer ausgeprägten Beeinträchtigung der Funktion des betroffenen Organs einher. Trotz dieser Befunde zeigten sich 4 Wochen post-MI keine mitoBK-abhängigen signifikanten Verschlechterungen der Auswurffractionen sowie kein Unterschied im Überleben der Tiere (100 %). Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die mitoBK-Deletion weitere kardiale Dysfunktionen post-MI verursacht, die mit der nicht-invasiven Echokardiographie unentdeckt blieben. Die invasive Druck-Volumen-Messung würde hier über die Messung der Konduktanz, d.h. der Leitfähigkeit des Blutes, und damit der gleichzeitigen Bestimmung von Druck und Volumen direkt im linken Ventrikel den exakten Herzzyklus erfassen und somit vermutlich genauere Ergebnisse für die systolische und diastolische Pumpfunktion des linken Ventrikels liefern (Pacher et al. 2008, Kovacs et al. 2015). Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass mit den endsystolischen (ESPVR) und enddiastolischen Druck-Volumen-Beziehungen (EDPVR) Vorlast- und Nachlast-unabhängige Parameter ermittelt werden können (Pacher et al. 2008).

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen prinzipiell, dass der Myokardinfarkt im LCA-Modell langfristig zu einer Verminderung der Herzfunktion und zur Ausbildung von fibrotischem Narbengewebe führt. Mäuse mit einer Deletion des mitoBKs, die an verschiedenen akuten Protektionsmechanismen beteiligt ist, wiesen auch im chronischen Modell eine erhöhte Vulnerabilität und größere kardiale Dysfunktionen als ihre Wurfgeschwisterkontrollen auf. Ob die im Rahmen des akuten Myokardinfarktmodells in dieser Arbeit untersuchten kardioprotektiven Konditionierungsstimuli auch langfristig einen Benefit vermitteln, muss in zukünftigen Studien noch ermittelt werden.

5. Zusammenfassung

Das Vorliegen einer akut lebensbedrohlichen Situation und die hohe Inzidenz weltweit belegen die immense Bedeutung der Verbesserung von Strategien zur Behandlung des Myokardinfarkts. Insbesondere die Therapieoptionen zur Reduktion des Reperfusionsschadens, der bis zu 50 % des totalen Gewebeschadens ausmachen kann (Hausenloy and Yellon 2013), sind sehr limitiert. Ein vielversprechender Ansatz für eine Verringerung des I/R-Schadens im Tiermodell stellt neben den mechanischen Konditionierungen (iPre, iPost) eine pharmakologische Aktivierung des cGMP-abhängigen Signalweges dar (Salloum et al. 2009, Salloum et al. 2012, Methner et al. 2013b), wobei die zellulären und molekularen Mechanismen teilweise noch ungeklärt sind. Entsprechend zeigten erste Versuche die mechanischen und pharmakologischen Konditionierungen in die klinische Praxis umzusetzen nur wenig Erfolg (Freixa et al. 2012, Tarantini et al. 2012, Andersen et al. 2013, Hahn et al. 2013, Jones et al. 2015). Von einem besseren Verständnis der an den kardialen Schutzmechanismen beteiligten Moleküle und Signalwege verspricht sich die biomedizinische Forschung daher die Entwicklung von Therapieverbesserungen für Patienten mit ischämischen Herzerkrankungen. Kardiomyozytären Mitochondrien könnte als Schlüsselstrukturen der Signalkaskade eine besondere Bedeutung zukommen. Die massiven intramitochondrialen Anstiege von Ca^{2+} und ROS während der I/R fungieren als Trigger für die Initialisierung des Zelltodes, der über eine Öffnung der mPTP initiiert wird (Abbildung 77). Die Aktivierung mitochondrialer K^+ -Kanäle hatte in *ex-vivo*-Studien vielversprechende Auswirkungen auf eine Limitation des I/R-Schadens. Im Zuge der vorliegenden Dissertation konnte nun erstmals gezeigt werden, dass der **mitochondriale BK-Kanal auch *in vivo* eine bedeutende Rolle bei der Kardioprotektion** spielt. So präsentierten sich sowohl globale als auch Kardiomyozyten-, nicht aber Glattmuskelzell-spezifische BK-Knockoutmäuse mit einer signifikant erhöhten Vulnerabilität im akuten Myokardinfarktmodell. Die Zerstörung des kardialen Gewebes korrelierte mit erhöhten cTnI-Serumlevel und einer gesteigerten Apoptose. Da in dieser Studie auch gewebespezifische BK-Mausmutanten verwendet wurden, waren erstmalig Zelltyp-spezifische Aussagen zur Funktion der glattmuskulären und kardiomyozytären BK-Kanäle *in vivo* möglich. Zusätzlich zeigte sich, dass der in Kardiomyozyten exprimierte **mitoBK essentiell für die Kardioprotektion nach mechanischer Konditionierung** ist. Bislang wurde diese Wirkung primär dem mitoK_{ATP}-Kanal zugeschrieben (Garlid et al. 1997, Liu et al. 1998, Akao et al. 2001, Costa and Garlid 2008). Die eigenen Befunde implizieren jedoch, dass der mitoK_{ATP}-Kanal für die Kardioprotektion eher eine untergeordnete Rolle spielt. Die Bedeutung des mitoBKs konnte auch akut durch Blockade des BK-Kanals mit Paxilline (Abbildung 77) und einem damit verbundenen Anstieg der Infarktgröße untermauert werden. Diese modulierende

Wirkung auf das Infarktareal ließ sich nicht in mitoBK-Knockoutmäusen abbilden, was als Nachweis der Spezifität der Paxillinebehandlung für den endogenen BK-Kanal gewertet wird. Dass der kardiomyozytäre BK-Kanal letztlich ein interessantes pharmakologisches Arzneimitteltarget bei erfolgreicher Reperfusion darstellen könnte, implizieren I/R-Versuche in Gegenwart des BK-Kanalöffners NS11021 (Abbildung 77). Von der pharmakologischen Aktivierung des mitoBKs mittels NS11021 bei I/R ging in den getesteten Dosierungen (0,3 und 3,0 µM) eine starke Kardioprotektion aus, wohingegen die Infarktareale der Kardiomyozyten-spezifischen BK-Mausmutanten kaum NS11021-sensitiv waren. Da unter NS11021 (3,0 µM)-Behandlung jedoch eine genotypunabhängige Mortalität der Tiere beobachtet wurde, müssen diese Ergebnisse mit großer Vorsicht bewertet werden.

Letztlich konnte die eingangs aufgestellte Hypothese zur Rolle des mitoBKs als Effektormolekül des kardioprotektiven NO/cGMP/PKG I-Signalweges bestätigt werden (siehe auch 1.8). Durch die Aktivierung bzw. Stimulation der sGC mit Cinaciguat und Riociguat, sowie die Inhibition des (kardialen) cGMP-Abbaus mittels der PDE5-Hemmer Sildenafil und Tadalafil wurde die mitoBK-abhängige Kardioprotektion dieser cGMP-erhöhenden Substanzen bei I/R nachgewiesen (Abbildung 77). Die Infarktareale der kardiomyozytären BK-Kanalmutanten waren dagegen insensitiv für die pharmakologischen Prä- und Postkonditionierungen. Des Weiteren ließ sich nach alleiniger Blockade der NO-Synthase mittels L-NAME keine Bedeutung der endogenen NO-Produktion für die Kardioprotektion erkennen, wohingegen sowohl der mechanische Postkonditionierungsschutz als auch die Protektion durch Sildenafil (mitoBK- und) L-NAME sensitiv waren.

Tabelle 8: Übersicht der Infarktgrößenänderungen nach Konditionierungen in den CM-spezifischen KO
 Änderung der Infarktgrößen durch kardioprotektive Stimuli in den kardiomyozyten (CM)-spezifischen Knockouttieren der PKG I (Methner et al. 2013b), der sGC und des mitoBKs, sowie in den entsprechenden Kontrolltieren (CTR), die aufgrund ihres vergleichbaren Ansprechens zusammengefasst wurden.

CM-spezif. Deletion	I/R	I/R + <i>iPost</i>	I/R + <i>CIN</i>	I/R + <i>SIL</i>
PKG I [§]	0 [§]	↓ [§]	0 [§]	0 [§]
sGC	0	0	0	0
mitoBK	↑	(↓)	0	0
CTR		↓	↓	↓

CIN: Cinaciguat; *CTR*: CM-PKG I-, CMsGC- und CMBK-CTR; *iPost*: Postkonditionierung; *PKG I*: cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I; *sGC*: lösliche Guanylatzyklase; *SIL*: Sildenafil.

[§]Daten zum CM-PKG I-Modell nach Methner et al. 2013b.

Eine Übersicht zu einem Teil der im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten zu den Infarktgrößen der Kardiomyozyten-spezifischen mitoBK- und sGC-Knockoutmäusen sowie der bereits publizierten Daten der CM-PKG I-Mausmutanten (Methner et al. 2013b)

ist in Tabelle 8 dargestellt. Interessanterweise scheint die Stimulation des NO/cGMP/PKG I-Signalweges durch die konditionierenden Stimuli essentiell für die Vermittlung des Infarktgrößen-reduzierenden Effekts dieser Signalkomponenten zu sein. Weder die bereits beschriebene pharmakologische NOS-Blockade noch eine Kardiomyozyten-spezifische Deletion der sGC führte dementsprechend zu einer erhöhten Vulnerabilität des Herzmuskels. Diese Befunde stehen im klaren Kontrast zur Bedeutung des mitoBKs bei I/R ohne konditionierende Intervention. Unter diesen Bedingungen muss die Öffnung des mitoBKs zum Schutz des Herzens demnach unabhängig vom kardiomyozytären cGMP-Signalweg über bislang noch nicht identifizierte Mechanismen (eventuell RISK-Signalweg) erfolgen. Die Schutzeffekte des sGC-Aktivators Cinaciguat als auch der PDE5-Inhibitoren Sildenafil und Tadalafil waren von der kardiomyozytären sGC abhängig. Dass der schützende Einfluss der PDE5-Inhibitoren neben dem mitoBK auch die kardiomyozytäre sGC benötigt, obwohl diese *upstream* in der Signalkaskade lokalisiert ist, lässt die Involvierung weiterer Zelltypen vermuten und spiegelt damit die Komplexität der Signaltransduktion wider.

Neben den akuten Auswirkungen eines Myokardinfarkts, wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmals die Langzeitfolgen einer mitoBK-Deletion auf das ischämische Herz studiert. Diese Daten implizierten, dass CMBK-KO nicht nur akut eine erhöhte Infarktgröße aufweisen, sondern auch 4 Wochen post-MI unter kardialer Dysfunktion und massiver Fibrosierung leiden. Dass mitoBK-Kanäle kardiovaskuläre Funktionsparameter beeinflussen, zeigten bereits die verschlechterte Herzfunktion und der leicht reduzierte Blutdruck unter basalen Bedingungen. Zusammengenommen deuten diese Befunde sowie die Studien von Soltysinska et al. 2014 auf ein intrinsisches kardiales Problem hin, das durch eine Fehlfunktion oder Schädigung der mitochondrialen ATP-Generierung nach mitoBK-Ablation verursacht wird und zu einer reduzierten Pumpfunktion des Herzens führt.

Zusammenfassend hat die vorliegende Studie gezeigt, dass sowohl der mitochondriale Ca^{2+} - und spannungsabhängige BK-Kanal (mitoBK) als auch die kardiomyozytäre sGC wichtige Komponenten des kardioprotektiven NO/cGMP/PKG I-Signalweges im akuten Myokardinfarkt darstellen. Des Weiteren deuten die reduzierte Herzfunktion und die Hypotonie der mitoBK-defizienten Mäuse auf eine wichtige Funktion der mitoBK-Kanäle im kardialen Energiestoffwechsel hin.

Im Hinblick auf die klinische Relevanz der vorliegenden Studie lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt feststellen, dass eine gezielte Öffnung des mitoBKs mittels pharmakologischer Ansätze den akuten I/R-Schaden verringern könnte, was langfristig in einer Verbesserung der Herzfunktion von post-MI Patienten resultieren müsste. Die Identifizierung und

Optimierung innovativer Wirkstoffe zur spezifischen Modulation des potentiellen Arzneimitteltargets mitoBK ist aufgrund der ungünstigen pharmakokinetischen Eigenschaften sowie der geringen therapeutischen Breite des bereits verfügbaren BK-Kanalöffners NS11021 jedoch dringend geboten.

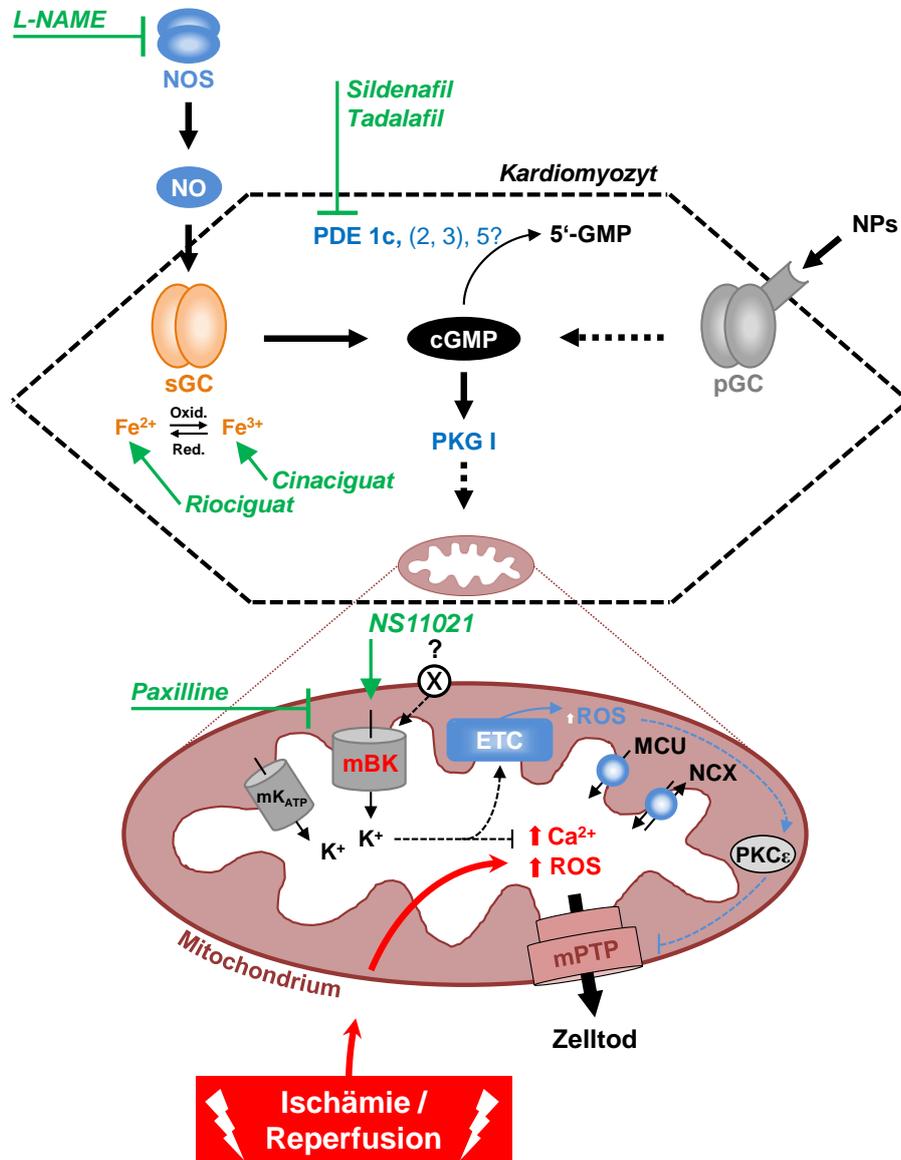


Abbildung 77: Übersicht des cGMP-Signalweges und der untersuchten Pharmaka in Kardiomyozyten

Die pharmakologische Aktivierung des NO/cGMP/PKG I-Signalweges führt zur Öffnung des mitoBKs. Hierbei spielen möglicherweise direkte sowie indirekte Effekte eine Rolle. Der mitochondriale K⁺-Einstrom reduziert letztlich die durch I/R vermittelte Ca²⁺-Überladung und massive ROS-Generierung (weitere Erläuterungen im Text). 5'-GMP: Guanosin-5'-monophosphat; cGMP: zyklisches Guanosin 3',5'-monophosphat; NOS: NO-Synthase; ETC: Elektronentransportkette; MCU: mitochondrialer Ca²⁺-Uniporter; mBK: mitoBK; mK_{ATP}: mitochondrialer, ATP-abhängiger K⁺-Kanal; mPTP: mitochondriale Permeabilitäts-Transitionspore; NCX: Na⁺/Ca²⁺-Austauscher; NO: Stickstoffmonoxid; NPs: natriuretische Peptide; pGC: membranständige Guanylatzyklase; PKC_ε: Proteinkinase C epsilon; PKG I: cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I; ROS: reaktive Sauerstoffspezies; sGC: lösliche Guanylatzyklase.

6. Literaturverzeichnis

- Abdallah, Y., Gkatzoflia, A., Pieper, H., Zoga, E., et al. (2005). "Mechanism of cGMP-mediated protection in a cellular model of myocardial reperfusion injury." Cardiovasc Res **66**(1): 123-131.
- Adelman, J. P., Shen, K. Z., Kavanaugh, M. P., Warren, R. A., et al. (1992). "Calcium-activated potassium channels expressed from cloned complementary DNAs." Neuron **9**(2): 209-216.
- Agah, R., Frenkel, P. A., French, B. A., Michael, L. H., et al. (1997). "Gene recombination in postmitotic cells. Targeted expression of Cre recombinase provokes cardiac-restricted, site-specific rearrangement in adult ventricular muscle in vivo." J Clin Invest **100**(1): 169-179.
- Ahluwalia, J., Tinker, A., Clapp, L. H., Duchon, M. R., et al. (2004). "The large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel is essential for innate immunity." Nature **427**(6977): 853-858.
- Ahmad, N., Wang, Y., Haider, K. H., Wang, B., et al. (2006). "Cardiac protection by mitoKATP channels is dependent on Akt translocation from cytosol to mitochondria during late preconditioning." Am J Physiol Heart Circ Physiol **290**(6): H2402-2408.
- Akao, M., Ohler, A., O'Rourke, B. and Marban, E. (2001). "Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels inhibit apoptosis induced by oxidative stress in cardiac cells." Circ Res **88**(12): 1267-1275.
- Alavian, K. N., Beutner, G., Lazrove, E., Sacchetti, S., et al. (2014). "An uncoupling channel within the c-subunit ring of the F1FO ATP synthase is the mitochondrial permeability transition pore." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(29): 10580-10585.
- Andelova, E., Bartekova, M., Pancza, D., Styk, J., et al. (2005). "The role of NO in ischemia/reperfusion injury in isolated rat heart." Gen Physiol Biophys **24**(4): 411-426.
- Andersen, M. J., Ersboll, M., Axelsson, A., Gustafsson, F., et al. (2013). "Sildenafil and diastolic dysfunction after acute myocardial infarction in patients with preserved ejection fraction: the Sildenafil and Diastolic Dysfunction After Acute Myocardial Infarction (SIDAMI) trial." Circulation **127**(11): 1200-1208.
- Andrukhiv, A., Costa, A. D., West, I. C. and Garlid, K. D. (2006). "Opening mitoKATP increases superoxide generation from complex I of the electron transport chain." Am J Physiol Heart Circ Physiol **291**(5): H2067-2074.
- Aon, M. A., Cortassa, S., Wei, A. C., Grunnet, M., et al. (2010). "Energetic performance is improved by specific activation of K⁺ fluxes through K(Ca) channels in heart mitochondria." Biochim Biophys Acta **1797**(1): 71-80.
- Argaud, L., Gateau-Roesch, O., Raïsky, O., Loufouat, J., et al. (2005). "Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition." Circulation **111**(2): 194-197.
- Arnold, W. P., Mittal, C. K., Katsuki, S. and Murad, F. (1977). "Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(8): 3203-3207.
- Ashman, D. F., Lipton, R., Melicow, M. M. and Price, T. D. (1963). "Isolation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate from rat urine." Biochem Biophys Res Commun **11**: 330-334.
- Backstrom, T., Goïny, M., Lockowandt, U., Liska, J., et al. (2003). "Cardiac outflow of amino acids and purines during myocardial ischemia and reperfusion." J Appl Physiol (1985) **94**(3): 1122-1128.
- Balderas, E., Zhang, J., Stefani, E. and Toro, L. (2015). "Mitochondrial BKCa channel." Front Physiol **6**: 104.
- Barrabes, J. A., Garcia-Dorado, D., Ruiz-Meana, M., Piper, H. M., et al. (1996). "Myocardial segment shrinkage during coronary reperfusion in situ. Relation to hypercontracture and myocardial necrosis." Pflugers Arch **431**(4): 519-526.
- Barrett, J. N., Magleby, K. L. and Pallotta, B. S. (1982). "Properties of single calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle." J Physiol **331**: 211-230.
- Bartling, B., Holtz, J. and Darmer, D. (1998). "Contribution of myocyte apoptosis to myocardial infarction?" Basic Res Cardiol **93**(2): 71-84.

- Bauer, M., Cheng, S., Jain, M., Ngoy, S., et al. (2011). "Echocardiographic speckle-tracking based strain imaging for rapid cardiovascular phenotyping in mice." *Circ Res* **108**(8): 908-916.
- Bauer, M., Cheng, S., Unno, K., Lin, F. C., et al. (2013). "Regional cardiac dysfunction and dyssynchrony in a murine model of afterload stress." *PLoS One* **8**(4): e59915.
- Bayir, H. and Kagan, V. E. (2008). "Bench-to-bedside review: Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis--there is nothing more practical than a good theory." *Crit Care* **12**(1): 206.
- Bednarczyk, P., Koziel, A., Jarmuszkiewicz, W. and Szewczyk, A. (2013). "Large-conductance Ca²⁺(+)-activated potassium channel in mitochondria of endothelial EA.hy926 cells." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **304**(11): H1415-1427.
- Behnenburg, F., Dorsch, M., Huhn, R., Mally, D., et al. (2015). "Impact of Mitochondrial Ca²⁺-Sensitive Potassium (mBKCa) Channels in Sildenafil-Induced Cardioprotection in Rats." *PLoS One* **10**(12): e0144737.
- Bender, A. T. and Beavo, J. A. (2006). "Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use." *Pharmacol Rev* **58**(3): 488-520.
- Bentzen, B. H., Nardi, A., Calloe, K., Madsen, L. S., et al. (2007). "The small molecule NS11021 is a potent and specific activator of Ca²⁺-activated big-conductance K⁺ channels." *Mol Pharmacol* **72**(4): 1033-1044.
- Bentzen, B. H., Osadchii, O., Jespersen, T., Hansen, R. S., et al. (2009). "Activation of big conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels (BK) protects the heart against ischemia-reperfusion injury." *Pflugers Arch* **457**(5): 979-988.
- Bernardi, P., Krauskopf, A., Basso, E., Petronilli, V., et al. (2006). "The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target." *FEBS J* **273**(10): 2077-2099.
- Bibli, S. I., Andreadou, I., Chatzianastasiou, A., Tzimas, C., et al. (2015). "Cardioprotection by H₂S engages a cGMP-dependent protein kinase G/phospholamban pathway." *Cardiovasc Res* **106**(3): 432-442.
- Bice, J. S., Keim, Y., Stasch, J. P. and Baxter, G. F. (2014). "NO-independent stimulation or activation of soluble guanylyl cyclase during early reperfusion limits infarct size." *Cardiovasc Res* **101**(2): 220-228.
- Bilmen, J. G., Wootton, L. L. and Michelangeli, F. (2002). "The mechanism of inhibition of the sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase by paxilline." *Arch Biochem Biophys* **406**(1): 55-64.
- Blatz, A. L. and Magleby, K. L. (1986). "Single apamin-blocked Ca-activated K⁺ channels of small conductance in cultured rat skeletal muscle." *Nature* **323**(6090): 718-720.
- Boengler, K., Buechert, A., Heinen, Y., Roeskes, C., et al. (2008). "Cardioprotection by ischemic postconditioning is lost in aged and STAT3-deficient mice." *Circ Res* **102**(1): 131-135.
- Boengler, K., Hilfiker-Kleiner, D., Heusch, G. and Schulz, R. (2010). "Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion." *Basic Res Cardiol* **105**(6): 771-785.
- Boerrigter, G., Lapp, H. and Burnett, J. C. (2009). "Modulation of cGMP in heart failure: a new therapeutic paradigm." *Handb Exp Pharmacol*(191): 485-506.
- Bolli, R. (2000). "The late phase of preconditioning." *Circ Res* **87**(11): 972-983.
- Bolli, R. (2007). "Preconditioning: a paradigm shift in the biology of myocardial ischemia." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**(1): H19-27.
- Bonfoco, E., Krainc, D., Ankarcona, M., Nicotera, P., et al. (1995). "Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(16): 7162-7166.
- Boon, E. M. and Marletta, M. A. (2005). "Ligand specificity of H-NOX domains: from sGC to bacterial NO sensors." *J Inorg Biochem* **99**(4): 892-902.
- Bopassa, J. C., Ferrera, R., Gateau-Roesch, O., Couture-Lepetit, E., et al. (2006). "PI 3-kinase regulates the mitochondrial transition pore in controlled reperfusion and postconditioning." *Cardiovasc Res* **69**(1): 178-185.
- Borchert, G. H., Yang, C. and Kolar, F. (2011). "Mitochondrial BKCa channels contribute to protection of cardiomyocytes isolated from chronically hypoxic rats." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **300**(2): H507-513.

- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Budworth, J., Meillerais, S., Charles, I. and Powell, K. (1999). "Tissue distribution of the human soluble guanylate cyclases." *Biochem Biophys Res Commun* **263**(3): 696-701.
- Burley, D. S. and Baxter, G. F. (2007). "B-type natriuretic peptide at early reperfusion limits infarct size in the rat isolated heart." *Basic Res Cardiol* **102**(6): 529-541.
- Burney, S., Caulfield, J. L., Niles, J. C., Wishnok, J. S., et al. (1999). "The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite." *Mutat Res* **424**(1-2): 37-49.
- Burwell, L. S. and Brookes, P. S. (2008). "Mitochondria as a target for the cardioprotective effects of nitric oxide in ischemia-reperfusion injury." *Antioxid Redox Signal* **10**(3): 579-599.
- Buys, E. S., Sips, P., Vermeersch, P., Raher, M. J., et al. (2008). "Gender-specific hypertension and responsiveness to nitric oxide in sGCalpha1 knockout mice." *Cardiovasc Res* **79**(1): 179-186.
- Cancherini, D. V., Queliconi, B. B. and Kowaltowski, A. J. (2007). "Pharmacological and physiological stimuli do not promote Ca(2+)-sensitive K⁺ channel activity in isolated heart mitochondria." *Cardiovasc Res* **73**(4): 720-728.
- Candas, D. and Li, J. J. (2014). "MnSOD in oxidative stress response-potential regulation via mitochondrial protein influx." *Antioxid Redox Signal* **20**(10): 1599-1617.
- Cao, C. M., Xia, Q., Gao, Q., Chen, M., et al. (2005). "Calcium-activated potassium channel triggers cardioprotection of ischemic preconditioning." *J Pharmacol Exp Ther* **312**(2): 644-650.
- Castro, L. R., Verde, I., Cooper, D. M. and Fischmeister, R. (2006). "Cyclic guanosine monophosphate compartmentation in rat cardiac myocytes." *Circulation* **113**(18): 2221-2228.
- Champion, H. C., Georgakopoulos, D., Takimoto, E., Isoda, T., et al. (2004). "Modulation of in vivo cardiac function by myocyte-specific nitric oxide synthase-3." *Circ Res* **94**(5): 657-663.
- Chen, L., Tian, L., MacDonald, S. H., McClafferty, H., et al. (2005). "Functionally diverse complement of large conductance calcium- and voltage-activated potassium channel (BK) alpha-subunits generated from a single site of splicing." *J Biol Chem* **280**(39): 33599-33609.
- Chen, Z., Siu, B., Ho, Y. S., Vincent, R., et al. (1998). "Overexpression of MnSOD protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice." *J Mol Cell Cardiol* **30**(11): 2281-2289.
- Cheng, Y., Gu, X. Q., Bednarczyk, P., Wiedemann, F. R., et al. (2008). "Hypoxia increases activity of the BK-channel in the inner mitochondrial membrane and reduces activity of the permeability transition pore." *Cell Physiol Biochem* **22**(1-4): 127-136.
- Cheng, Y., Gulbins, E. and Siemen, D. (2011). "Activation of the permeability transition pore by Bax via inhibition of the mitochondrial BK channel." *Cell Physiol Biochem* **27**(3-4): 191-200.
- Chirkov, Y. Y. and Horowitz, J. D. (2007). "Impaired tissue responsiveness to organic nitrates and nitric oxide: a new therapeutic frontier?" *Pharmacol Ther* **116**(2): 287-305.
- Chouchani, E. T., Pell, V. R., Gaude, E., Aksentijevic, D., et al. (2014). "Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS." *Nature* **515**(7527): 431-435.
- Chouchani, E. T., Pell, V. R., James, A. M., Work, L. M., et al. (2016). "A Unifying Mechanism for Mitochondrial Superoxide Production during Ischemia-Reperfusion Injury." *Cell Metab* **23**(2): 254-263.
- Chung, Y. W., Lagranha, C., Chen, Y., Sun, J., et al. (2015). "Targeted disruption of PDE3B, but not PDE3A, protects murine heart from ischemia/reperfusion injury." *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**(17): E2253-2262.
- Clements, R. T., Terentyev, D. and Sellke, F. W. (2015). "Ca(2+)-activated K(+) channels as therapeutic targets for myocardial and vascular protection." *Circ J* **79**(3): 455-462.
- Cocheme, H. M., Quin, C., McQuaker, S. J., Cabreiro, F., et al. (2011). "Measurement of H₂O₂ within living *Drosophila* during aging using a ratiometric mass spectrometry probe targeted to the mitochondrial matrix." *Cell Metab* **13**(3): 340-350.
- Cohen, M. V., Yang, X. M. and Downey, J. M. (2007). "The pH hypothesis of postconditioning: staccato reperfusion reintroduces oxygen and perpetuates myocardial acidosis." *Circulation* **115**(14): 1895-1903.

- Cohen, M. V., Yang, X. M., Liu, G. S., Heusch, G., et al. (2001). "Acetylcholine, bradykinin, opioids, and phenylephrine, but not adenosine, trigger preconditioning by generating free radicals and opening mitochondrial K(ATP) channels." *Circ Res* **89**(3): 273-278.
- Conti, M. and Beavo, J. (2007). "Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling." *Annu Rev Biochem* **76**: 481-511.
- Cordeiro, B., Shinn, C., Sellke, F. W. and Clements, R. T. (2015a). "Rottlerin-induced BKCa channel activation impairs specific contractile responses and promotes vasodilation." *Ann Thorac Surg* **99**(2): 626-634.
- Cordeiro, B., Terentyev, D. and Clements, R. T. (2015b). "BKCa channel activation increases cardiac contractile recovery following hypothermic ischemia/reperfusion." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **309**(4): H625-633.
- Costa, A. D. and Garlid, K. D. (2008). "Intramitochondrial signaling: interactions among mitoKATP, PKCepsilon, ROS, and MPT." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **295**(2): H874-882.
- Costa, A. D., Garlid, K. D., West, I. C., Lincoln, T. M., et al. (2005). "Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria." *Circ Res* **97**(4): 329-336.
- Costa, A. D., Pierre, S. V., Cohen, M. V., Downey, J. M., et al. (2008). "cGMP signalling in pre- and post-conditioning: the role of mitochondria." *Cardiovasc Res* **77**(2): 344-352.
- Costa, A. D., Quinlan, C. L., Andrukhiv, A., West, I. C., et al. (2006). "The direct physiological effects of mitoK(ATP) opening on heart mitochondria." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**(1): H406-415.
- Cottrell, C. and Kirkpatrick, J. N. (2010). "Echocardiographic strain imaging and its use in the clinical setting." *Expert Rev Cardiovasc Ther* **8**(1): 93-102.
- Crapo, J. D., Oury, T., Rabouille, C., Slot, J. W., et al. (1992). "Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(21): 10405-10409.
- Cucherat, M., Bonnefoy, E. and Tremeau, G. (2003). "Primary angioplasty versus intravenous thrombolysis for acute myocardial infarction." *Cochrane Database Syst Rev*(3): CD001560.
- D'Souza, S. P., Yellon, D. M., Martin, C., Schulz, R., et al. (2003). "B-type natriuretic peptide limits infarct size in rat isolated hearts via KATP channel opening." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**(5): H1592-1600.
- Das, A., Salloum, F. N., Xi, L., Rao, Y. J., et al. (2009). "ERK phosphorylation mediates sildenafil-induced myocardial protection against ischemia-reperfusion injury in mice." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **296**(5): H1236-1243.
- Das, A., Smolenski, A., Lohmann, S. M. and Kukreja, R. C. (2006). "Cyclic GMP-dependent protein kinase alpha attenuates necrosis and apoptosis following ischemia/reoxygenation in adult cardiomyocyte." *J Biol Chem* **281**(50): 38644-38652.
- Das, A., Xi, L. and Kukreja, R. C. (2005). "Phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil preconditions adult cardiac myocytes against necrosis and apoptosis. Essential role of nitric oxide signaling." *J Biol Chem* **280**(13): 12944-12955.
- Davis, K. L., Martin, E., Turko, I. V. and Murad, F. (2001). "Novel effects of nitric oxide." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**: 203-236.
- Dawn, B. (2006). "Preconditioning by angiotensin II: a tale of more than two kinases." *J Mol Cell Cardiol* **41**(2): 223-225.
- de Bold, A. J., Ma, K. K., Zhang, Y., de Bold, M. L., et al. (2001). "The physiological and pathophysiological modulation of the endocrine function of the heart." *Can J Physiol Pharmacol* **79**(8): 705-714.
- De Heer, E., Sijpkens, Y. W., Verkade, M., den Dulk, M., et al. (2000). "Morphometry of interstitial fibrosis." *Nephrol Dial Transplant* **15 Suppl 6**: 72-73.
- Degerman, E., Belfrage, P. and Manganiello, V. C. (1997). "Structure, localization, and regulation of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3)." *J Biol Chem* **272**(11): 6823-6826.
- Denninger, J. W. and Marletta, M. A. (1999). "Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway." *Biochim Biophys Acta* **1411**(2-3): 334-350.

- Dennis, S. C., Gevers, W. and Opie, L. H. (1991). "Protons in ischemia: where do they come from; where do they go to?" J Mol Cell Cardiol **23**(9): 1077-1086.
- Derbyshire, E. R. and Marletta, M. A. (2012). "Structure and regulation of soluble guanylate cyclase." Annu Rev Biochem **81**: 533-559.
- Dhalla, N. S., Elmoselhi, A. B., Hata, T. and Makino, N. (2000). "Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury." Cardiovasc Res **47**(3): 446-456.
- Di Lisa, F., Canton, M., Menabo, R., Kaludercic, N., et al. (2007). "Mitochondria and cardioprotection." Heart Fail Rev **12**(3-4): 249-260.
- Diaz, L., Meera, P., Amigo, J., Stefani, E., et al. (1998). "Role of the S4 segment in a voltage-dependent calcium-sensitive potassium (hSlo) channel." J Biol Chem **273**(49): 32430-32436.
- Dick, G. M., Rossow, C. F., Smirnov, S., Horowitz, B., et al. (2001). "Tamoxifen activates smooth muscle BK channels through the regulatory beta 1 subunit." J Biol Chem **276**(37): 34594-34599.
- Dickinson, B. C. and Chang, C. J. (2008). "A targetable fluorescent probe for imaging hydrogen peroxide in the mitochondria of living cells." J Am Chem Soc **130**(30): 9638-9639.
- DiFrancesco, D. and Mangoni, M. (1994). "Modulation of single hyperpolarization-activated channels (i(f)) by cAMP in the rabbit sino-atrial node." J Physiol **474**(3): 473-482.
- Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., et al. (1999). "Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation." Nature **399**(6736): 601-605.
- Doskeland, S. O., Ogreid, D., Ekanger, R., Sturm, P. A., et al. (1983). "Mapping of the two intrachain cyclic nucleotide binding sites of adenosine cyclic 3',5'-phosphate dependent protein kinase I." Biochemistry **22**(5): 1094-1101.
- Douglas, R. M., Lai, J. C., Bian, S., Cummins, L., et al. (2006). "The calcium-sensitive large-conductance potassium channel (BK/MAXI K) is present in the inner mitochondrial membrane of rat brain." Neuroscience **139**(4): 1249-1261.
- Downey, J. M., Davis, A. M. and Cohen, M. V. (2007). "Signaling pathways in ischemic preconditioning." Heart Fail Rev **12**(3-4): 181-188.
- Du, W., Bautista, J. F., Yang, H., Diez-Sampedro, A., et al. (2005). "Calcium-sensitive potassium channelopathy in human epilepsy and paroxysmal movement disorder." Nat Genet **37**(7): 733-738.
- Duranski, M. R., Greer, J. J., Dejam, A., Jaganmohan, S., et al. (2005). "Cytoprotective effects of nitrite during in vivo ischemia-reperfusion of the heart and liver." J Clin Invest **115**(5): 1232-1240.
- Eckle, T., Grenz, A., Kohler, D., Redel, A., et al. (2006). "Systematic evaluation of a novel model for cardiac ischemic preconditioning in mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol **291**(5): H2533-2540.
- Edalat, L., Stegen, B., Klumpp, L., Haehl, E., et al. (2016). "BK K⁺ channel blockade inhibits radiation-induced migration/brain infiltration of glioblastoma cells." Oncotarget **7**(12): 14259-14278.
- Edwards, G., Niederste-Hollenberg, A., Schneider, J., Noack, T., et al. (1994). "Ion channel modulation by NS 1619, the putative BKCa channel opener, in vascular smooth muscle." Br J Pharmacol **113**(4): 1538-1547.
- el-Husseini, A. E., Bladen, C. and Vincent, S. R. (1995). "Molecular characterization of a type II cyclic GMP-dependent protein kinase expressed in the rat brain." J Neurochem **64**(6): 2814-2817.
- Elrod, J. W., Calvert, J. W., Morrison, J., Doeller, J. E., et al. (2007). "Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(39): 15560-15565.
- Erusalimsky, J. D. and Moncada, S. (2007). "Nitric oxide and mitochondrial signaling: from physiology to pathophysiology." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(12): 2524-2531.
- Feil, S., Zimmermann, P., Knorn, A., Brummer, S., et al. (2005). "Distribution of cGMP-dependent protein kinase type I and its isoforms in the mouse brain and retina." Neuroscience **135**(3): 863-868.
- Ferdinandy, P., Schulz, R. and Baxter, G. F. (2007). "Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning." Pharmacol Rev **59**(4): 418-458.

- Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J. and Zeller, R. (2008). "Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections." *CSH Protoc* **2008**: pdb prot4986.
- Fischmeister, R., Castro, L. R., Abi-Gerges, A., Rochais, F., et al. (2006). "Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of cyclic nucleotide phosphodiesterases." *Circ Res* **99**(8): 816-828.
- Fliss, H. and Gattinger, D. (1996). "Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium." *Circ Res* **79**(5): 949-956.
- Fraccarollo, D., Galuppo, P., Motschenbacher, S., Ruetten, H., et al. (2014). "Soluble guanylyl cyclase activation improves progressive cardiac remodeling and failure after myocardial infarction. Cardioprotection over ACE inhibition." *Basic Res Cardiol* **109**(4): 421.
- Frantz, S., Klaiber, M., Baba, H. A., Oberwinkler, H., et al. (2013). "Stress-dependent dilated cardiomyopathy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of cyclic GMP-dependent protein kinase I." *Eur Heart J* **34**(16): 1233-1244.
- Freixa, X., Bellera, N., Ortiz-Perez, J. T., Jimenez, M., et al. (2012). "Ischaemic postconditioning revisited: lack of effects on infarct size following primary percutaneous coronary intervention." *Eur Heart J* **33**(1): 103-112.
- Frelin, C., Vigne, P. and Lazdunski, M. (1985). "The role of the Na⁺/H⁺ exchange system in the regulation of the internal pH in cultured cardiac cells." *Eur J Biochem* **149**(1): 1-4.
- French, P. J., Bijman, J., Edixhoven, M., Vaandrager, A. B., et al. (1995). "Isotype-specific activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-chloride channels by cGMP-dependent protein kinase II." *J Biol Chem* **270**(44): 26626-26631.
- Friebe, A., Mergia, E., Dangel, O., Lange, A., et al. (2007). "Fatal gastrointestinal obstruction and hypertension in mice lacking nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(18): 7699-7704.
- Friebe, A., Schultz, G. and Koesling, D. (1996). "Sensitizing soluble guanylyl cyclase to become a highly CO-sensitive enzyme." *EMBO J* **15**(24): 6863-6868.
- Fryer, R. M., Eells, J. T., Hsu, A. K., Henry, M. M., et al. (2000). "Ischemic preconditioning in rats: role of mitochondrial K(ATP) channel in preservation of mitochondrial function." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**(1): H305-312.
- Fujita, M., Minamino, T., Asanuma, H., Sanada, S., et al. (2005). "Aldosterone nongenomically worsens ischemia via protein kinase C-dependent pathways in hypoperfused canine hearts." *Hypertension* **46**(1): 113-117.
- Galie, N., Humbert, M., Vachiery, J. L., Gibbs, S., et al. (2016). "2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT)." *Eur Heart J* **37**(1): 67-119.
- Gamm, D. M., Francis, S. H., Angelotti, T. P., Corbin, J. D., et al. (1995). "The type II isoform of cGMP-dependent protein kinase is dimeric and possesses regulatory and catalytic properties distinct from the type I isoforms." *J Biol Chem* **270**(45): 27380-27388.
- Gao, Q., Zhang, S. Z., Cao, C. M., Bruce, I. C., et al. (2005). "The mitochondrial permeability transition pore and the Ca²⁺-activated K⁺ channel contribute to the cardioprotection conferred by tumor necrosis factor- α ." *Cytokine* **32**(5): 199-205.
- Garbers, D. L. and Lowe, D. G. (1994). "Guanylyl cyclase receptors." *J Biol Chem* **269**(49): 30741-30744.
- Garcia-Dorado, D. (2004). "Myocardial reperfusion injury: a new view." *Cardiovasc Res* **61**(3): 363-364.
- Garcia-Dorado, D. and Oliveras, J. (1993). "Myocardial oedema: a preventable cause of reperfusion injury?" *Cardiovasc Res* **27**(9): 1555-1563.
- Garcia-Dorado, D. and Piper, H. M. (2006). "Postconditioning: reperfusion of "reperfusion injury" after hibernation." *Cardiovasc Res* **69**(1): 1-3.
- Garcia-Dorado, D., Theroux, P., Munoz, R., Alonso, J., et al. (1992). "Favorable effects of hyperosmotic reperfusion on myocardial edema and infarct size." *Am J Physiol* **262**(1 Pt 2): H17-22.

- Garlid, K. D. and Halestrap, A. P. (2012). "The mitochondrial K(ATP) channel--fact or fiction?" J Mol Cell Cardiol **52**(3): 578-583.
- Garlid, K. D., Paucek, P., Yarov-Yarovoy, V., Murray, H. N., et al. (1997). "Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of cardioprotection." Circ Res **81**(6): 1072-1082.
- Geiselhoringer, A., Gaisa, M., Hofmann, F. and Schlossmann, J. (2004). "Distribution of IRAG and cGKI-isoforms in murine tissues." FEBS Lett **575**(1-3): 19-22.
- Gessner, G., Cui, Y. M., Otani, Y., Ohwada, T., et al. (2012). "Molecular mechanism of pharmacological activation of BK channels." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(9): 3552-3557.
- Ghofrani, H. A., D'Armini, A. M., Grimminger, F., Hoepfer, M. M., et al. (2013a). "Riociguat for the treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension." N Engl J Med **369**(4): 319-329.
- Ghofrani, H. A., Galie, N., Grimminger, F., Grunig, E., et al. (2013b). "Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension." N Engl J Med **369**(4): 330-340.
- Giorgio, V., von Stockum, S., Antoniel, M., Fabbro, A., et al. (2013). "Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(15): 5887-5892.
- Gircz, Z., Gorbe, A., Pipis, J., Burley, D. S., et al. (2009). "Hyperlipidaemia induced by a high-cholesterol diet leads to the deterioration of guanosine-3',5'-cyclic monophosphate/protein kinase G-dependent cardioprotection in rats." Br J Pharmacol **158**(6): 1495-1502.
- Godecke, A., Heinicke, T., Kamkin, A., Kiseleva, I., et al. (2001). "Inotropic response to beta-adrenergic receptor stimulation and anti-adrenergic effect of ACh in endothelial NO synthase-deficient mouse hearts." J Physiol **532**(Pt 1): 195-204.
- Gollasch, M., Tank, J., Luft, F. C., Jordan, J., et al. (2002). "The BK channel beta1 subunit gene is associated with human baroreflex and blood pressure regulation." J Hypertens **20**(5): 927-933.
- Gotz, K. R., Sprenger, J. U., Perera, R. K., Steinbrecher, J. H., et al. (2014). "Transgenic mice for real-time visualization of cGMP in intact adult cardiomyocytes." Circ Res **114**(8): 1235-1245.
- Granger, D. N. and Kvietys, P. R. (2015). "Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept." Redox Biol **6**: 524-551.
- Gray, M. O., Karliner, J. S. and Mochly-Rosen, D. (1997). "A selective epsilon-protein kinase C antagonist inhibits protection of cardiac myocytes from hypoxia-induced cell death." J Biol Chem **272**(49): 30945-30951.
- Grinstein, S., Woodside, M., Sardet, C., Pouyssegur, J., et al. (1992). "Activation of the Na⁺/H⁺ antiporter during cell volume regulation. Evidence for a phosphorylation-independent mechanism." J Biol Chem **267**(33): 23823-23828.
- Groneberg, D., Konig, P., Wirth, A., Offermanns, S., et al. (2010). "Smooth muscle-specific deletion of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is sufficient to induce hypertension in mice." Circulation **121**(3): 401-409.
- Gross, E. R., Hsu, A. K. and Gross, G. J. (2004). "Opioid-induced cardioprotection occurs via glycogen synthase kinase beta inhibition during reperfusion in intact rat hearts." Circ Res **94**(7): 960-966.
- Gu, X. Q., Siemen, D., Parvez, S., Cheng, Y., et al. (2007). "Hypoxia increases BK channel activity in the inner mitochondrial membrane." Biochem Biophys Res Commun **358**(1): 311-316.
- Gumina, R. J., Pucar, D., Bast, P., Hodgson, D. M., et al. (2003). "Knockout of Kir6.2 negates ischemic preconditioning-induced protection of myocardial energetics." Am J Physiol Heart Circ Physiol **284**(6): H2106-2113.
- Guo, Y., Flaherty, M. P., Wu, W. J., Tan, W., et al. (2012). "Genetic background, gender, age, body temperature, and arterial blood pH have a major impact on myocardial infarct size in the mouse and need to be carefully measured and/or taken into account: results of a comprehensive analysis of determinants of infarct size in 1,074 mice." Basic Res Cardiol **107**(5): 288.
- Hahn, J. Y., Song, Y. B., Kim, E. K., Yu, C. W., et al. (2013). "Ischemic postconditioning during primary percutaneous coronary intervention: the effects of postconditioning on myocardial reperfusion in patients with ST-segment elevation myocardial infarction (POST) randomized trial." Circulation **128**(17): 1889-1896.

- Halestrap, A. P. and Brenner, C. (2003). "The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death." *Curr Med Chem* **10**(16): 1507-1525.
- Han, X., Kobzik, L., Balligand, J. L., Kelly, R. A., et al. (1996). "Nitric oxide synthase (NOS3)-mediated cholinergic modulation of Ca²⁺ current in adult rabbit atrioventricular nodal cells." *Circ Res* **78**(6): 998-1008.
- Handy, D. E. and Loscalzo, J. (2006). "Nitric oxide and posttranslational modification of the vascular proteome: S-nitrosation of reactive thiols." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**(6): 1207-1214.
- Hanley, P. J. and Daut, J. (2005). "K(ATP) channels and preconditioning: a re-examination of the role of mitochondrial K(ATP) channels and an overview of alternative mechanisms." *J Mol Cell Cardiol* **39**(1): 17-50.
- Harada, M., Qin, Y., Takano, H., Minamino, T., et al. (2005). "G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes." *Nat Med* **11**(3): 305-311.
- Harrington, J. L. and Murphy, E. (2015). "The mitochondrial calcium uniporter: mice can live and die without it." *J Mol Cell Cardiol* **78**: 46-53.
- Hartley, A., Stone, J. M., Heron, C., Cooper, J. M., et al. (1994). "Complex I inhibitors induce dose-dependent apoptosis in PC12 cells: relevance to Parkinson's disease." *J Neurochem* **63**(5): 1987-1990.
- Hashimoto, I., Li, X., Hejmadi Bhat, A., Jones, M., et al. (2003). "Myocardial strain rate is a superior method for evaluation of left ventricular subendocardial function compared with tissue Doppler imaging." *J Am Coll Cardiol* **42**(9): 1574-1583.
- Hatefi, Y. (1985). "The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system." *Annu Rev Biochem* **54**: 1015-1069.
- Hattori, R., Maulik, N., Otani, H., Zhu, L., et al. (2001). "Role of STAT3 in ischemic preconditioning." *J Mol Cell Cardiol* **33**(11): 1929-1936.
- Hausenloy, D. J., Mocanu, M. M. and Yellon, D. M. (2004). "Cross-talk between the survival kinases during early reperfusion: its contribution to ischemic preconditioning." *Cardiovasc Res* **63**(2): 305-312.
- Hausenloy, D. J. and Yellon, D. M. (2004). "New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway." *Cardiovasc Res* **61**(3): 448-460.
- Hausenloy, D. J. and Yellon, D. M. (2006). "Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning." *Cardiovasc Res* **70**(2): 240-253.
- Hausenloy, D. J. and Yellon, D. M. (2013). "Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target." *J Clin Invest* **123**(1): 92-100.
- Headrick, J. P., Ashton, K. J., Rosemeyer, R. B. and Peart, J. N. (2013). "Cardiovascular adenosine receptors: expression, actions and interactions." *Pharmacol Ther* **140**(1): 92-111.
- Heinen, A., Aldakkak, M., Stowe, D. F., Rhodes, S. S., et al. (2007a). "Reverse electron flow-induced ROS production is attenuated by activation of mitochondrial Ca²⁺-sensitive K⁺ channels." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**(3): H1400-1407.
- Heinen, A., Camara, A. K., Aldakkak, M., Rhodes, S. S., et al. (2007b). "Mitochondrial Ca²⁺-induced K⁺ influx increases respiration and enhances ROS production while maintaining membrane potential." *Am J Physiol Cell Physiol* **292**(1): C148-156.
- Heinen, A., Strothoff, M., Schmidt, A., Stracke, N., et al. (2014). "Pharmacological options to protect the aged heart from ischemia and reperfusion injury by targeting the PKA-BK(Ca) signaling pathway." *Exp Gerontol* **56**: 99-105.
- Herrera, G. M., Heppner, T. J. and Nelson, M. T. (2000). "Regulation of urinary bladder smooth muscle contractions by ryanodine receptors and BK and SK channels." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **279**(1): R60-68.
- Heusch, G. (2015). "Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning." *Circ Res* **116**(4): 674-699.
- Heusch, G., Boengler, K. and Schulz, R. (2008). "Cardioprotection: nitric oxide, protein kinases, and mitochondria." *Circulation* **118**(19): 1915-1919.

- Heusch, G., Musiolik, J., Gedik, N. and Skyschally, A. (2011). "Mitochondrial STAT3 activation and cardioprotection by ischemic postconditioning in pigs with regional myocardial ischemia/reperfusion." Circ Res **109**(11): 1302-1308.
- Hilfiker-Kleiner, D., Hilfiker, A., Fuchs, M., Kaminski, K., et al. (2004). "Signal transducer and activator of transcription 3 is required for myocardial capillary growth, control of interstitial matrix deposition, and heart protection from ischemic injury." Circ Res **95**(2): 187-195.
- Hingorany, S. and Frishman, W. H. (2011). "Soluble guanylate cyclase activation with cinaciguat: a new approach to the treatment of decompensated heart failure." Cardiol Rev **19**(1): 23-29.
- Hobbs, A., Foster, P., Prescott, C., Scotland, R., et al. (2004). "Natriuretic peptide receptor-C regulates coronary blood flow and prevents myocardial ischemia/reperfusion injury: novel cardioprotective role for endothelium-derived C-type natriuretic peptide." Circulation **110**(10): 1231-1235.
- Hofmann, F., Dostmann, W., Keilbach, A., Landgraf, W., et al. (1992). "Structure and physiological role of cGMP-dependent protein kinase." Biochim Biophys Acta **1135**(1): 51-60.
- Hofmann, F., Feil, R., Kleppisch, T. and Schlossmann, J. (2006). "Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion." Physiol Rev **86**(1): 1-23.
- Hofmann, F. and Wegener, J. W. (2013). "cGMP-dependent protein kinases (cGK)." Methods Mol Biol **1020**: 17-50.
- Holland, M., Langton, P. D., Standen, N. B. and Boyle, J. P. (1996). "Effects of the BKCa channel activator, NS1619, on rat cerebral artery smooth muscle." Br J Pharmacol **117**(1): 119-129.
- Holtwick, R., van Eickels, M., Skryabin, B. V., Baba, H. A., et al. (2003). "Pressure-independent cardiac hypertrophy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of the atrial natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A." J Clin Invest **111**(9): 1399-1407.
- Hou, S., Heinemann, S. H. and Hoshi, T. (2009). "Modulation of BKCa channel gating by endogenous signaling molecules." Physiology (Bethesda) **24**: 26-35.
- Hou, S., Xu, R., Heinemann, S. H. and Hoshi, T. (2008a). "The RCK1 high-affinity Ca²⁺ sensor confers carbon monoxide sensitivity to Slo1 BK channels." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(10): 4039-4043.
- Hou, S., Xu, R., Heinemann, S. H. and Hoshi, T. (2008b). "Reciprocal regulation of the Ca²⁺ and H⁺ sensitivity in the SLO1 BK channel conferred by the RCK1 domain." Nat Struct Mol Biol **15**(4): 403-410.
- Huang, C. W., Huang, C. C. and Wu, S. N. (2007). "Activation by zonisamide, a newer antiepileptic drug, of large-conductance calcium-activated potassium channel in differentiated hippocampal neuron-derived H19-7 cells." J Pharmacol Exp Ther **321**(1): 98-106.
- Huang, P. L., Huang, Z., Mashimo, H., Bloch, K. D., et al. (1995). "Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase." Nature **377**(6546): 239-242.
- Huetteman, D. A. and Bogie, H. (2009). "Direct blood pressure monitoring in laboratory rodents via implantable radio telemetry." Methods Mol Biol **573**: 57-73.
- Huggins, J. P., Landgraf, W., Hofmann, F. and Pelton, J. T. (1991). "Secondary structure and conformational changes associated with substrate-binding and the N-terminus in cyclic GMP-dependent protein kinase." Biochem Soc Trans **19**(2): 163S.
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., et al. (1987). "Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(24): 9265-9269.
- Ignarro, L. J., Degnan, J. N., Baricos, W. H., Kadowitz, P. J., et al. (1982). "Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme. Comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung." Biochim Biophys Acta **718**(1): 49-59.
- Ikeda, Y., Miura, T., Sakamoto, J., Miki, T., et al. (2006). "Activation of ERK and suppression of calcineurin are interacting mechanisms of cardioprotection afforded by delta-opioid receptor activation." Basic Res Cardiol **101**(5): 418-426.
- Illison, J., Tian, L., McClafferty, H., Werno, M., et al. (2016). "Obesogenic and Diabetogenic Effects of High-Calorie Nutrition Require Adipocyte BK Channels." Diabetes.

- Imlach, W. L., Finch, S. C., Dunlop, J., Meredith, A. L., et al. (2008). "The molecular mechanism of "ryegrass staggers," a neurological disorder of K⁺ channels." *J Pharmacol Exp Ther* **327**(3): 657-664.
- Imlach, W. L., Finch, S. C., Miller, J. H., Meredith, A. L., et al. (2010). "A role for BK channels in heart rate regulation in rodents." *PLoS One* **5**(1): e8698.
- Inserte, J., Cardona, M., Poncelas-Nozal, M., Hernando, V., et al. (2016). "Studies on the role of apoptosis after transient myocardial ischemia: genetic deletion of the executioner caspases-3 and -7 does not limit infarct size and ventricular remodeling." *Basic Res Cardiol* **111**(2): 18.
- Inserte, J. and Garcia-Dorado, D. (2015). "The cGMP/PKG pathway as a common mediator of cardioprotection: translatability and mechanism." *Br J Pharmacol* **172**(8): 1996-2009.
- Inserte, J., Garcia-Dorado, D., Ruiz-Meana, M., Padilla, F., et al. (2002). "Effect of inhibition of Na⁽⁺⁾/Ca⁽²⁺⁾ exchanger at the time of myocardial reperfusion on hypercontracture and cell death." *Cardiovasc Res* **55**(4): 739-748.
- Inserte, J., Hernando, V., Ruiz-Meana, M., Poncelas-Nozal, M., et al. (2014). "Delayed phospholamban phosphorylation in post-conditioned heart favours Ca²⁺ normalization and contributes to protection." *Cardiovasc Res* **103**(4): 542-553.
- Ishihara, M., Inoue, I., Kawagoe, T., Shimatani, Y., et al. (2006). "Ischaemic preconditioning effect of prodromal angina pectoris is lost in patients with prior myocardial infarction." *Heart* **92**(7): 973-974.
- Ishihara, M., Sato, H., Tateishi, H., Kawagoe, T., et al. (1997). "Implications of prodromal angina pectoris in anterior wall acute myocardial infarction: acute angiographic findings and long-term prognosis." *J Am Coll Cardiol* **30**(4): 970-975.
- Jaffe, M. D. and Quinn, N. K. (1980). "Warm-up phenomenon in angina pectoris." *Lancet* **2**(8201): 934-936.
- Janssen, B. J. and Smits, J. F. (2002). "Autonomic control of blood pressure in mice: basic physiology and effects of genetic modification." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **282**(6): R1545-1564.
- Janssens, S., Pokreisz, P., Schoonjans, L., Pellens, M., et al. (2004). "Cardiomyocyte-specific overexpression of nitric oxide synthase 3 improves left ventricular performance and reduces compensatory hypertrophy after myocardial infarction." *Circ Res* **94**(9): 1256-1262.
- Jennings, R. B., Sommers, H. M., Smyth, G. A., Flack, H. A., et al. (1960). "Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog." *Arch Pathol* **70**: 68-78.
- Ji, Y., Pang, Q. F., Xu, G., Wang, L., et al. (2008). "Exogenous hydrogen sulfide postconditioning protects isolated rat hearts against ischemia-reperfusion injury." *Eur J Pharmacol* **587**(1-3): 1-7.
- Jiang, Y., Pico, A., Cadene, M., Chait, B. T., et al. (2001). "Structure of the RCK domain from the E. coli K⁺ channel and demonstration of its presence in the human BK channel." *Neuron* **29**(3): 593-601.
- Jin, C., Wu, J., Watanabe, M., Okada, T., et al. (2012). "Mitochondrial K⁺ channels are involved in ischemic postconditioning in rat hearts." *J Physiol Sci* **62**(4): 325-332.
- Jones, D. A., Pellaton, C., Velmurugan, S., Rathod, K. S., et al. (2015). "Randomized phase 2 trial of intracoronary nitrite during acute myocardial infarction." *Circ Res* **116**(3): 437-447.
- Jones, S. P., Hoffmeyer, M. R., Sharp, B. R., Ho, Y. S., et al. (2003). "Role of intracellular antioxidant enzymes after in vivo myocardial ischemia and reperfusion." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**(1): H277-282.
- Juhaszova, M., Zorov, D. B., Kim, S. H., Pepe, S., et al. (2004). "Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore." *J Clin Invest* **113**(11): 1535-1549.
- Jung, K. H., Chu, K., Ko, S. Y., Lee, S. T., et al. (2006). "Early intravenous infusion of sodium nitrite protects brain against in vivo ischemia-reperfusion injury." *Stroke* **37**(11): 2744-2750.
- Kalogeris, T., Bao, Y. and Korthuis, R. J. (2014). "Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning." *Redox Biol* **2**: 702-714.
- Kaludercic, N., Carpi, A., Menabo, R., Di Lisa, F., et al. (2011). "Monoamine oxidases (MAO) in the pathogenesis of heart failure and ischemia/reperfusion injury." *Biochim Biophys Acta* **1813**(7): 1323-1332.

- Kang, S. H., Park, W. S., Kim, N., Youm, J. B., et al. (2007). "Mitochondrial Ca²⁺-activated K⁺ channels more efficiently reduce mitochondrial Ca²⁺ overload in rat ventricular myocytes." Am J Physiol Heart Circ Physiol **293**(1): H307-313.
- Karlsberg, R. P., DeWood, M. A., DeMaria, A. N., Berk, M. R., et al. (1996). "Comparative efficacy of short-term intravenous infusions of milrinone and dobutamine in acute congestive heart failure following acute myocardial infarction. Milrinone-Dobutamine Study Group." Clin Cardiol **19**(1): 21-30.
- Kass, D. A., Takimoto, E., Nagayama, T. and Champion, H. C. (2007). "Phosphodiesterase regulation of nitric oxide signaling." Cardiovasc Res **75**(2): 303-314.
- Kathiresan, T., Harvey, M., Orchard, S., Sakai, Y., et al. (2009). "A protein interaction network for the large conductance Ca(2+)-activated K(+) channel in the mouse cochlea." Mol Cell Proteomics **8**(8): 1972-1987.
- Katsuki, S., Arnold, W. P. and Murad, F. (1977). "Effects of sodium nitroprusside, nitroglycerin, and sodium azide on levels of cyclic nucleotides and mechanical activity of various tissues." J Cyclic Nucleotide Res **3**(4): 239-247.
- Keilbach, A., Ruth, P. and Hofmann, F. (1992). "Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies." Eur J Biochem **208**(2): 467-473.
- Kelley, L. A., MacCallum, R. M. and Sternberg, M. J. (2000). "Enhanced genome annotation using structural profiles in the program 3D-PSSM." J Mol Biol **299**(2): 499-520.
- Keravis, T. and Lugnier, C. (2012). "Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments." Br J Pharmacol **165**(5): 1288-1305.
- Kerr, J. F. (1971). "Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death." J Pathol **105**(1): 13-20.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-257.
- Kin, H., Zhao, Z. Q., Sun, H. Y., Wang, N. P., et al. (2004). "Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion." Cardiovasc Res **62**(1): 74-85.
- Kinoshita, M., Y, M. T., Fukuta, K., Kasai, A., et al. (2016). "Isoflurane-induced postconditioning via mitochondrial calcium-activated potassium channels." J Med Invest **63**(1-2): 80-84.
- Kishimoto, I., Rossi, K. and Garbers, D. L. (2001). "A genetic model provides evidence that the receptor for atrial natriuretic peptide (guanylyl cyclase-A) inhibits cardiac ventricular myocyte hypertrophy." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(5): 2703-2706.
- Kitakaze, M., Hori, M., Morioka, T., Minamino, T., et al. (1994). "Alpha 1-adrenoceptor activation mediates the infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning through augmentation of 5'-nucleotidase activity." J Clin Invest **93**(5): 2197-2205.
- Klingenberg, M. (2008). "The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier." Biochim Biophys Acta **1778**(10): 1978-2021.
- Kloner, R. A., Reimer, K. A., Willerson, J. T. and Jennings, R. B. (1976). "Reduction of experimental myocardial infarct size with hyperosmolar mannitol." Proc Soc Exp Biol Med **151**(4): 677-683.
- Knaus, H. G., Folander, K., Garcia-Calvo, M., Garcia, M. L., et al. (1994). "Primary sequence and immunological characterization of beta-subunit of high conductance Ca(2+)-activated K+ channel from smooth muscle." J Biol Chem **269**(25): 17274-17278.
- Koesling, D. (1999). "Studying the structure and regulation of soluble guanylyl cyclase." Methods **19**(4): 485-493.
- Kojda, G. (2001). "Mechanisms of inotropic effects induced by nitric oxide." Ital Heart J **2 Suppl 3**: 48S-49S.
- Kojda, G., Kottenberg, K., Nix, P., Schluter, K. D., et al. (1996). "Low increase in cGMP induced by organic nitrates and nitrovasodilators improves contractile response of rat ventricular myocytes." Circ Res **78**(1): 91-101.
- Koka, S., Das, A., Salloum, F. N. and Kukreja, R. C. (2013). "Phosphodiesterase-5 inhibitor tadalafil attenuates oxidative stress and protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in type 2 diabetic mice." Free Radic Biol Med **60**: 80-88.

- Koller, A., Schlossmann, J., Ashman, K., Uttenweiler-Joseph, S., et al. (2003). "Association of phospholamban with a cGMP kinase signaling complex." Biochem Biophys Res Commun **300**(1): 155-160.
- Korichneva, I., Hoyos, B., Chua, R., Levi, E., et al. (2002). "Zinc release from protein kinase C as the common event during activation by lipid second messenger or reactive oxygen." J Biol Chem **277**(46): 44327-44331.
- Kostic, M. M., Erdogan, S., Rena, G., Borchert, G., et al. (1997). "Altered expression of PDE1 and PDE4 cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms in 7-oxo-prostacyclin-preconditioned rat heart." J Mol Cell Cardiol **29**(11): 3135-3146.
- Kovacs, A., Olah, A., Lux, A., Matyas, C., et al. (2015). "Strain and strain rate by speckle-tracking echocardiography correlate with pressure-volume loop-derived contractility indices in a rat model of athlete's heart." Am J Physiol Heart Circ Physiol **308**(7): H743-748.
- Krieg, T., Cui, L., Qin, Q., Cohen, M. V., et al. (2004). "Mitochondrial ROS generation following acetylcholine-induced EGF receptor transactivation requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF." J Mol Cell Cardiol **36**(3): 435-443.
- Krieg, T., Qin, Q., McIntosh, E. C., Cohen, M. V., et al. (2002). "ACh and adenosine activate PI3-kinase in rabbit hearts through transactivation of receptor tyrosine kinases." Am J Physiol Heart Circ Physiol **283**(6): H2322-2330.
- Kroemer, G., Galluzzi, L. and Brenner, C. (2007). "Mitochondrial membrane permeabilization in cell death." Physiol Rev **87**(1): 99-163.
- Krumenacker, J. S., Hanafy, K. A. and Murad, F. (2004). "Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase." Brain Res Bull **62**(6): 505-515.
- Kuhn, M. (2003). "Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A." Circ Res **93**(8): 700-709.
- Kuno, A., Critz, S. D., Cui, L., Solodushko, V., et al. (2007). "Protein kinase C protects preconditioned rabbit hearts by increasing sensitivity of adenosine A2b-dependent signaling during early reperfusion." J Mol Cell Cardiol **43**(3): 262-271.
- Kupriyanov, V. V., Yang, L. and Deslauriers, R. (1996). "Cytoplasmic phosphates in Na(+)-K+ balance in KCN-poisoned rat heart: a ⁸⁷Rb-, ²³Na-, and ³¹P-NMR study." Am J Physiol **270**(4 Pt 2): H1303-1311.
- Kuzuya, T., Hoshida, S., Yamashita, N., Fuji, H., et al. (1993). "Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia." Circ Res **72**(6): 1293-1299.
- Kyle, B. D., Hurst, S., Swayze, R. D., Sheng, J., et al. (2013). "Specific phosphorylation sites underlie the stimulation of a large conductance, Ca(2+)-activated K(+) channel by cGMP-dependent protein kinase." FASEB J **27**(5): 2027-2038.
- Ladilov, Y. V., Siegmund, B., Balsler, C. and Piper, H. M. (1997). "Simulated ischemia increases the susceptibility of rat cardiomyocytes to hypercontracture." Circ Res **80**(1): 69-75.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lagadic-Gossmann, D. and Vaughan-Jones, R. D. (1993). "Coupling of dual acid extrusion in the guinea-pig isolated ventricular myocyte to alpha 1- and beta-adrenoceptors." J Physiol **464**: 49-73.
- Lai, M. H., Wu, Y., Gao, Z., Anderson, M. E., et al. (2014). "BK channels regulate sinoatrial node firing rate and cardiac pacing in vivo." Am J Physiol Heart Circ Physiol **307**(9): H1327-1338.
- Lakhani, S. A., Masud, A., Kuida, K., Porter, G. A., Jr., et al. (2006). "Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis." Science **311**(5762): 847-851.
- Landgraf, W., Hofmann, F., Pelton, J. T. and Huggins, J. P. (1990). "Effects of cyclic GMP on the secondary structure of cyclic GMP dependent protein kinase and analysis of the enzyme's amino-terminal domain by far-ultraviolet circular dichroism." Biochemistry **29**(42): 9921-9928.
- Lang, D. G. and Ritchie, A. K. (1990). "Tetraethylammonium blockade of apamin-sensitive and insensitive Ca(2+)-activated K+ channels in a pituitary cell line." J Physiol **425**: 117-132.

- Laskey, W. K., Yoon, S., Calzada, N. and Ricciardi, M. J. (2008). "Concordant improvements in coronary flow reserve and ST-segment resolution during percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: a benefit of postconditioning." *Catheter Cardiovasc Interv* **72**(2): 212-220.
- Lassegue, B., San Martin, A. and Griendling, K. K. (2012). "Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system." *Circ Res* **110**(10): 1364-1390.
- Laurenza, A., Sutkowski, E. M. and Seamon, K. B. (1989). "Forskolin: a specific stimulator of adenylyl cyclase or a diterpene with multiple sites of action?" *Trends Pharmacol Sci* **10**(11): 442-447.
- Li, Q., Bolli, R., Qiu, Y., Tang, X. L., et al. (2001). "Gene therapy with extracellular superoxide dismutase protects conscious rabbits against myocardial infarction." *Circulation* **103**(14): 1893-1898.
- Li, Y., Huang, T. T., Carlson, E. J., Melov, S., et al. (1995). "Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase." *Nat Genet* **11**(4): 376-381.
- Liao, Y., Kristiansen, A. M., Oksvold, C. P., Tuvnes, F. A., et al. (2010). "Neuronal Ca²⁺-activated K⁺ channels limit brain infarction and promote survival." *PLoS One* **5**(12): e15601.
- Lincoln, T. M., Komalavilas, P., Boerth, N. J., MacMillan-Crow, L. A., et al. (1995). "cGMP signaling through cAMP- and cGMP-dependent protein kinases." *Adv Pharmacol* **34**: 305-322.
- Lingle, C. J. (2007). "Gating rings formed by RCK domains: keys to gate opening." *J Gen Physiol* **129**(2): 101-107.
- Lingle, C. J., Solaro, C. R., Prakriya, M. and Ding, J. P. (1996). "Calcium-activated potassium channels in adrenal chromaffin cells." *Ion Channels* **4**: 261-301.
- Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., et al. (1996). "Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c." *Cell* **86**(1): 147-157.
- Liu, Y., Cohen, M. V. and Downey, J. M. (1994). "Chelerythrine, a highly selective protein kinase C inhibitor, blocks the anti-infarct effect of ischemic preconditioning in rabbit hearts." *Cardiovasc Drugs Ther* **8**(6): 881-882.
- Liu, Y., Sato, T., O'Rourke, B. and Marban, E. (1998). "Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection?" *Circulation* **97**(24): 2463-2469.
- Liu, Y., Tsuchida, A., Cohen, M. V. and Downey, J. M. (1995). "Pretreatment with angiotensin II activates protein kinase C and limits myocardial infarction in isolated rabbit hearts." *J Mol Cell Cardiol* **27**(3): 883-892.
- Lohmann, S. M., Vaandrager, A. B., Smolenski, A., Walter, U., et al. (1997). "Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases." *Trends Biochem Sci* **22**(8): 307-312.
- Lopez, M. J., Wong, S. K., Kishimoto, I., Dubois, S., et al. (1995). "Salt-resistant hypertension in mice lacking the guanylyl cyclase-A receptor for atrial natriuretic peptide." *Nature* **378**(6552): 65-68.
- Loughney, K., Hill, T. R., Florio, V. A., Uher, L., et al. (1998). "Isolation and characterization of cDNAs encoding PDE5A, a human cGMP-binding, cGMP-specific 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase." *Gene* **216**(1): 139-147.
- Loughney, K., Martins, T. J., Harris, E. A., Sadhu, K., et al. (1996). "Isolation and characterization of cDNAs corresponding to two human calcium, calmodulin-regulated, 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases." *J Biol Chem* **271**(2): 796-806.
- Lowel, H. and Meisinger, C. (2006). "[Epidemiology and demographic evolution exemplified for cardiovascular diseases in Germany]." *Med Klin (Munich)* **101**(10): 804-811.
- Lucchinetti, E., Jamnicki, M., Fischer, G. and Zaugg, M. (2008). "Preconditioning by isoflurane retains its protection against ischemia-reperfusion injury in postinfarct remodeled rat hearts." *Anesth Analg* **106**(1): 17-23, table of contents.
- Lukowski, R., Krieg, T., Rybalkin, S. D., Beavo, J., et al. (2014). "Turning on cGMP-dependent pathways to treat cardiac dysfunctions: boom, bust, and beyond." *Trends Pharmacol Sci* **35**(8): 404-413.
- Lukowski, R., Rybalkin, S. D., Loga, F., Leiss, V., et al. (2010). "Cardiac hypertrophy is not amplified by deletion of cGMP-dependent protein kinase I in cardiomyocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(12): 5646-5651.

- Lukowski, R., Weinmeister, P., Bernhard, D., Feil, S., et al. (2008). "Role of smooth muscle cGMP/cGKI signaling in murine vascular restenosis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**(7): 1244-1250.
- Maggioni, A. P., Maseri, A., Fresco, C., Franzosi, M. G., et al. (1993). "Age-related increase in mortality among patients with first myocardial infarctions treated with thrombolysis. The Investigators of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI-2)." *N Engl J Med* **329**(20): 1442-1448.
- Marber, M. S., Latchman, D. S., Walker, J. M. and Yellon, D. M. (1993). "Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction." *Circulation* **88**(3): 1264-1272.
- Marceau, F., Hess, J. F. and Bachvarov, D. R. (1998). "The B1 receptors for kinins." *Pharmacol Rev* **50**(3): 357-386.
- Marklund, S. L. (1984). "Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species." *Biochem J* **222**(3): 649-655.
- Marletta, M. A. (1993). "Nitric-Oxide Synthase Structure and Mechanism." *Journal of Biological Chemistry* **268**(17): 12231-12234.
- Marletta, M. A. (1994). "Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis." *Cell* **78**(6): 927-930.
- Martinez, S. E., Beavo, J. A. and Hol, W. G. (2002). "GAF domains: two-billion-year-old molecular switches that bind cyclic nucleotides." *Mol Interv* **2**(5): 317-323.
- Marty, A. and Neher, E. (1985). "Potassium channels in cultured bovine adrenal chromaffin cells." *J Physiol* **367**: 117-141.
- Marx, S. O., Reiken, S., Hisamatsu, Y., Jayaraman, T., et al. (2000). "PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts." *Cell* **101**(4): 365-376.
- Massion, P. B. and Balligand, J. L. (2003). "Modulation of cardiac contraction, relaxation and rate by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS): lessons from genetically modified mice." *J Physiol* **546**(Pt 1): 63-75.
- Massion, P. B., Pelat, M., Belge, C. and Balligand, J. L. (2005). "Regulation of the mammalian heart function by nitric oxide." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **142**(2): 144-150.
- McCobb, D. P., Fowler, N. L., Featherstone, T., Lingle, C. J., et al. (1995). "A human calcium-activated potassium channel gene expressed in vascular smooth muscle." *Am J Physiol* **269**(3 Pt 2): H767-777.
- McFerrin, M. B., Turner, K. L., Cuddapah, V. A. and Sontheimer, H. (2012). "Differential role of IK and BK potassium channels as mediators of intrinsic and extrinsic apoptotic cell death." *Am J Physiol Cell Physiol* **303**(10): C1070-1078.
- Meacci, E., Taira, M., Moos, M., Jr., Smith, C. J., et al. (1992). "Molecular cloning and expression of human myocardial cGMP-inhibited cAMP phosphodiesterase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(9): 3721-3725.
- Meera, P., Wallner, M., Song, M. and Toro, L. (1997). "Large conductance voltage- and calcium-dependent K⁺ channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25): 14066-14071.
- Meredith, A. L., Thorneloe, K. S., Werner, M. E., Nelson, M. T., et al. (2004). "Overactive bladder and incontinence in the absence of the BK large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel." *J Biol Chem* **279**(35): 36746-36752.
- Meredith, A. L., Wiler, S. W., Miller, B. H., Takahashi, J. S., et al. (2006). "BK calcium-activated potassium channels regulate circadian behavioral rhythms and pacemaker output." *Nat Neurosci* **9**(8): 1041-1049.
- Mergia, E., Friebe, A., Dangel, O., Russwurm, M., et al. (2006). "Spare guanylyl cyclase NO receptors ensure high NO sensitivity in the vascular system." *J Clin Invest* **116**(6): 1731-1737.
- Mergia, E., Russwurm, M., Zoidl, G. and Koesling, D. (2003). "Major occurrence of the new alpha2beta1 isoform of NO-sensitive guanylyl cyclase in brain." *Cell Signal* **15**(2): 189-195.

- Methner, C., Buonincontri, G., Hu, C. H., Vujic, A., et al. (2013a). "Riociguat reduces infarct size and post-infarct heart failure in mouse hearts: insights from MRI/PET imaging." *PLoS One* **8**(12): e83910.
- Methner, C., Lukowski, R., Grube, K., Loga, F., et al. (2013b). "Protection through postconditioning or a mitochondria-targeted S-nitrosothiol is unaffected by cardiomyocyte-selective ablation of protein kinase G." *Basic Res Cardiol* **108**(2): 337.
- Miller, E. W., Tulyathan, O., Isacoff, E. Y. and Chang, C. J. (2007). "Molecular imaging of hydrogen peroxide produced for cell signaling." *Nat Chem Biol* **3**(5): 263-267.
- Mitchell, P. (1976). "Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems." *J Theor Biol* **62**(2): 327-367.
- Mizuguchi, Y., Oishi, Y., Miyoshi, H., Iuchi, A., et al. (2008). "The functional role of longitudinal, circumferential, and radial myocardial deformation for regulating the early impairment of left ventricular contraction and relaxation in patients with cardiovascular risk factors: a study with two-dimensional strain imaging." *J Am Soc Echocardiogr* **21**(10): 1138-1144.
- Mohr, E. (2015). Die Rolle reaktiver Sauerstoffspezies und mitochondrialer BK-Kanäle für das kardiale Zellüberleben. *Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und klinische Pharmazie*, Universität Tübingen. **Masterarbeit**.
- Morrell, C. N. (2008). "Reactive oxygen species: finding the right balance." *Circ Res* **103**(6): 571-572.
- Morris, S. M. and Billiar, T. R. (1994). "New Insights into the Regulation of Inducible Nitric-Oxide Synthesis." *American Journal of Physiology* **266**(6): E829-E839.
- Mozaffarian, D., Benjamin, E. J., Go, A. S., Arnett, D. K., et al. (2015). "Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association." *Circulation* **131**(4): e29-322.
- Mubagwa, K. and Flameng, W. (2001). "Adenosine, adenosine receptors and myocardial protection: an updated overview." *Cardiovasc Res* **52**(1): 25-39.
- Mullershausen, F., Russwurm, M., Koesling, D. and Friebe, A. (2004). "In vivo reconstitution of the negative feedback in nitric oxide/cGMP signaling: role of phosphodiesterase type 5 phosphorylation." *Mol Biol Cell* **15**(9): 4023-4030.
- Mullis, K. B. and Faloona, F. A. (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." *Methods Enzymol* **155**: 335-350.
- Murphy, M. P. and Smith, R. A. (2007). "Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **47**: 629-656.
- Murry, C. E., Jennings, R. B. and Reimer, K. A. (1986). "Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium." *Circulation* **74**(5): 1124-1136.
- Musialek, P., Lei, M., Brown, H. F., Paterson, D. J., et al. (1997). "Nitric oxide can increase heart rate by stimulating the hyperpolarization-activated inward current, I_f." *Circ Res* **81**(1): 60-68.
- Muzumdar, M. D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L., et al. (2007). "A global double-fluorescent Cre reporter mouse." *Genesis* **45**(9): 593-605.
- Nagata, T., Yasukawa, H., Kyogoku, S., Oba, T., et al. (2015). "Cardiac-Specific SOCS3 Deletion Prevents In Vivo Myocardial Ischemia Reperfusion Injury through Sustained Activation of Cardioprotective Signaling Molecules." *PLoS One* **10**(5): e0127942.
- Nagayama, T., Yoshida, M., Suzuki-Kusaba, M., Hisa, H., et al. (1998). "The role of BK(Ca) channels in the nitric oxide-mediated regulation of adrenal catecholamine secretion." *Eur J Pharmacol* **353**(2-3): 169-176.
- Nakamura, M., Wang, N. P., Zhao, Z. Q., Wilcox, J. N., et al. (2000). "Preconditioning decreases Bax expression, PMN accumulation and apoptosis in reperfused rat heart." *Cardiovasc Res* **45**(3): 661-670.
- Narita, M., Shimizu, S., Ito, T., Chittenden, T., et al. (1998). "Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(25): 14681-14686.
- Nguyen, M., Millar, D. G., Yong, V. W., Korsmeyer, S. J., et al. (1993). "Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence." *J Biol Chem* **268**(34): 25265-25268.

- Nithipatikom, K., Moore, J. M., Isbell, M. A., Falck, J. R., et al. (2006). "Epoxyeicosatrienoic acids in cardioprotection: ischemic versus reperfusion injury." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**(2): H537-542.
- Noma, A. (1983). "ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle." *Nature* **305**(5930): 147-148.
- O'Rourke, B., Cortassa, S. and Aon, M. A. (2005). "Mitochondrial ion channels: gatekeepers of life and death." *Physiology (Bethesda)* **20**: 303-315.
- Oberholzer, C., Oberholzer, A., Clare-Salzler, M. and Moldawer, L. L. (2001). "Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration." *FASEB J* **15**(6): 879-892.
- Obst, M., Tank, J., Plehm, R., Blumer, K. J., et al. (2006). "NO-dependent blood pressure regulation in RGS2-deficient mice." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **290**(4): R1012-1019.
- Ockaili, R. A., Salloum, F. N., Chau, V. Q., Lall, S. K., et al. (2008). "BAY 58-2667, A Novel No-independent Activator Of Soluble Guanylate Cyclase Attenuates Myocardial Infarction Following Ischemia/reperfusion Injury Through Protein Kinase G Activation." *Circulation* **118**(18): S1018-S1018.
- Ohgoh, M., Shimizu, H., Ogura, H. and Nishizawa, Y. (2000). "Astroglial trophic support and neuronal cell death: influence of cellular energy level on type of cell death induced by mitochondrial toxin in cultured rat cortical neurons." *J Neurochem* **75**(3): 925-933.
- Ohya, S., Kuwata, Y., Sakamoto, K., Muraki, K., et al. (2005). "Cardioprotective effects of estradiol include the activation of large-conductance Ca(2+)-activated K(+) channels in cardiac mitochondria." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**(4): H1635-1642.
- Okado-Matsumoto, A. and Fridovich, I. (2001). "Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria." *J Biol Chem* **276**(42): 38388-38393.
- Oldenburg, O., Qin, Q., Krieg, T., Yang, X. M., et al. (2004). "Bradykinin induces mitochondrial ROS generation via NO, cGMP, PKG, and mitoKATP channel opening and leads to cardioprotection." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **286**(1): H468-476.
- Olesen, S. P., Munch, E., Moldt, P. and Drejer, J. (1994a). "Selective activation of Ca(2+)-dependent K⁺ channels by novel benzimidazolone." *Eur J Pharmacol* **251**(1): 53-59.
- Olesen, S. P., Munch, E., Watjen, F. and Drejer, J. (1994b). "NS 004--an activator of Ca(2+)-dependent K⁺ channels in cerebellar granule cells." *Neuroreport* **5**(8): 1001-1004.
- Oliver, P. M., Fox, J. E., Kim, R., Rockman, H. A., et al. (1997). "Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(26): 14730-14735.
- Oltvai, Z. N., Milliman, C. L. and Korsmeyer, S. J. (1993). "Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death." *Cell* **74**(4): 609-619.
- Onody, A., Zvara, A., Hackler, L., Jr., Vigh, L., et al. (2003). "Effect of classic preconditioning on the gene expression pattern of rat hearts: a DNA microarray study." *FEBS Lett* **536**(1-3): 35-40.
- Opie, L. H. (1989). "Reperfusion injury and its pharmacologic modification." *Circulation* **80**(4): 1049-1062.
- Orrenius, S., Gogvadze, V. and Zhivotovsky, B. (2007). "Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **47**: 143-183.
- Orstavik, S., Natarajan, V., Tasken, K., Jahnsen, T., et al. (1997). "Characterization of the human gene encoding the type I alpha and type I beta cGMP-dependent protein kinase (PRKG1)." *Genomics* **42**(2): 311-318.
- Ottani, F., Galvani, M., Ferrini, D., Sorbello, F., et al. (1995). "Prodromal angina limits infarct size. A role for ischemic preconditioning." *Circulation* **91**(2): 291-297.
- Ovize, M., Baxter, G. F., Di Lisa, F., Ferdinandy, P., et al. (2010). "Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology." *Cardiovasc Res* **87**(3): 406-423.
- Pacher, P., Nagayama, T., Mukhopadhyay, P., Batkai, S., et al. (2008). "Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats." *Nat Protoc* **3**(9): 1422-1434.
- Padma-Nathan, H. (2003). "Efficacy and tolerability of tadalafil, a novel phosphodiesterase 5 inhibitor, in treatment of erectile dysfunction." *Am J Cardiol* **92**(9A): 19M-25M.

- Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M., Di Venosa, N., et al. (2004). "Decrease in mitochondrial complex I activity in ischemic/reperfused rat heart: involvement of reactive oxygen species and cardiolipin." Circ Res **94**(1): 53-59.
- Park, W. S., Kang, S. H., Son, Y. K., Kim, N., et al. (2007). "The mitochondrial Ca²⁺-activated K⁺ channel activator, NS 1619 inhibits L-type Ca²⁺ channels in rat ventricular myocytes." Biochem Biophys Res Commun **362**(1): 31-36.
- Pastorino, J. G., Chen, S. T., Tafani, M., Snyder, J. W., et al. (1998). "The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition." J Biol Chem **273**(13): 7770-7775.
- Pell, V. R., Chouchani, E. T., Murphy, M. P., Brookes, P. S., et al. (2016). "Moving Forwards by Blocking Back-Flow: The Yin and Yang of MI Therapy." Circ Res **118**(5): 898-906.
- Peng, Y., Popovic, Z. B., Sopko, N., Drinko, J., et al. (2009). "Speckle tracking echocardiography in the assessment of mouse models of cardiac dysfunction." Am J Physiol Heart Circ Physiol **297**(2): H811-820.
- Penna, C., Cappello, S., Mancardi, D., Raimondo, S., et al. (2006). "Post-conditioning reduces infarct size in the isolated rat heart: role of coronary flow and pressure and the nitric oxide/cGMP pathway." Basic Res Cardiol **101**(2): 168-179.
- Penna, C., Mancardi, D., Tullio, F. and Pagliaro, P. (2008). "Postconditioning and intermittent bradykinin induced cardioprotection require cyclooxygenase activation and prostacyclin release during reperfusion." Basic Res Cardiol **103**(4): 368-377.
- Pfeifer, A., Klatt, P., Massberg, S., Ny, L., et al. (1998). "Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice." EMBO J **17**(11): 3045-3051.
- Pfeifer, A., Ruth, P., Dostmann, W., Sausbier, M., et al. (1999). "Structure and function of cGMP-dependent protein kinases." Rev Physiol Biochem Pharmacol **135**: 105-149.
- Pfeiffer, S., Leopold, E., Schmidt, K., Brunner, F., et al. (1996). "Inhibition of nitric oxide synthesis by NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, NG-nitro-L-arginine." Br J Pharmacol **118**(6): 1433-1440.
- Ping, P., Song, C., Zhang, J., Guo, Y., et al. (2002). "Formation of protein kinase C(epsilon)-Lck signaling modules confers cardioprotection." J Clin Invest **109**(4): 499-507.
- Piper, H. M., Balsler, C., Ladilov, Y. V., Schafer, M., et al. (1996). "The role of Na⁺/H⁺ exchange in ischemia-reperfusion." Basic Res Cardiol **91**(3): 191-202.
- Piper, H. M., Meuter, K. and Schafer, C. (2003). "Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury." Ann Thorac Surg **75**(2): S644-648.
- Pluger, S., Faulhaber, J., Furstenau, M., Lohn, M., et al. (2000). "Mice with disrupted BK channel beta1 subunit gene feature abnormal Ca(2+) spark/STOC coupling and elevated blood pressure." Circ Res **87**(11): E53-60.
- Pluznick, J. L., Wei, P., Grimm, P. R. and Sansom, S. C. (2005). "BK- β 1 subunit: immunolocalization in the mammalian connecting tubule and its role in the kaliuretic response to volume expansion." Am J Physiol Renal Physiol **288**(4): F846-854.
- Qin, Q., Downey, J. M. and Cohen, M. V. (2003). "Acetylcholine but not adenosine triggers preconditioning through PI3-kinase and a tyrosine kinase." Am J Physiol Heart Circ Physiol **284**(2): H727-734.
- Qin, Q., Yang, X. M., Cui, L., Critz, S. D., et al. (2004). "Exogenous NO triggers preconditioning via a cGMP- and mitoKATP-dependent mechanism." Am J Physiol Heart Circ Physiol **287**(2): H712-718.
- Ram, R., Mickelsen, D. M., Theodoropoulos, C. and Blaxall, B. C. (2011). "New approaches in small animal echocardiography: imaging the sounds of silence." Am J Physiol Heart Circ Physiol **301**(5): H1765-1780.
- Rastaldo, R., Pagliaro, P., Cappello, S., Penna, C., et al. (2007). "Nitric oxide and cardiac function." Life Sci **81**(10): 779-793.
- Redel, A., Lange, M., Jazbutyte, V., Lotz, C., et al. (2008). "Activation of mitochondrial large-conductance calcium-activated K⁺ channels via protein kinase A mediates desflurane-induced preconditioning." Anesth Analg **106**(2): 384-391, table of contents.

- Reichert, C. L., Visser, C. A., van den Brink, R. B., Koolen, J. J., et al. (1992). "Prognostic value of biventricular function in hypotensive patients after cardiac surgery as assessed by transesophageal echocardiography." *J Cardiothorac Vasc Anesth* **6**(4): 429-432.
- Ren, B., Shen, Y., Shao, H., Qian, J., et al. (2007). "Brain natriuretic peptide limits myocardial infarct size dependent of nitric oxide synthase in rats." *Clin Chim Acta* **377**(1-2): 83-87.
- Rich, P. R., Mischis, L. A., Purton, S. and Wiskich, J. T. (2001). "The sites of interaction of triphenyltetrazolium chloride with mitochondrial respiratory chains." *FEMS Microbiol Lett* **202**(2): 181-187.
- Rochetaing, A. and Kreher, P. (2003). "Reactive hyperemia during early reperfusion as a determinant of improved functional recovery in ischemic preconditioned rat hearts." *J Thorac Cardiovasc Surg* **125**(6): 1516-1525.
- Rosenkranz, A. C., Woods, R. L., Dusting, G. J. and Ritchie, R. H. (2003). "Antihypertrophic actions of the natriuretic peptides in adult rat cardiomyocytes: importance of cyclic GMP." *Cardiovasc Res* **57**(2): 515-522.
- Roy, B., Mo, E., Vernon, J. and Garthwaite, J. (2008). "Probing the presence of the ligand-binding haem in cellular nitric oxide receptors." *Br J Pharmacol* **153**(7): 1495-1504.
- Roy, S., Morayo Akande, A., Large, R. J., Webb, T. I., et al. (2012). "Structure-activity relationships of a novel group of large-conductance Ca(2+)-activated K(+) (BK) channel modulators: the GoSlo-SR family." *ChemMedChem* **7**(10): 1763-1769.
- Rudolph, V., Rudolph, T. K., Schopfer, F. J., Bonacci, G., et al. (2010). "Endogenous generation and protective effects of nitro-fatty acids in a murine model of focal cardiac ischaemia and reperfusion." *Cardiovasc Res* **85**(1): 155-166.
- Ruiz-Meana, M., Abellan, A., Miro-Casas, E., Agullo, E., et al. (2009). "Role of sarcoplasmic reticulum in mitochondrial permeability transition and cardiomyocyte death during reperfusion." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **297**(4): H1281-1289.
- Ruiz-Meana, M., Garcia-Dorado, D., Gonzalez, M. A., Barrabes, J. A., et al. (1995). "Effect of osmotic stress on sarcolemmal integrity of isolated cardiomyocytes following transient metabolic inhibition." *Cardiovasc Res* **30**(1): 64-69.
- Ruiz-Meana, M., Garcia-Dorado, D., Julia, M., Gonzalez, M. A., et al. (1996). "Pre-treatment with trimetazidine increases sarcolemmal mechanical resistance in reoxygenated myocytes." *Cardiovasc Res* **32**(3): 587-592.
- Ruth, P., Landgraf, W., Keilbach, A., May, B., et al. (1991). "The activation of expressed cGMP-dependent protein kinase isozymes I alpha and I beta is determined by the different amino-termini." *Eur J Biochem* **202**(3): 1339-1344.
- Ruttiger, L., Sausbier, M., Zimmermann, U., Winter, H., et al. (2004). "Deletion of the Ca²⁺-activated potassium (BK) alpha-subunit but not the BKbeta1-subunit leads to progressive hearing loss." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(35): 12922-12927.
- Salloum, F. N., Chau, V. Q., Hoke, N. N., Abbate, A., et al. (2009). "Phosphodiesterase-5 inhibitor, tadalafil, protects against myocardial ischemia/reperfusion through protein-kinase g-dependent generation of hydrogen sulfide." *Circulation* **120**(11 Suppl): S31-36.
- Salloum, F. N., Das, A., Samidurai, A., Hoke, N. N., et al. (2012). "Cinaciguat, a novel activator of soluble guanylate cyclase, protects against ischemia/reperfusion injury: role of hydrogen sulfide." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **302**(6): H1347-1354.
- Salloum, F. N., Ockaili, R. A., Wittkamp, M., Marwaha, V. R., et al. (2006). "Vardenafil: a novel type 5 phosphodiesterase inhibitor reduces myocardial infarct size following ischemia/reperfusion injury via opening of mitochondrial K(ATP) channels in rabbits." *J Mol Cell Cardiol* **40**(3): 405-411.
- Salloum, F. N., Takenoshita, Y., Ockaili, R. A., Daoud, V. P., et al. (2007). "Sildenafil and vardenafil but not nitroglycerin limit myocardial infarction through opening of mitochondrial K(ATP) channels when administered at reperfusion following ischemia in rabbits." *J Mol Cell Cardiol* **42**(2): 453-458.
- Sandberg, M., Natarajan, V., Ronander, I., Kalderon, D., et al. (1989). "Molecular cloning and predicted full-length amino acid sequence of the type I beta isozyme of cGMP-dependent protein kinase from human placenta. Tissue distribution and developmental changes in rat." *FEBS Lett* **255**(2): 321-329.

- Sato, T., Saito, T., Saegusa, N. and Nakaya, H. (2005). "Mitochondrial Ca²⁺-activated K⁺ channels in cardiac myocytes: a mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A." *Circulation* **111**(2): 198-203.
- Sausbier, M., Arntz, C., Bucurenciu, I., Zhao, H., et al. (2005). "Elevated blood pressure linked to primary hyperaldosteronism and impaired vasodilation in BK channel-deficient mice." *Circulation* **112**(1): 60-68.
- Sausbier, M., Hu, H., Arntz, C., Feil, S., et al. (2004). "Cerebellar ataxia and Purkinje cell dysfunction caused by Ca²⁺-activated K⁺ channel deficiency." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(25): 9474-9478.
- Sausbier, M., Matos, J. E., Sausbier, U., Beranek, G., et al. (2006). "Distal colonic K(+) secretion occurs via BK channels." *J Am Soc Nephrol* **17**(5): 1275-1282.
- Sausbier, M., Schubert, R., Voigt, V., Hirneiss, C., et al. (2000). "Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation." *Circ Res* **87**(9): 825-830.
- Savaria, D., Lanoue, C., Cadieux, A. and Rousseau, E. (1992). "Large conducting potassium channel reconstituted from airway smooth muscle." *Am J Physiol* **262**(3 Pt 1): L327-336.
- Sawyer, D. B. and Colucci, W. S. (2000). "Mitochondrial oxidative stress in heart failure: "oxygen wastage" revisited." *Circ Res* **86**(2): 119-120.
- Schafer, C., Ladilov, Y., Inserte, J., Schafer, M., et al. (2001). "Role of the reverse mode of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury." *Cardiovasc Res* **51**(2): 241-250.
- Scherrer-Crosbie, M., Ullrich, R., Bloch, K. D., Nakajima, H., et al. (2001). "Endothelial nitric oxide synthase limits left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice." *Circulation* **104**(11): 1286-1291.
- Schlossmann, J., Ammendola, A., Ashman, K., Zong, X., et al. (2000). "Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP₃ receptor and cGMP kinase I β ." *Nature* **404**(6774): 197-201.
- Schluter, K. D., Jakob, G., Ruiz-Meana, M., Garcia-Dorado, D., et al. (1996). "Protection of reoxygenated cardiomyocytes against osmotic fragility by nitric oxide donors." *Am J Physiol* **271**(2 Pt 2): H428-434.
- Schmidt, K., Tissier, R., Ghaleh, B., Drogies, T., et al. (2010). "Cardioprotective effects of mineralocorticoid receptor antagonists at reperfusion." *Eur Heart J* **31**(13): 1655-1662.
- Schreiber, M. and Salkoff, L. (1997). "A novel calcium-sensing domain in the BK channel." *Biophys J* **73**(3): 1355-1363.
- Schubert, R. and Nelson, M. T. (2001). "Protein kinases: tuners of the BKCa channel in smooth muscle." *Trends Pharmacol Sci* **22**(10): 505-512.
- Schulz, R., Gres, P., Skyschally, A., Duschin, A., et al. (2003). "Ischemic preconditioning preserves connexin 43 phosphorylation during sustained ischemia in pig hearts in vivo." *FASEB J* **17**(10): 1355-1357.
- Schulz, R., Rose, J., Post, H. and Heusch, G. (1995). "Involvement of endogenous adenosine in ischaemic preconditioning in swine." *Pflugers Arch* **430**(2): 273-282.
- Schwanke, U., Konietzka, I., Duschin, A., Li, X., et al. (2002). "No ischemic preconditioning in heterozygous connexin43-deficient mice." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**(4): H1740-1742.
- Sefrin, P. and Lafontaine, B. (2004). "[Prehospital treatment of the acute coronary syndrome in the emergency medical services in Bavaria]." *Dtsch Med Wochenschr* **129**(39): 2025-2031.
- Seharaseyon, J., Ohler, A., Sasaki, N., Fraser, H., et al. (2000). "Molecular composition of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels probed by viral Kir gene transfer." *J Mol Cell Cardiol* **32**(11): 1923-1930.
- Senzaki, H., Smith, C. J., Juang, G. J., Isoda, T., et al. (2001). "Cardiac phosphodiesterase 5 (cGMP-specific) modulates beta-adrenergic signaling in vivo and is down-regulated in heart failure." *FASEB J* **15**(10): 1718-1726.
- Shepherd, D. L., Nichols, C. E., Croston, T. L., McLaughlin, S. L., et al. (2016). "Early detection of cardiac dysfunction in the type 1 diabetic heart using speckle-tracking based strain imaging." *J Mol Cell Cardiol* **90**: 74-83.
- Shesely, E. G., Maeda, N., Kim, H. S., Desai, K. M., et al. (1996). "Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(23): 13176-13181.

- Shi, J., Krishnamoorthy, G., Yang, Y., Hu, L., et al. (2002). "Mechanism of magnesium activation of calcium-activated potassium channels." *Nature* **418**(6900): 876-880.
- Shi, Y., Jiang, M. T., Su, J., Hutchins, W., et al. (2007). "Mitochondrial big conductance KCa channel and cardioprotection in infant rabbit heart." *J Cardiovasc Pharmacol* **50**(5): 497-502.
- Shiga, T. and Suzuki, N. (2005). "Amphipathic alpha-helix mediates the heterodimerization of soluble guanylyl cyclase." *Zooloog Sci* **22**(7): 735-742.
- Shiva, S., Sack, M. N., Greer, J. J., Duranski, M., et al. (2007). "Nitrite augments tolerance to ischemia/reperfusion injury via the modulation of mitochondrial electron transfer." *J Exp Med* **204**(9): 2089-2102.
- Siddiqi, N., Neil, C., Bruce, M., MacLennan, G., et al. (2014). "Intravenous sodium nitrite in acute ST-elevation myocardial infarction: a randomized controlled trial (NIAMI)." *Eur Heart J* **35**(19): 1255-1262.
- Siegmund, B., Schlack, W., Ladilov, Y. V., Balsler, C., et al. (1997). "Halothane protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture." *Circulation* **96**(12): 4372-4379.
- Singh, H., Lu, R., Bopassa, J. C., Meredith, A. L., et al. (2013). "MitoBK(Ca) is encoded by the Kcnma1 gene, and a splicing sequence defines its mitochondrial location." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(26): 10836-10841.
- Singh, H., Stefani, E. and Toro, L. (2012). "Intracellular BK(Ca) (iBK(Ca)) channels." *J Physiol* **590**(23): 5937-5947.
- Sips, P. Y., Brouckaert, P. and Ichinose, F. (2011). "The alpha1 isoform of soluble guanylate cyclase regulates cardiac contractility but is not required for ischemic preconditioning." *Basic Res Cardiol* **106**(4): 635-643.
- Skryabin, B. V., Holtwick, R., Fabritz, L., Kruse, M. N., et al. (2004). "Hypervolemic hypertension in mice with systemic inactivation of the (floxed) guanylyl cyclase-A gene by alphaMHC-Cre-mediated recombination." *Genesis* **39**(4): 288-298.
- Smith, R. M., Suleman, N., Lacerda, L., Opie, L. H., et al. (2004). "Genetic depletion of cardiac myocyte STAT-3 abolishes classical preconditioning." *Cardiovasc Res* **63**(4): 611-616.
- Smolenski, A., Bachmann, C., Reinhard, K., Honig-Liedl, P., et al. (1998). "Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody." *J Biol Chem* **273**(32): 20029-20035.
- Soderling, S. H., Bayuga, S. J. and Beavo, J. A. (1998a). "Cloning and characterization of a cAMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(15): 8991-8996.
- Soderling, S. H., Bayuga, S. J. and Beavo, J. A. (1998b). "Identification and characterization of a novel family of cyclic nucleotide phosphodiesterases." *J Biol Chem* **273**(25): 15553-15558.
- Soeki, T., Kishimoto, I., Okumura, H., Tokudome, T., et al. (2005). "C-type natriuretic peptide, a novel antifibrotic and antihypertrophic agent, prevents cardiac remodeling after myocardial infarction." *J Am Coll Cardiol* **45**(4): 608-616.
- Solenkova, N. V., Solodushko, V., Cohen, M. V. and Downey, J. M. (2006). "Endogenous adenosine protects preconditioned heart during early minutes of reperfusion by activating Akt." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**(1): H441-449.
- Soltysinska, E., Bentzen, B. H., Barthmes, M., Hattel, H., et al. (2014). "KCNMA1 encoded cardiac BK channels afford protection against ischemia-reperfusion injury." *PLoS One* **9**(7): e103402.
- Somlyo, A. P. and Somlyo, A. V. (2000). "Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II." *J Physiol* **522 Pt 2**: 177-185.
- Sonnenburg, W. K., Seger, D., Kwak, K. S., Huang, J., et al. (1995). "Identification of inhibitory and calmodulin-binding domains of the PDE1A1 and PDE1A2 calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases." *J Biol Chem* **270**(52): 30989-31000.
- Sorensen, M. V., Matos, J. E., Sausbier, M., Sausbier, U., et al. (2008). "Aldosterone increases KCa1.1 (BK) channel-mediated colonic K+ secretion." *J Physiol* **586**(Pt 17): 4251-4264.
- Sorensson, P., Saleh, N., Bouvier, F., Bohm, F., et al. (2010). "Effect of postconditioning on infarct size in patients with ST elevation myocardial infarction." *Heart* **96**(21): 1710-1715.

- Spiessberger, B., Bernhard, D., Herrmann, S., Feil, S., et al. (2009). "cGMP-dependent protein kinase II and aldosterone secretion." FEBS J **276**(4): 1007-1013.
- Sprossmann, F., Pankert, P., Sausbier, U., Wirth, A., et al. (2009). "Inducible knockout mutagenesis reveals compensatory mechanisms elicited by constitutive BK channel deficiency in overactive murine bladder." FEBS J **276**(6): 1680-1697.
- Staat, P., Rioufol, G., Piot, C., Cottin, Y., et al. (2005). "Postconditioning the human heart." Circulation **112**(14): 2143-2148.
- Stasch, J. P., Schmidt, P. M., Nedvetsky, P. I., Nedvetskaya, T. Y., et al. (2006). "Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels." J Clin Invest **116**(9): 2552-2561.
- Sternberg, N. and Hamilton, D. (1981). "Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites." J Mol Biol **150**(4): 467-486.
- Stocker, M. (2004). "Ca(2+)-activated K⁺ channels: molecular determinants and function of the SK family." Nat Rev Neurosci **5**(10): 758-770.
- Stowe, D. F., Aldakkak, M., Camara, A. K., Riess, M. L., et al. (2006). "Cardiac mitochondrial preconditioning by Big Ca²⁺-sensitive K⁺ channel opening requires superoxide radical generation." Am J Physiol Heart Circ Physiol **290**(1): H434-440.
- Stralin, P., Karlsson, K., Johansson, B. O. and Marklund, S. L. (1995). "The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase." Arterioscler Thromb Vasc Biol **15**(11): 2032-2036.
- Strom, J., Swyers, T., Wilson, D., Unger, E., et al. (2014). "Dodecafluoropentane emulsion elicits cardiac protection against myocardial infarction through an ATP-Sensitive K⁺ channel dependent mechanism." Cardiovasc Drugs Ther **28**(6): 541-547.
- Suleiman, M. S., Halestrap, A. P. and Griffiths, E. J. (2001). "Mitochondria: a target for myocardial protection." Pharmacol Ther **89**(1): 29-46.
- Sun, J., Aponte, A. M., Kohr, M. J., Tong, G., et al. (2013). "Essential role of nitric oxide in acute ischemic preconditioning: S-nitros(yl)ation versus sGC/cGMP/PKG signaling?" Free Radic Biol Med **54**: 105-112.
- Surks, H. K., Mochizuki, N., Kasai, Y., Georgescu, S. P., et al. (1999). "Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP- dependent protein kinase I α ." Science **286**(5444): 1583-1587.
- Susin, S. A., Zamzami, N., Castedo, M., Hirsch, T., et al. (1996). "Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease." J Exp Med **184**(4): 1331-1341.
- Suzuki, K., Murtuza, B., Smolenski, R. T., Sammut, I. A., et al. (2001). "Overexpression of interleukin-1 receptor antagonist provides cardioprotection against ischemia-reperfusion injury associated with reduction in apoptosis." Circulation **104**(12 Suppl 1): I308-I303.
- Suzuki, M., Saito, T., Sato, T., Tamagawa, M., et al. (2003). "Cardioprotective effect of diazoxide is mediated by activation of sarcolemmal but not mitochondrial ATP-sensitive potassium channels in mice." Circulation **107**(5): 682-685.
- Suzuki, M., Sasaki, N., Miki, T., Sakamoto, N., et al. (2002). "Role of sarcolemmal K(ATP) channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in mice." J Clin Invest **109**(4): 509-516.
- Swain, L., Kesemeyer, A., Meyer-Roxlau, S., Vettel, C., et al. (2016). "Redox Imaging Using Cardiac Myocyte-Specific Transgenic Biosensor Mice." Circ Res **119**(9): 1004-1016.
- Swayze, R. D. and Braun, A. P. (2001). "A catalytically inactive mutant of type I cGMP-dependent protein kinase prevents enhancement of large conductance, calcium-sensitive K⁺ channels by sodium nitroprusside and cGMP." J Biol Chem **276**(23): 19729-19737.
- Szewczyk, A., Jarmuszkiewicz, W. and Kunz, W. S. (2009). "Mitochondrial potassium channels." IUBMB Life **61**(2): 134-143.
- Tait, S. W. and Green, D. R. (2012). "Mitochondria and cell signalling." J Cell Sci **125**(Pt 4): 807-815.
- Takano, H., Manchikalapudi, S., Tang, X. L., Qiu, Y., et al. (1998). "Nitric oxide synthase is the mediator of late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits." Circulation **98**(5): 441-449.

- Takasago, T., Imagawa, T. and Shigekawa, M. (1989). "Phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor by cAMP-dependent protein kinase." *J Biochem* **106**(5): 872-877.
- Takefuji, M., Wirth, A., Lukasova, M., Takefuji, S., et al. (2012). "G(13)-mediated signaling pathway is required for pressure overload-induced cardiac remodeling and heart failure." *Circulation* **126**(16): 1972-1982.
- Tang, X. D., Garcia, M. L., Heinemann, S. H. and Hoshi, T. (2004). "Reactive oxygen species impair Slo1 BK channel function by altering cysteine-mediated calcium sensing." *Nat Struct Mol Biol* **11**(2): 171-178.
- Tang, X. D., Xu, R., Reynolds, M. F., Garcia, M. L., et al. (2003). "Haem can bind to and inhibit mammalian calcium-dependent Slo1 BK channels." *Nature* **425**(6957): 531-535.
- Tarantini, G., Favaretto, E., Marra, M. P., Frigo, A. C., et al. (2012). "Postconditioning during coronary angioplasty in acute myocardial infarction: the POST-AMI trial." *Int J Cardiol* **162**(1): 33-38.
- Task Force on the management of, S. T. s. e. a. m. i. o. t. E. S. o. C., Steg, P. G., James, S. K., Atar, D., et al. (2012). "ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation." *Eur Heart J* **33**(20): 2569-2619.
- Thygesen, K., Alpert, J. S., Jaffe, A. S., Simoons, M. L., et al. (2012). "Third universal definition of myocardial infarction." *J Am Coll Cardiol* **60**(16): 1581-1598.
- Tian, L., Coghill, L. S., McClafferty, H., MacDonald, S. H., et al. (2004). "Distinct stoichiometry of BKCa channel tetramer phosphorylation specifies channel activation and inhibition by cAMP-dependent protein kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(32): 11897-11902.
- Tong, H., Chen, W., Steenbergen, C. and Murphy, E. (2000). "Ischemic preconditioning activates phosphatidylinositol-3-kinase upstream of protein kinase C." *Circ Res* **87**(4): 309-315.
- Tong, H., Imahashi, K., Steenbergen, C. and Murphy, E. (2002). "Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta during preconditioning through a phosphatidylinositol-3-kinase--dependent pathway is cardioprotective." *Circ Res* **90**(4): 377-379.
- Tranum-Jensen, J., Janse, M. J., Fiolet, W. T., Krieger, W. J., et al. (1981). "Tissue osmolality, cell swelling, and reperfusion in acute regional myocardial ischemia in the isolated porcine heart." *Circ Res* **49**(2): 364-381.
- Trube, G. and Hescheler, J. (1984). "Inward-rectifying channels in isolated patches of the heart cell membrane: ATP-dependence and comparison with cell-attached patches." *Pflugers Arch* **401**(2): 178-184.
- Tsan, M. F. (2001). "Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity: lessons from transgenic and knockout mice (Review)." *Int J Mol Med* **7**(1): 13-19.
- Tschope, C., Heringer-Walther, S., Koch, M., Spillmann, F., et al. (2000). "Myocardial bradykinin B2-receptor expression at different time points after induction of myocardial infarction." *J Hypertens* **18**(2): 223-228.
- Turrens, J. F. (2003). "Mitochondrial formation of reactive oxygen species." *J Physiol* **552**(Pt 2): 335-344.
- Vaandrager, A. B., Ehlert, E. M., Jarchau, T., Lohmann, S. M., et al. (1996). "N-terminal myristoylation is required for membrane localization of cGMP-dependent protein kinase type II." *J Biol Chem* **271**(12): 7025-7029.
- van Deel, E. D., Lu, Z., Xu, X., Zhu, G., et al. (2008). "Extracellular superoxide dismutase protects the heart against oxidative stress and hypertrophy after myocardial infarction." *Free Radic Biol Med* **44**(7): 1305-1313.
- Van Remmen, H., Ikeno, Y., Hamilton, M., Pahlavani, M., et al. (2003). "Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging." *Physiol Genomics* **16**(1): 29-37.
- Vandeput, F., Krall, J., Ockaili, R., Salloum, F. N., et al. (2009). "cGMP-hydrolytic activity and its inhibition by sildenafil in normal and failing human and mouse myocardium." *J Pharmacol Exp Ther* **330**(3): 884-891.
- Vinten-Johansen, J., Yellon, D. M. and Opie, L. H. (2005). "Postconditioning: a simple, clinically applicable procedure to improve revascularization in acute myocardial infarction." *Circulation* **112**(14): 2085-2088.
- Wagner, C., Pfeifer, A., Ruth, P., Hofmann, F., et al. (1998). "Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression." *J Clin Invest* **102**(8): 1576-1582.

- Wallis, R. M., Corbin, J. D., Francis, S. H. and Ellis, P. (1999). "Tissue distribution of phosphodiesterase families and the effects of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelet function, and the contractile responses of trabeculae carneae and aortic rings in vitro." Am J Cardiol **83**(5A): 3C-12C.
- Wang, C., Hu, S. M., Xie, H., Qiao, S. G., et al. (2015). "Role of mitochondrial ATP-sensitive potassium channel-mediated PKC-epsilon in delayed protection against myocardial ischemia/reperfusion injury in isolated hearts of sevoflurane-preconditioned rats." Braz J Med Biol Res **48**(6): 528-536.
- Wang, X., Yin, C., Xi, L. and Kukreja, R. C. (2004). "Opening of Ca²⁺-activated K⁺ channels triggers early and delayed preconditioning against I/R injury independent of NOS in mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol **287**(5): H2070-2077.
- Wang, Y. J., Sung, R. J., Lin, M. W. and Wu, S. N. (2006). "Contribution of BK(Ca)-channel activity in human cardiac fibroblasts to electrical coupling of cardiomyocytes-fibroblasts." J Membr Biol **213**(3): 175-185.
- Wang, Z. F., Wang, N. P., Harmouche, S., Philip, T., et al. (2013). "Postconditioning promotes the cardiac repair through balancing collagen degradation and synthesis after myocardial infarction in rats." Basic Res Cardiol **108**(1): 318.
- Wang, Z. W. (2008). "Regulation of synaptic transmission by presynaptic CaMKII and BK channels." Mol Neurobiol **38**(2): 153-166.
- Webb, A., Bond, R., McLean, P., Uppal, R., et al. (2004). "Reduction of nitrite to nitric oxide during ischemia protects against myocardial ischemia-reperfusion damage." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(37): 13683-13688.
- Wedel, B., Humbert, P., Harteneck, C., Foerster, J., et al. (1994). "Mutation of His-105 in the beta 1 subunit yields a nitric oxide-insensitive form of soluble guanylyl cyclase." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(7): 2592-2596.
- Wegener, J. W., Nawrath, H., Wolfgruber, W., Kuhbandner, S., et al. (2002). "cGMP-dependent protein kinase I mediates the negative inotropic effect of cGMP in the murine myocardium." Circ Res **90**(1): 18-20.
- Weiland, U., Haendeler, J., Ihling, C., Albus, U., et al. (2000). "Inhibition of endogenous nitric oxide synthase potentiates ischemia-reperfusion-induced myocardial apoptosis via a caspase-3 dependent pathway." Cardiovasc Res **45**(3): 671-678.
- Weisiger, R. A. and Fridovich, I. (1973a). "Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization." J Biol Chem **248**(13): 4793-4796.
- Weisiger, R. A. and Fridovich, I. (1973b). "Superoxide dismutase. Organelle specificity." J Biol Chem **248**(10): 3582-3592.
- Wellman, G. C. and Nelson, M. T. (2003). "Signaling between SR and plasmalemma in smooth muscle: sparks and the activation of Ca²⁺-sensitive ion channels." Cell Calcium **34**(3): 211-229.
- Werner, M. E., Meredith, A. L., Aldrich, R. W. and Nelson, M. T. (2008). "Hypercontractility and impaired sildenafil relaxations in the BKCa channel deletion model of erectile dysfunction." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **295**(1): R181-188.
- Werner, M. E., Zvara, P., Meredith, A. L., Aldrich, R. W., et al. (2005). "Erectile dysfunction in mice lacking the large-conductance calcium-activated potassium (BK) channel." J Physiol **567**(Pt 2): 545-556.
- Wernet, W., Flockerzi, V. and Hofmann, F. (1989). "The cDNA of the two isoforms of bovine cGMP-dependent protein kinase." FEBS Lett **251**(1-2): 191-196.
- Wirth, A., Benyo, Z., Lukasova, M., Leutgeb, B., et al. (2008). "G12-G13-LARG-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension." Nat Med **14**(1): 64-68.
- Wojtovich, A. P., Nadochiy, S. M., Urciuoli, W. R., Smith, C. O., et al. (2013). "A non-cardiomyocyte autonomous mechanism of cardioprotection involving the SLO1 BK channel." PeerJ **1**: e48.
- Wolfensohn, S. and Lloyd, M. (2003). Handbook of Laboratory Animal - Management and Welfare, Wiley-Blackwell Publishing Ltd.
- Wollert, K. C., Yurukova, S., Kilic, A., Begrow, F., et al. (2003). "Increased effects of C-type natriuretic peptide on contractility and calcium regulation in murine hearts overexpressing cyclic GMP-dependent protein kinase I." Br J Pharmacol **140**(7): 1227-1236.

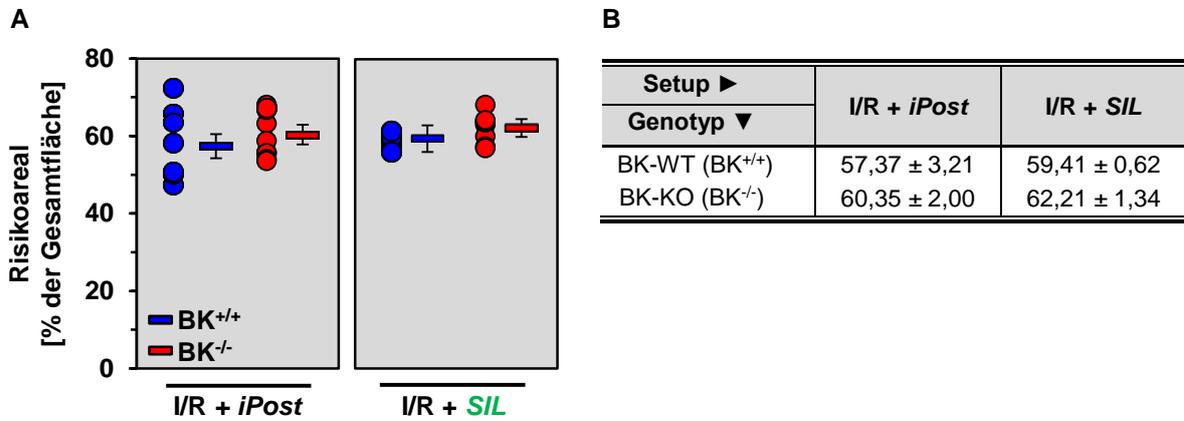
- Wu, S. N., Liu, S. I. and Huang, M. H. (2004). "Cilostazol, an inhibitor of type 3 phosphodiesterase, stimulates large-conductance, calcium-activated potassium channels in pituitary GH3 cells and pheochromocytoma PC12 cells." *Endocrinology* **145**(3): 1175-1184.
- Xia, X. M., Zeng, X. and Lingle, C. J. (2002). "Multiple regulatory sites in large-conductance calcium-activated potassium channels." *Nature* **418**(6900): 880-884.
- Xu, W., Liu, Y., Wang, S., McDonald, T., et al. (2002). "Cytoprotective role of Ca²⁺- activated K⁺ channels in the cardiac inner mitochondrial membrane." *Science* **298**(5595): 1029-1033.
- Xuan, Y. T., Guo, Y., Han, H., Zhu, Y., et al. (2001). "An essential role of the JAK-STAT pathway in ischemic preconditioning." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(16): 9050-9055.
- Xue, F., Yang, X., Zhang, B., Zhao, C., et al. (2010). "Postconditioning the human heart in percutaneous coronary intervention." *Clin Cardiol* **33**(7): 439-444.
- Yamahara, K., Itoh, H., Chun, T. H., Ogawa, Y., et al. (2003). "Significance and therapeutic potential of the natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway in vascular regeneration." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(6): 3404-3409.
- Yan, J. and Aldrich, R. W. (2012). "BK potassium channel modulation by leucine-rich repeat-containing proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(20): 7917-7922.
- Yang, H., Hu, L., Shi, J., Delaloye, K., et al. (2007). "Mg²⁺ mediates interaction between the voltage sensor and cytosolic domain to activate BK channels." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(46): 18270-18275.
- Yang, H., Shi, J., Zhang, G., Yang, J., et al. (2008). "Activation of Slo1 BK channels by Mg²⁺ coordinated between the voltage sensor and RCK1 domains." *Nat Struct Mol Biol* **15**(11): 1152-1159.
- Yang, X. M., Philipp, S., Downey, J. M. and Cohen, M. V. (2005). "Postconditioning's protection is not dependent on circulating blood factors or cells but involves adenosine receptors and requires PI3-kinase and guanylyl cyclase activation." *Basic Res Cardiol* **100**(1): 57-63.
- Yang, X. M., Philipp, S., Downey, J. M. and Cohen, M. V. (2006). "Atrial natriuretic peptide administered just prior to reperfusion limits infarction in rabbit hearts." *Basic Res Cardiol* **101**(4): 311-318.
- Yang, X. M., Proctor, J. B., Cui, L., Krieg, T., et al. (2004). "Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways." *J Am Coll Cardiol* **44**(5): 1103-1110.
- Ytrehus, K., Liu, Y. and Downey, J. M. (1994). "Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation." *Am J Physiol* **266**(3 Pt 2): H1145-1152.
- Yuen, P. S., Potter, L. R. and Garbers, D. L. (1990). "A new form of guanylyl cyclase is preferentially expressed in rat kidney." *Biochemistry* **29**(49): 10872-10878.
- Zabel, U., Kleinschnitz, C., Oh, P., Nedvetsky, P., et al. (2002). "Calcium-dependent membrane association sensitizes soluble guanylyl cyclase to nitric oxide." *Nat Cell Biol* **4**(4): 307-311.
- Zaccolo, M. and Movsesian, M. A. (2007). "cAMP and cGMP signaling cross-talk: role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology." *Circ Res* **100**(11): 1569-1578.
- Zalman, L. S., Nikaido, H. and Kagawa, Y. (1980). "Mitochondrial outer membrane contains a protein producing nonspecific diffusion channels." *J Biol Chem* **255**(5): 1771-1774.
- Zewail, A. M., Nawar, M., Vrtovec, B., Eastwood, C., et al. (2003). "Intravenous milrinone in treatment of advanced congestive heart failure." *Tex Heart Inst J* **30**(2): 109-113.
- Zhang, J., Li, M., Zhang, Z., Zhu, R., et al. (2016). "The mitochondrial BKCa channel cardiac interactome reveals BKCa association with the mitochondrial import receptor subunit Tom22, and the adenine nucleotide translocator." *Mitochondrion*.
- Zhang, T., Zhuang, S., Casteel, D. E., Looney, D. J., et al. (2007a). "A cysteine-rich LIM-only protein mediates regulation of smooth muscle-specific gene expression by cGMP-dependent protein kinase." *J Biol Chem* **282**(46): 33367-33380.
- Zhang, W., Han, Y., Meng, G., Bai, W., et al. (2014). "Direct renin inhibition with aliskiren protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by activating nitric oxide synthase signaling in spontaneously hypertensive rats." *J Am Heart Assoc* **3**(1): e000606.

LITERATURVERZEICHNIS

- Zhang, Z., Huang, H., Liu, P., Tang, C., et al. (2007b). "Hydrogen sulfide contributes to cardioprotection during ischemia-reperfusion injury by opening K ATP channels." Can J Physiol Pharmacol **85**(12): 1248-1253.
- Zhao, Y., Brandish, P. E., Di Valentin, M., Schelvis, J. P., et al. (2000a). "Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ." Biochemistry **39**(35): 10848-10854.
- Zhao, Y., Schelvis, J. P., Babcock, G. T. and Marletta, M. A. (1998). "Identification of histidine 105 in the beta1 subunit of soluble guanylate cyclase as the heme proximal ligand." Biochemistry **37**(13): 4502-4509.
- Zhao, Z. Q., Corvera, J. S., Halkos, M. E., Kerendi, F., et al. (2003). "Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning." Am J Physiol Heart Circ Physiol **285**(2): H579-588.
- Zhao, Z. Q., Nakamura, M., Wang, N. P., Wilcox, J. N., et al. (2000b). "Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death." Cardiovasc Res **45**(3): 651-660.
- Zhou, X., Wulfsen, I., Korth, M., McClafferty, H., et al. (2012). "Palmitoylation and membrane association of the stress axis regulated insert (STREX) controls BK channel regulation by protein kinase C." J Biol Chem **287**(38): 32161-32171.
- Zhou, X. B., Arntz, C., Kamm, S., Motejlek, K., et al. (2001). "A molecular switch for specific stimulation of the BKCa channel by cGMP and cAMP kinase." J Biol Chem **276**(46): 43239-43245.
- Zhou, X. B., Wulfsen, I., Utku, E., Sausbier, U., et al. (2010). "Dual role of protein kinase C on BK channel regulation." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(17): 8005-8010.
- Zhou, Y. and Lingle, C. J. (2014). "Paxilline inhibits BK channels by an almost exclusively closed-channel block mechanism." J Gen Physiol **144**(5): 415-440.
- Zhou, Z., Pyriochou, A., Kotanidou, A., Dalkas, G., et al. (2008). "Soluble guanylyl cyclase activation by HMR-1766 (ataciguat) in cells exposed to oxidative stress." Am J Physiol Heart Circ Physiol **295**(4): H1763-1771.
- Zong, W. X. and Thompson, C. B. (2006). "Necrotic death as a cell fate." Genes Dev **20**(1): 1-15.

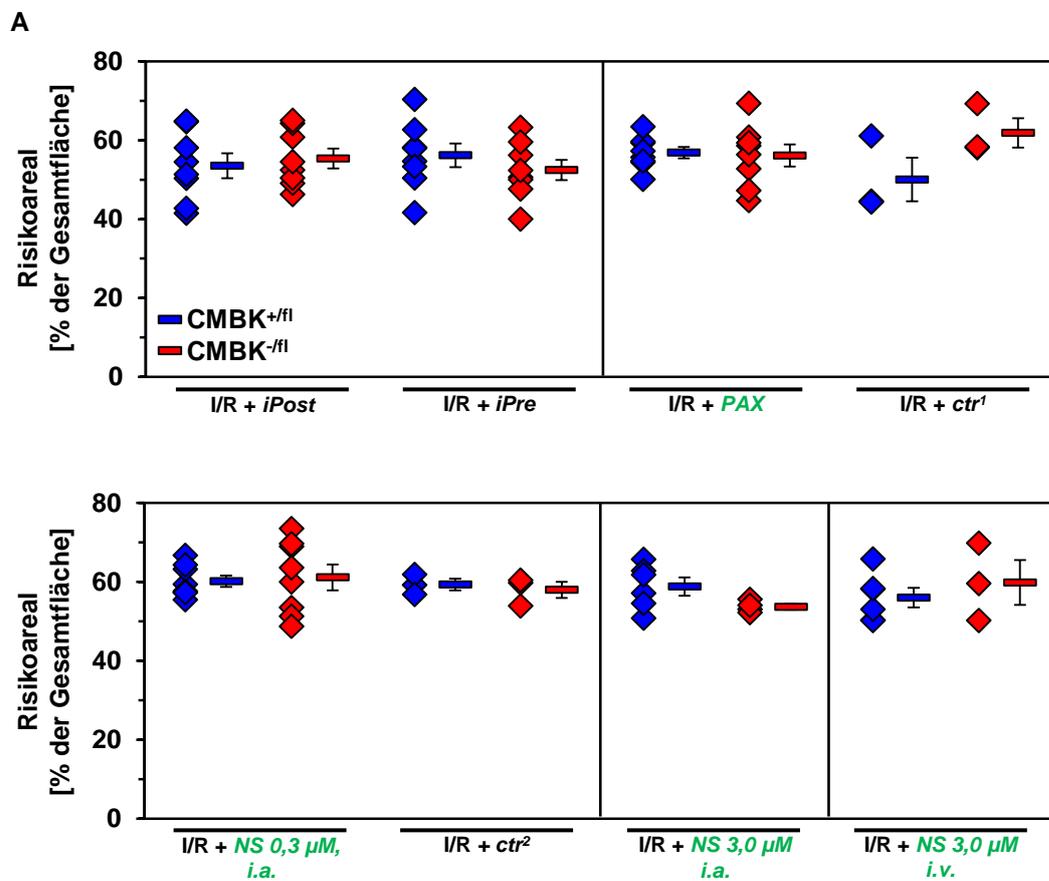
7. Anhang

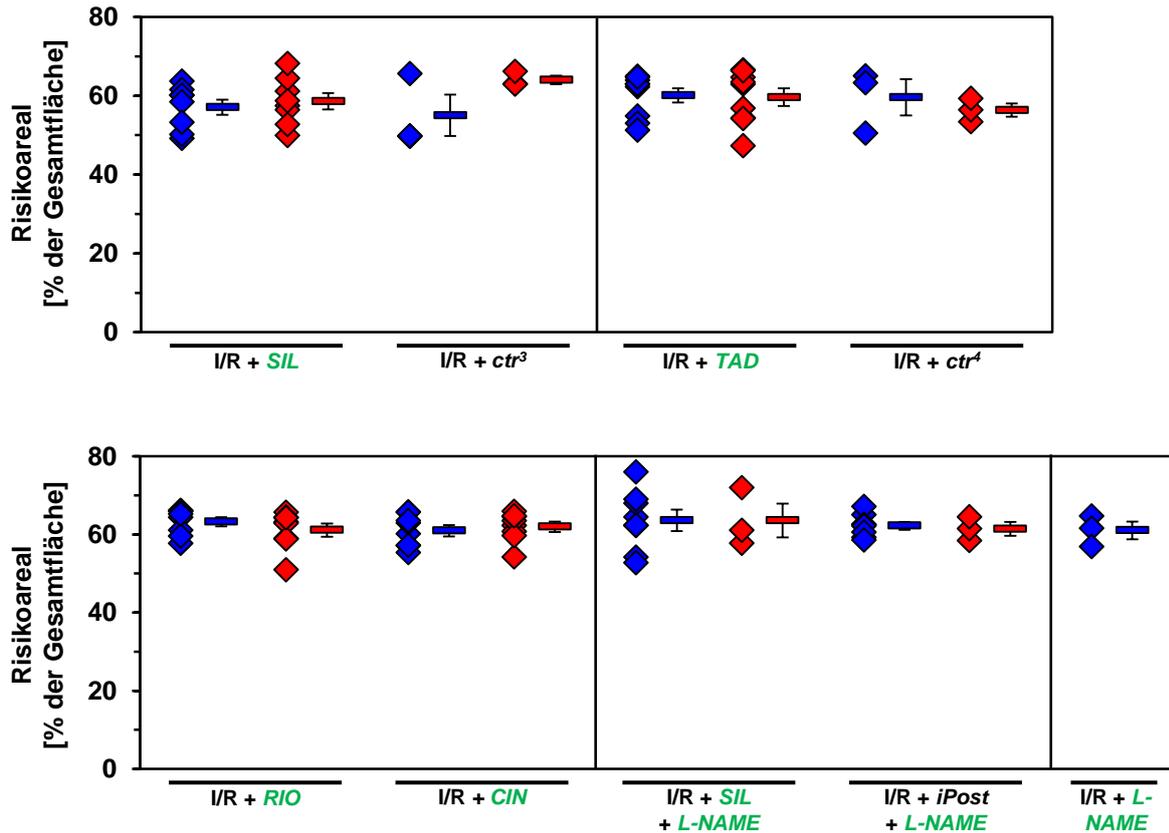
7.1 Annex-Abbildungen



Annex-Abbildung 1: Risikoareale der globalen BK-Tiere

(A+B) Die Risikoareale (in % zur Gesamtfläche) der globalen BK-WT (BK^{+/+}) und BK-KO (BK^{-/-}) unterschieden sich nach 30 min Ischämie und 120 min Reperfusion (I/R) + Postkonditionierung (iPost) bzw. I/R + Sildenafil (SIL) nicht signifikant.





B

Setup ▶	I/R + iPost	I/R + iPre	I/R + PAX	I/R + ctr ¹	I/R + NS, 0,3 μM, i.a.	I/R + ctr ²
CMBK-CTR (CMBK ^{+fl})	53,55 ± 3,14	56,20 ± 3,00	56,87 ± 1,44	50,03 ± 5,54	60,18 ± 1,43	59,33 ± 1,46
CMBK-KO (CMBK ^{-fl})	55,36 ± 2,53	52,44 ± 2,57	56,14 ± 2,78	61,88 ± 3,69	61,12 ± 3,28	57,97 ± 2,06

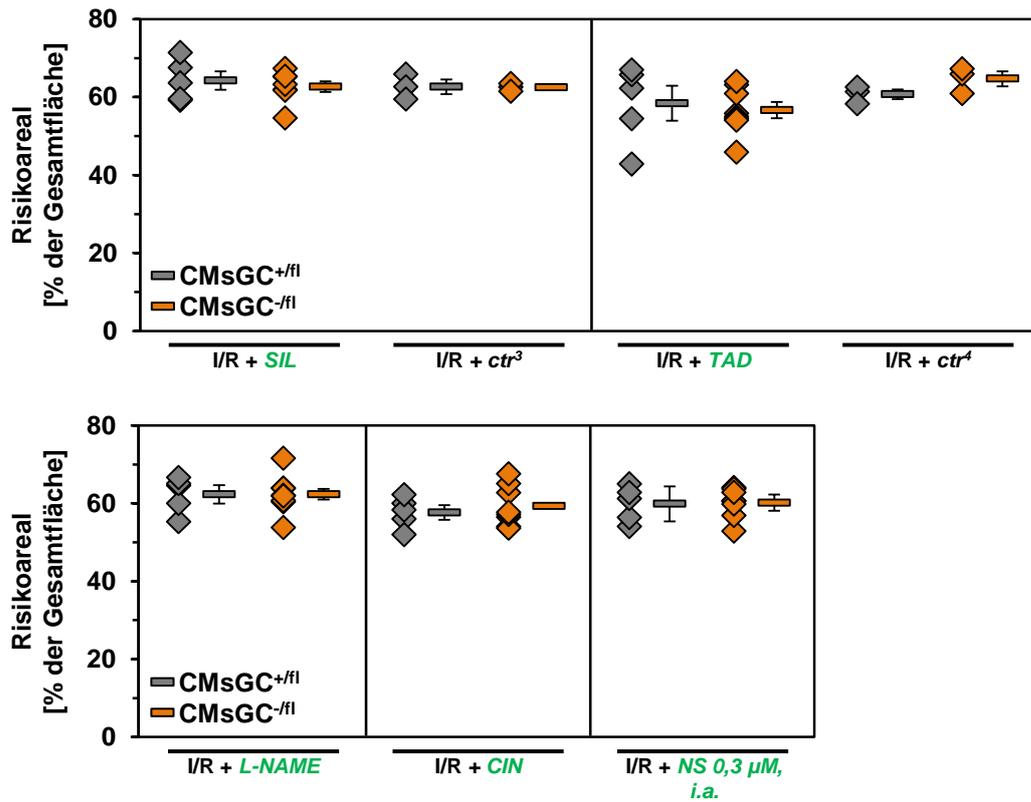
Setup ▶	I/R + NS, 3 μM, i.a.	I/R + NS, 3 μM, i.v.	I/R + SIL	I/R + ctr ³	I/R + TAD	I/R + ctr ⁴
CMBK-CTR (CMBK ^{+fl})	58,80 ± 2,29	59,83 ± 5,65	57,08 ± 1,93	55,05 ± 5,27	60,07 ± 1,81	59,62 ± 4,58
CMBK-KO (CMBK ^{-fl})	53,68 ± 0,71	55,98 ± 2,46	58,62 ± 2,11	64,01 ± 1,06	59,63 ± 2,24	56,35 ± 1,71

Setup ▶	I/R + RIO	I/R + CIN	I/R + SIL + L-NAME	I/R + iPost + L-NAME	I/R + L-NAME
CMBK-CTR (CMBK ^{+fl})	63,25 ± 1,81	60,96 ± 1,44	63,61 ± 2,72	62,23 ± 1,01	61,05 ± 2,27
CMBK-KO (CMBK ^{-fl})	61,13 ± 1,70	61,96 ± 1,33	63,59 ± 4,32	61,44 ± 1,76	-

Annex-Abbildung 2: Risikoareale der CMBK-Tiere

(A+B) Die Risikoareale (in % zur Gesamtfläche) der CMBK-CTR (CMBK^{+fl}) und CMBK-KO (CMBK^{-fl}) zeigten keine Unterschiede in den OP-Setups. I/R: 30 min Ischämie / 120 min Reperfusion; CIN: Cinaciguat; ctr¹: DMSO/H₂O von 9:1; ctr²: DMSO/0,9%ige NaCl-Lösung von 1:150; ctr³: 0,9%ige NaCl-Lösung; ctr⁴: 40 % DMSO/H₂O; iPost: Postkonditionierung; iPre: Präkonditionierung; L-NAME: N_ω-Nitro-L-Arginin-Methylester-Hydrochlorid; NS: NS11021; PAX: Paxilline; RIO: Riociguat; SIL: Sildenafil; TAD: Tadalafil.

A



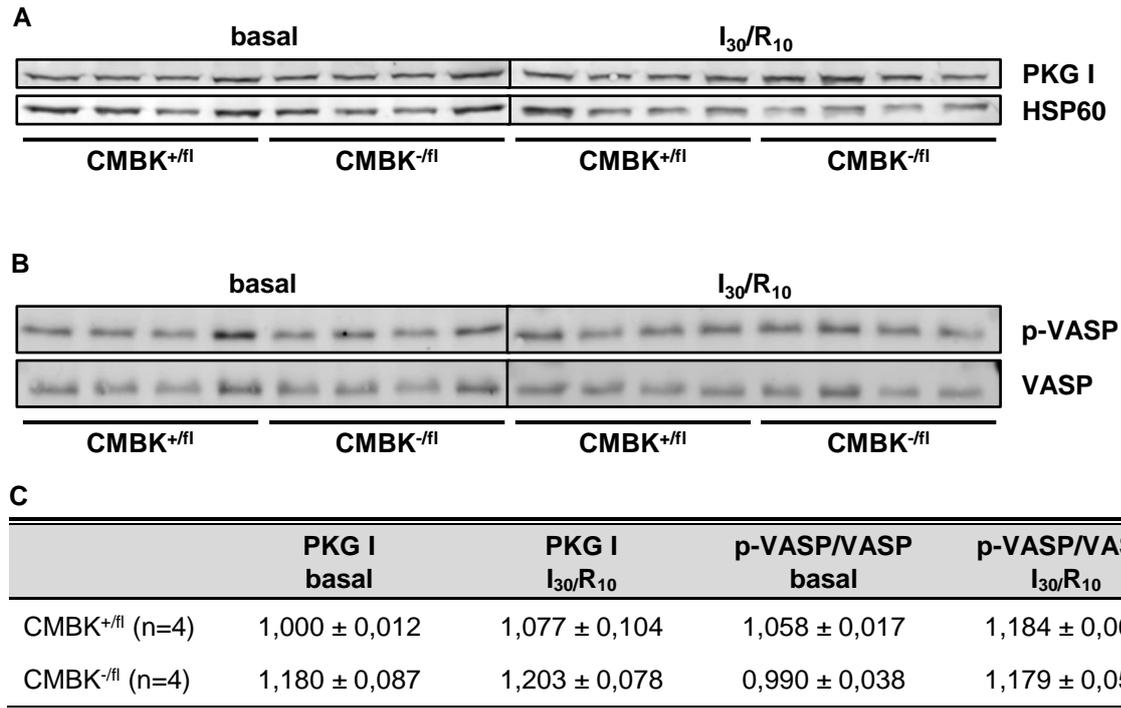
B

Setup ▶	I/R + SIL	I/R + ctr ³	I/R + TAD	I/R + ctr ⁴
CMsGC-CTR (CMsGC ^{+fl})	64,26 ± 2,35	62,65 ± 1,35	58,43 ± 4,47	60,71 ± 1,27
CMsGC-KO (CMsGC ^{-fl})	62,65 ± 1,35	62,51 ± 0,59	56,65 ± 2,09	64,70 ± 1,93

Setup ▶	I/R + L-NAME	I/R + CIN	I/R + NS, 0,3 μM, i.a.
CMsGC-CTR (CMsGC ^{+fl})	62,30 ± 2,08	57,66 ± 1,75	59,88 ± 2,03
CMsGC-KO (CMsGC ^{-fl})	62,35 ± 2,01	59,32 ± 1,84	60,19 ± 1,33

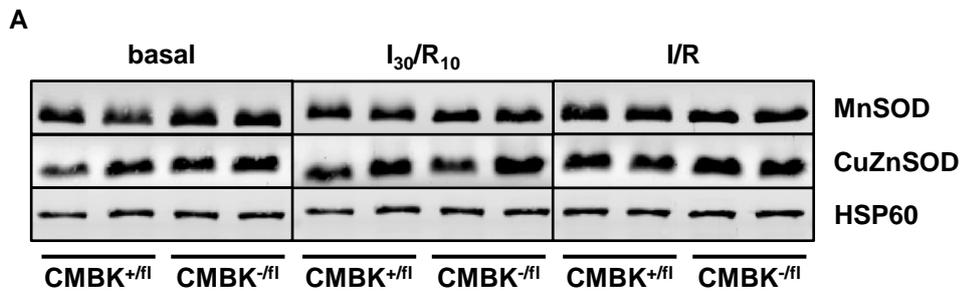
Annex-Abbildung 3: Risikoareale der CMsGC-Tiere

Die Risikoareale (in % zur Gesamtfläche) der CMsGC-CTR (CMsGC^{+fl}) und CMsGC-KO (CMsGC^{-fl}) zeigten keine Unterschiede in den OP-Setups. I/R: 30 min Ischämie / 120 min Reperfusion; CIN: Cinaciguat; ctr³: 0,9%ige NaCl-Lösung; ctr⁴: 40 % DMSO/H₂O; L-NAME: N_ω-Nitro-L-Arginin-Methylester-Hydrochlorid; NS: NS11021; SIL: Sildenafil; TAD: Tadalafil.



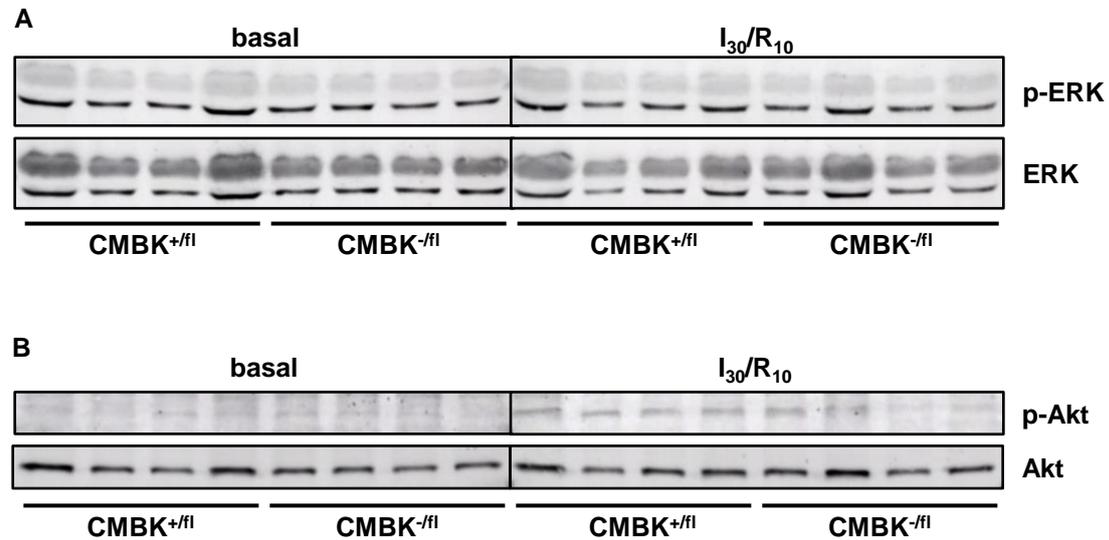
Annex-Abbildung 4: Expressionsmuster der PKG I und Phosphorylierung von VASP in CMBK-Mäusen basal und nach I₃₀/R₁₀

(A) Proteinbanden der PKG I-Expression in CMBK-CTR (CMBK^{+fl}) und CMBK-KO (CMBK^{-fl}) basal sowie nach 30 min Ischämie und 10 min Reperfusion (I₃₀/R₁₀); HSP60 als Ladungskontrolle. (B) VASP-Phosphorylierung nach I₃₀/R₁₀ in CMBK-CTR und -KO. (C) Quantifizierung der Proteinbanden



Annex-Abbildung 5: Expressionsmuster der Antioxidantien MnSOD und CuZnSOD in CMBK-Mäusen

(A) Proteinbanden der MnSOD- und CuZnSOD-Expression in CMBK-CTR (CMBK^{+fl}) und CMBK-KO (CMBK^{-fl}) basal sowie nach 30 min Ischämie und 10 bzw. 120 min Reperfusion (I₃₀/R₁₀ bzw. I/R); HSP60 als Ladungskontrolle. (B) Quantifizierung der Proteinbanden



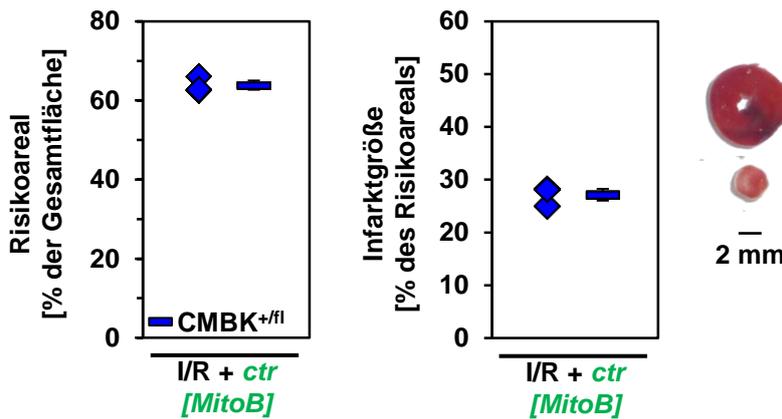
C

	p-ERK/ERK basal	p-ERK/ERK I ₃₀ /R ₁₀	p-Akt/Akt basal	p-Akt/Akt I ₃₀ /R ₁₀
CMBK ^{+fl} (n=4)	1,000 ± 0,012	1,195 ± 0,037	0,034 ± 0,007	0,082 ± 0,008
CMBK ^{-fl} (n=4)	0,998 ± 0,022	1,004 ± 0,005	0,034 ± 0,004	0,056 ± 0,010

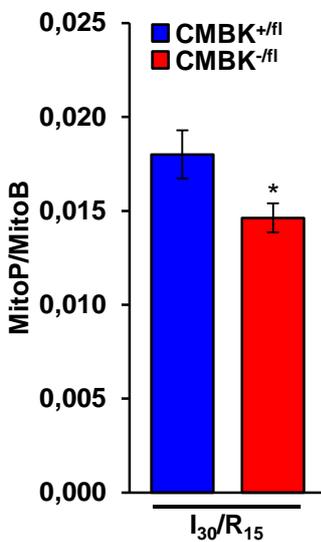
Annex-Abbildung 6: Phosphorylierungsstatus von ERK und Akt in CMBK-Mäusen nach I₃₀/R₁₀

(A) Proteinbanden von ERK und phosphoryliertem ERK in CMBK-CTR (CMBK^{+fl}) und CMBK-KO (CMBK^{-fl}) basal sowie nach 30 min Ischämie und 10 min Reperfusion (I₃₀/R₁₀). (B) Akt-Phosphorylierung nach I₃₀/R₁₀ in CMBK-CTR und -KO. (C) Quantifizierung der Proteinbanden

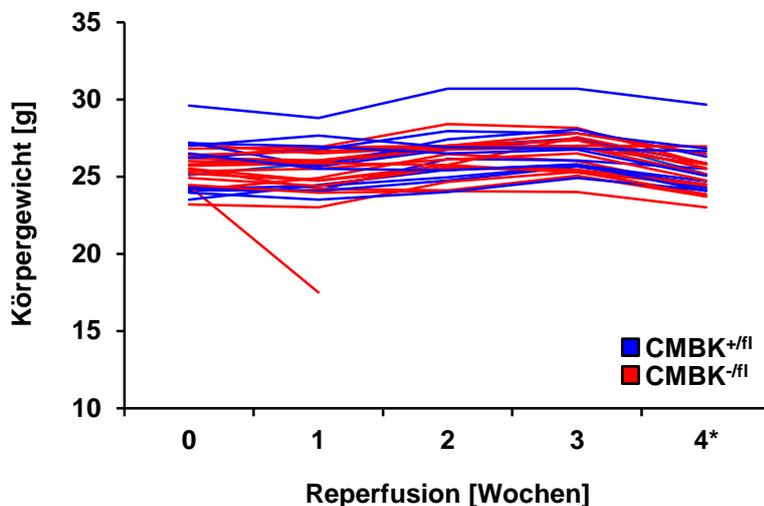
A



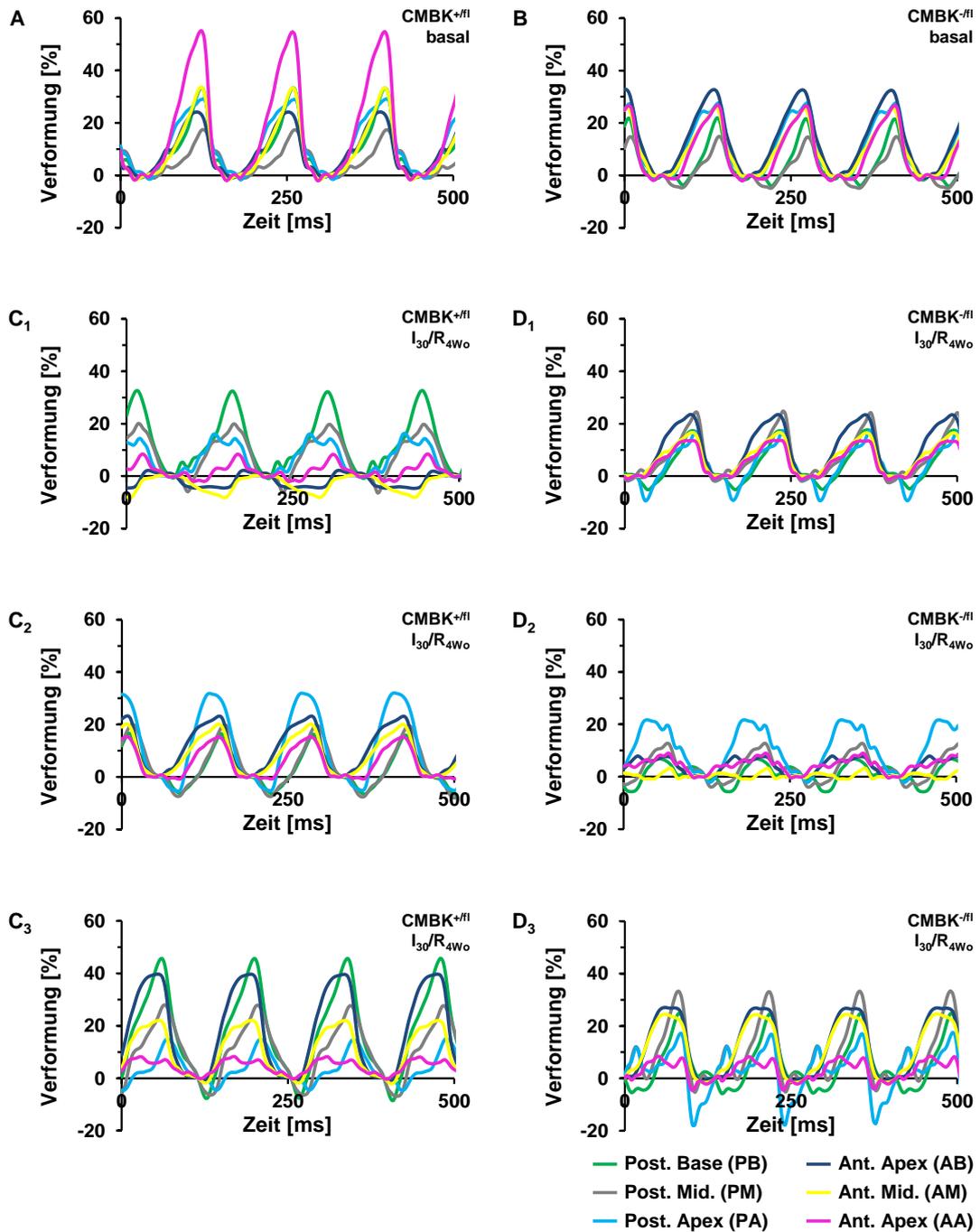
B



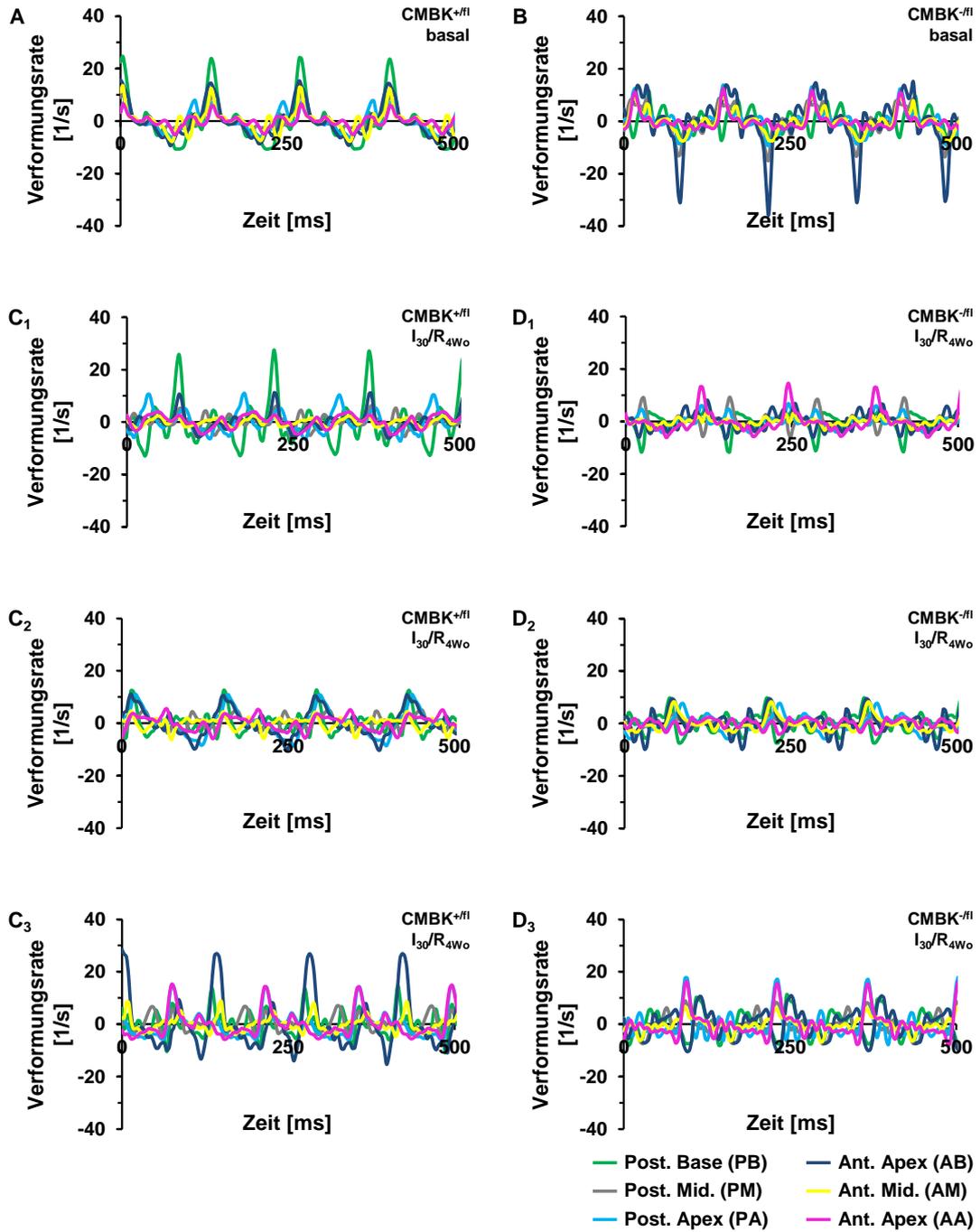
Annex-Abbildung 7: Bestimmung der ROS-Spiegel mittels MitoB
 (A) Die zehnminütige Isofluranexposition 60 min vor I/R zeigte keinen Einfluss auf die Größe des Risikoareals (in % der Gesamtfläche) oder des Infarkts (in % des Risikoareals) in CMBK-CTR (CMBK^{+fl}). Rechts: repräsentative Herzscheiben (blau: unbeeinträchtigtes Gewebe, rot+weiß: Risikoareal, weiß: infarziertes Gewebe); Rauten zeigen einzelne Experimente, Balken stellen Mittelwerte ± SEM dar. (B) In einer ersten Testreihe waren die ROS-Spiegel nach 30-min Ischämie, gefolgt von 15 min Reperfusion (I₃₀/R₁₅; Durchführung siehe Abschnitte 2.5.6.1, Chouchani et al. 2014) im Vergleich zu den Basalwerten nicht erhöht (Abbildung 53). Gegen den Erwartungen wiesen CMBK-KO (CMBK^{-fl}) zudem einen geringeren Quotienten MitoP zu MitoB im Vergleich zu den Kontrolltieren auf. Bei dieser ersten Messreihe zeigten sich sowohl technische als auch organisatorische Schwierigkeiten. Balken zeigen Mittelwerte ± SEM mit je n=8; *p<0,05 CMBK^{+fl} vs. CMBK^{-fl}.



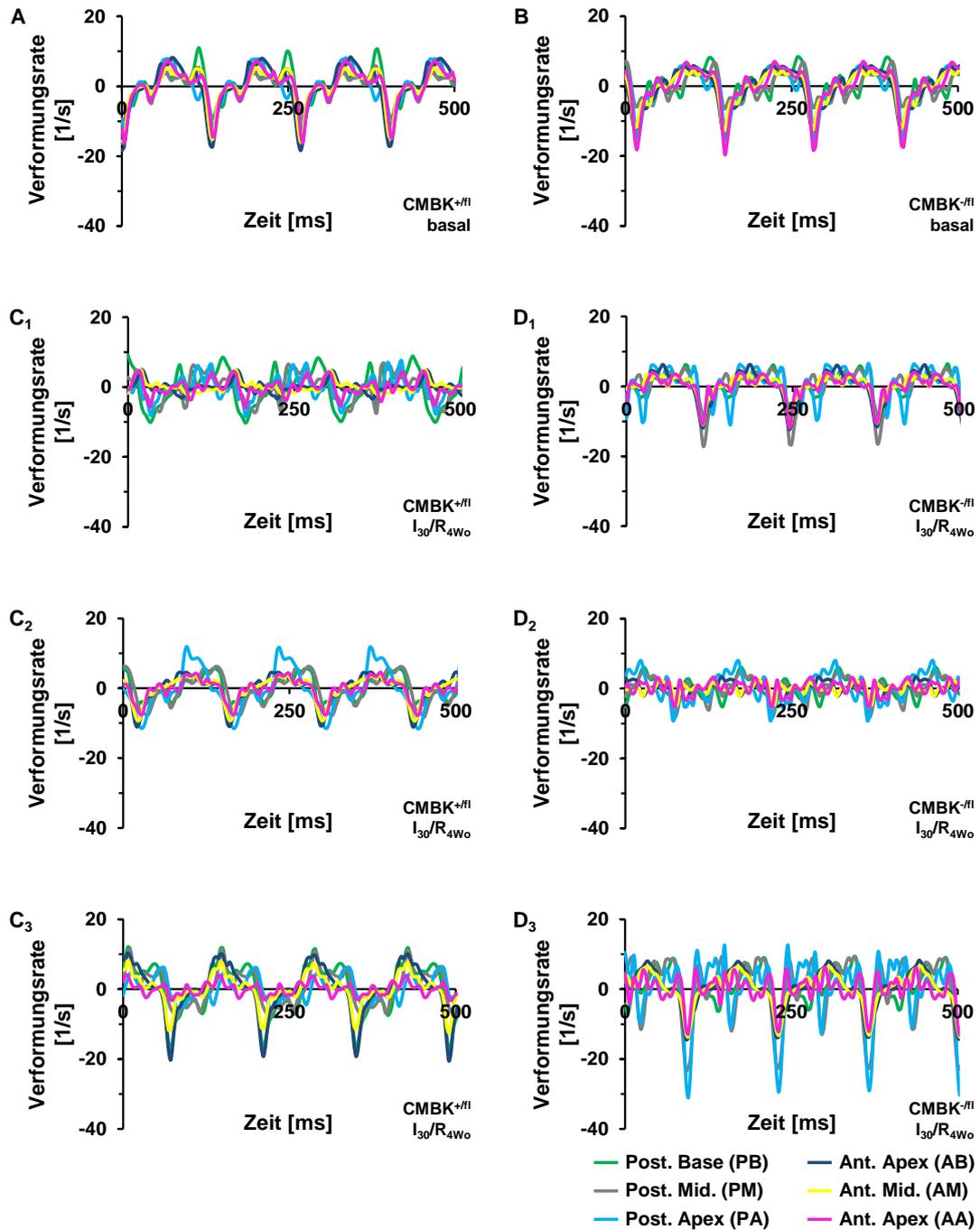
Annex-Abbildung 8: Gewichtsverlauf während der Reperfusionphase des chronischen Modells
 Es zeigte sich weder in CMBK-CTR (CMBK^{+fl}) noch in CMBK-KO (CMBK^{-fl}) eine signifikante Veränderung des Körpergewichtes post-MI; *post-mortem



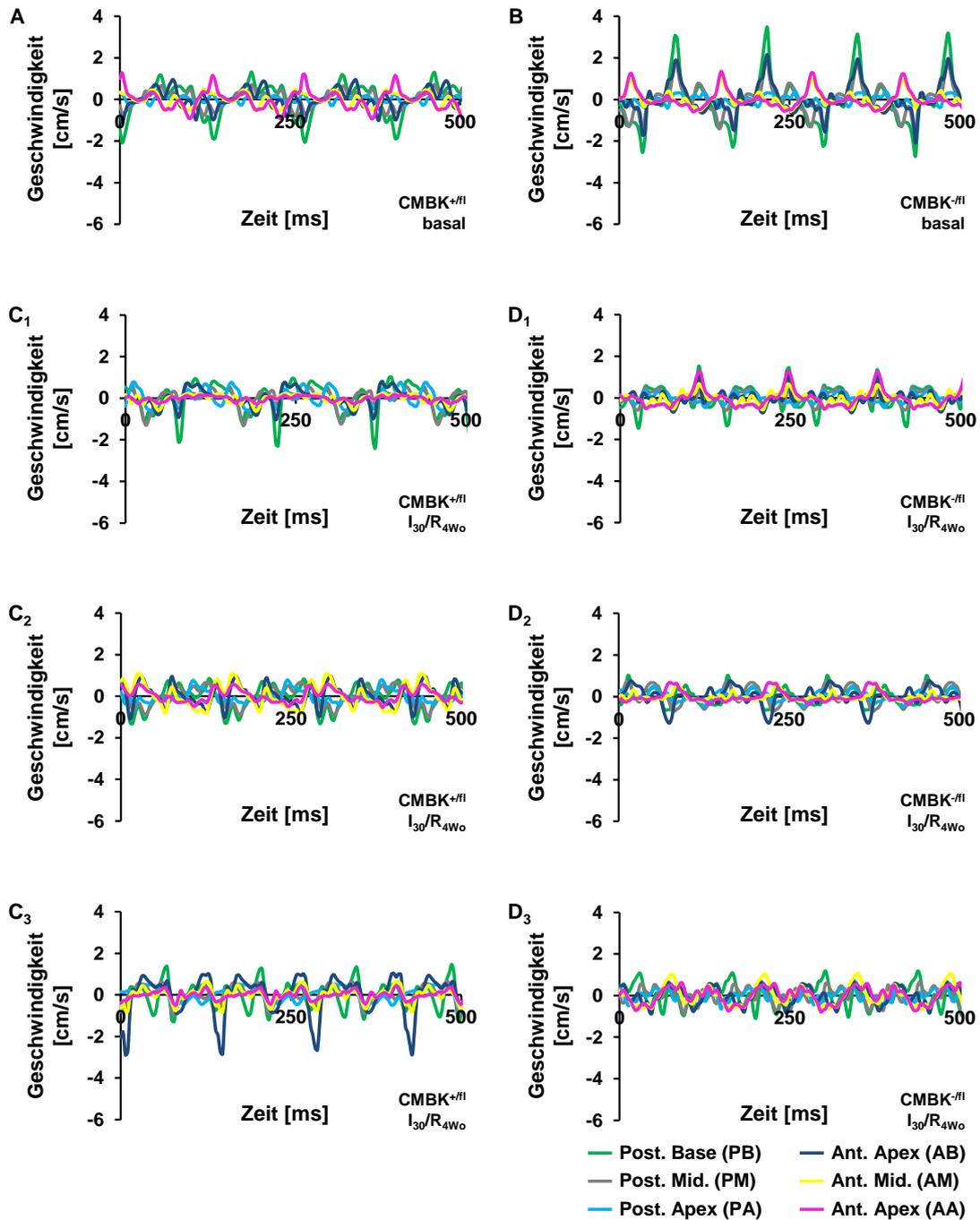
Annex-Abbildung 9: Radiale Verformung des Herzens basal sowie nach I₃₀R_{4wo} in CMBK-CTR (CMBK^{+/fl}) und CMBK-KO (CMBK^{-/fl})
 Auswertemethode: „Vevo Strain 2100“



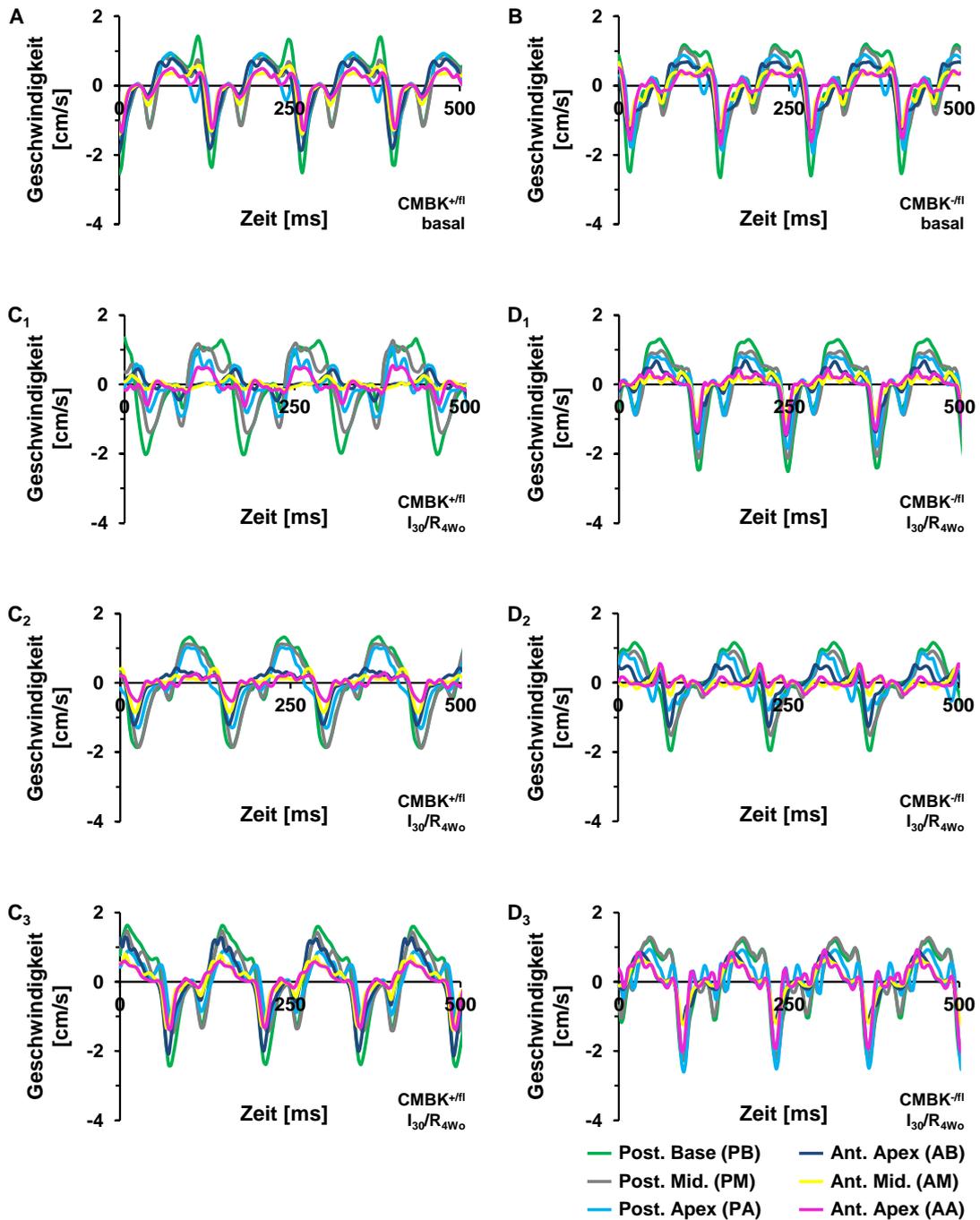
Annex-Abbildung 10: Longitudinale Verformungsrate des Herzens basal sowie nach I₃₀R_{4W0} in CMBK-CTR (CMBK^{+fl}) und CMBK-KO (CMBK^{-fl})
 Auswertemethode: „Vevo Strain 2100“



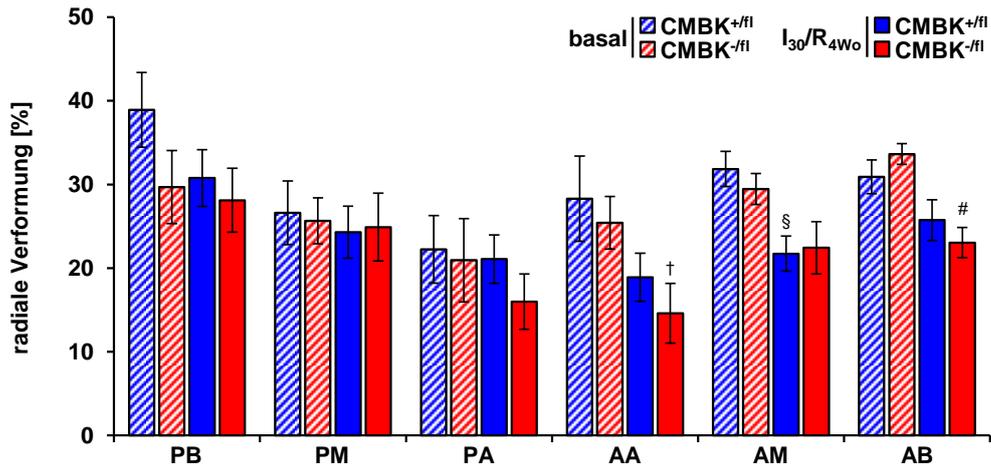
Annex-Abbildung 11: Radiale Verformungsrate des Herzens basal sowie nach I₃₀R_{4W0} in CMBK-CTR (CMBK^{+fl}) und CMBK-KO (CMBK^{-fl})
 Auswertemethode: „Vevo Strain 2100“



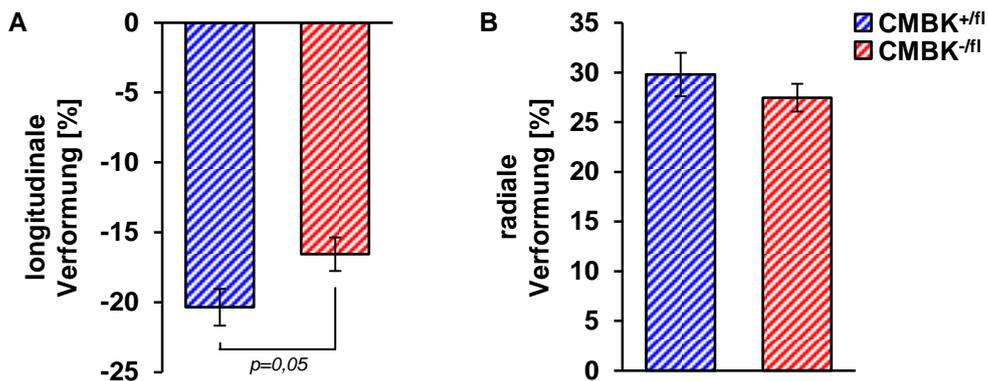
Annex-Abbildung 12: Longitudinale Verformungsgeschwindigkeit des Herzens basal sowie nach I₃₀R_{4Wo} in CMBK-CTR (CMBK^{+fl}) und CMBK-KO (CMBK^{-fl})
 Auswertemethode: „Vevo Strain 2100“



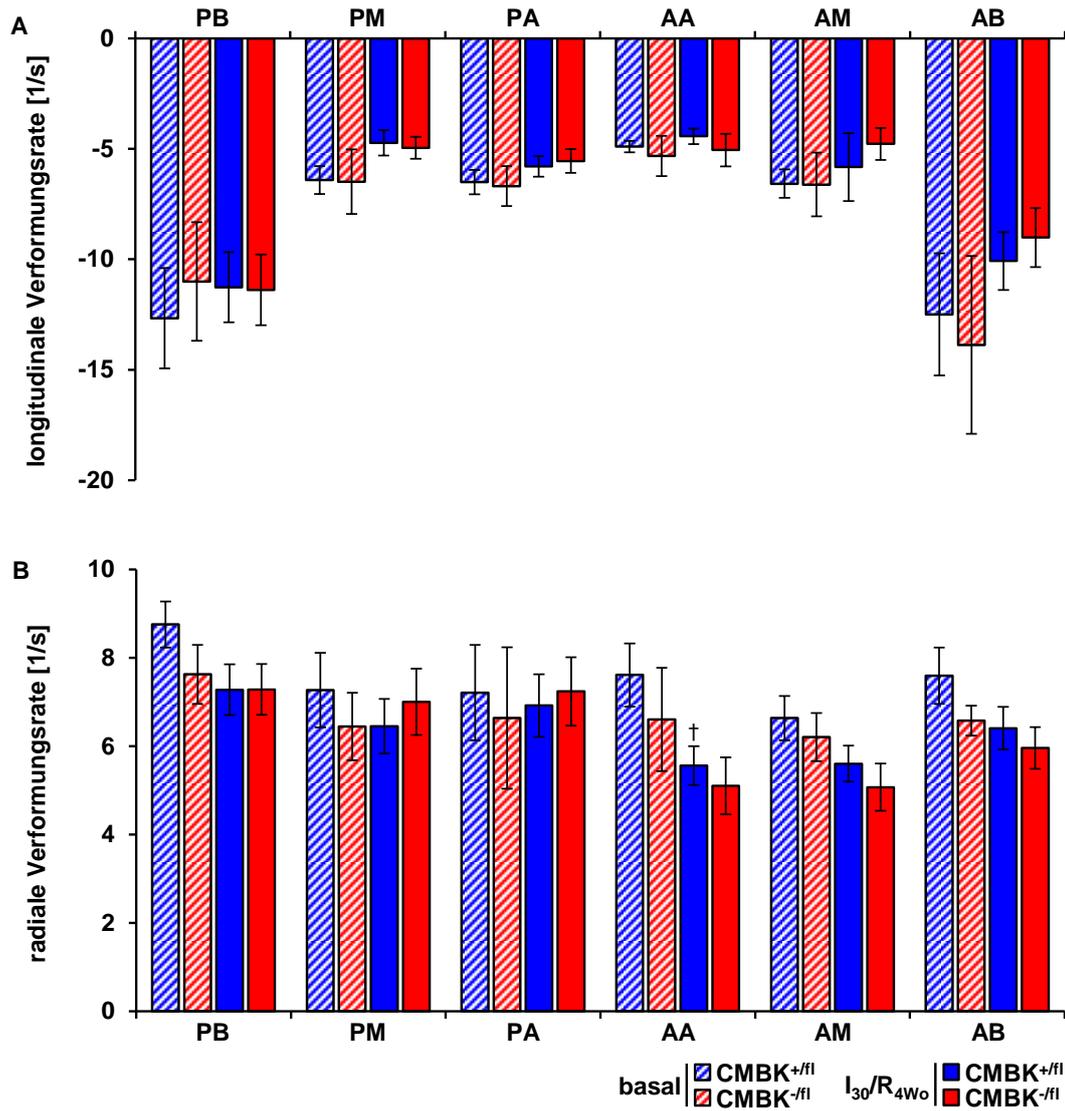
Annex-Abbildung 13: Radiale Verformungsgeschwindigkeit des Herzens basal sowie nach I₃₀R_{4W0} in CMBK-CTR (CMBK^{+fl}) und CMBK-KO (CMBK^{-fl})
 Auswertemethode: „Vevo Strain 2100“



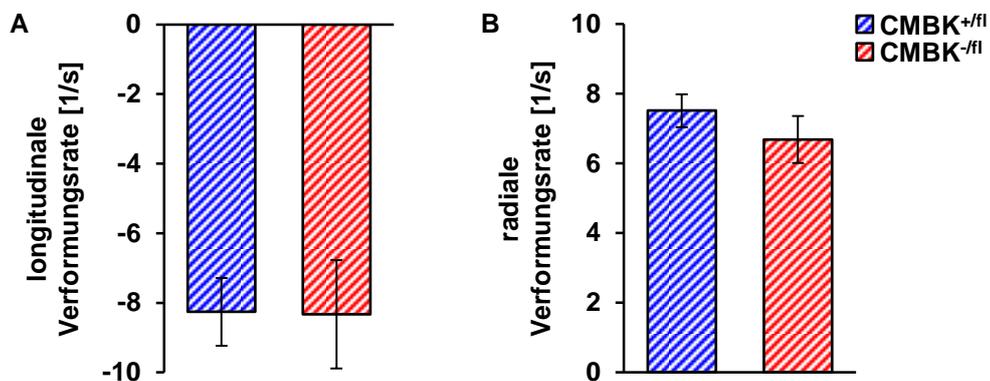
Annex-Abbildung 14: Segmentquantifizierung der radialen Verformung des Herzens basal sowie nach $I_{30}R_{4Wo}$ in CMBK-CTR (CMBK^{+fl}) und CMBK-KO (CMBK^{-fl})
Auswertemethode: „Vevo Strain 2100“



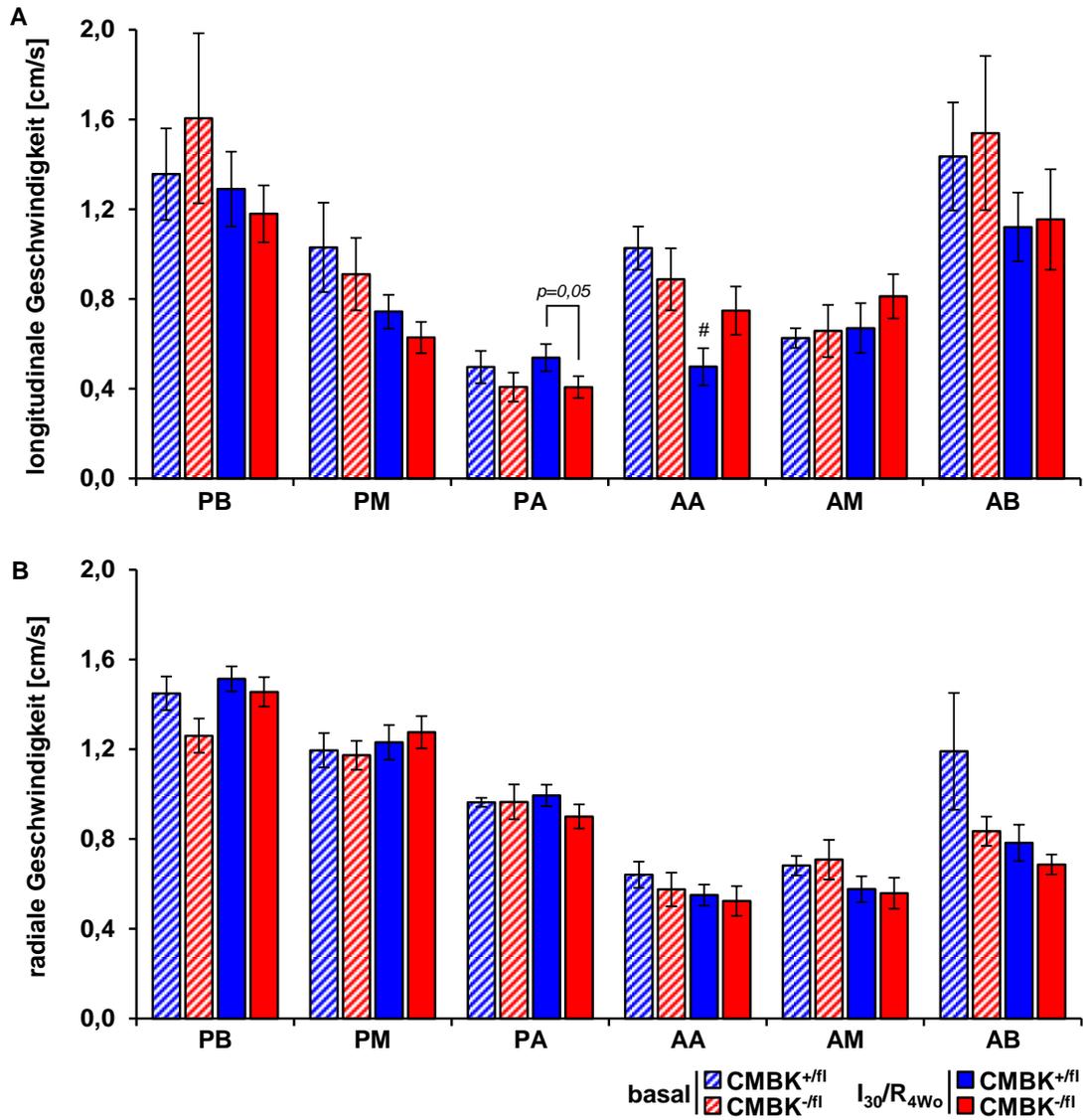
Annex-Abbildung 15: Durchschnittliche basale Verformung des Herzens in CMBK-CTR (CMBK^{+fl}) und CMBK-KO (CMBK^{-fl})
(A) longitudinal; (B) radial; Auswertemethode: „Vevo Strain 2100“



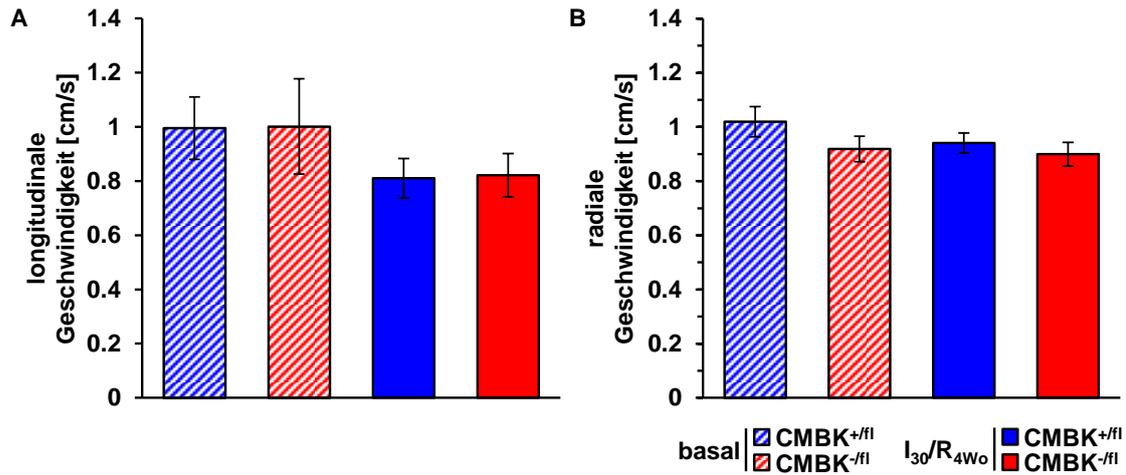
Annex-Abbildung 16: Segmentquantifizierung der Verformungsrate des Herzens basal sowie nach I₃₀R_{4wo} in CMBK-CTR (CMBK^{+fl}) und CMBK-KO (CMBK^{-fl}) (A) longitudinal; (B) radial; Auswertemethode: „Vevo Strain 2100“



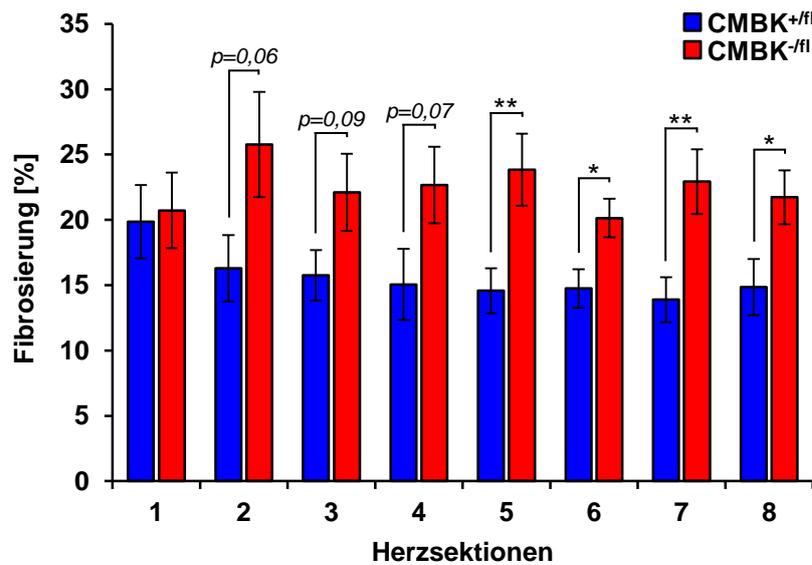
Annex-Abbildung 17: Durchschnittliche basale Verformungsrate des Herzens in CMBK-CTR (CMBK^{+fl}) und CMBK-KO (CMBK^{-fl}) (A) longitudinal; (B) radial; Auswertemethode: „Vevo Strain 2100“



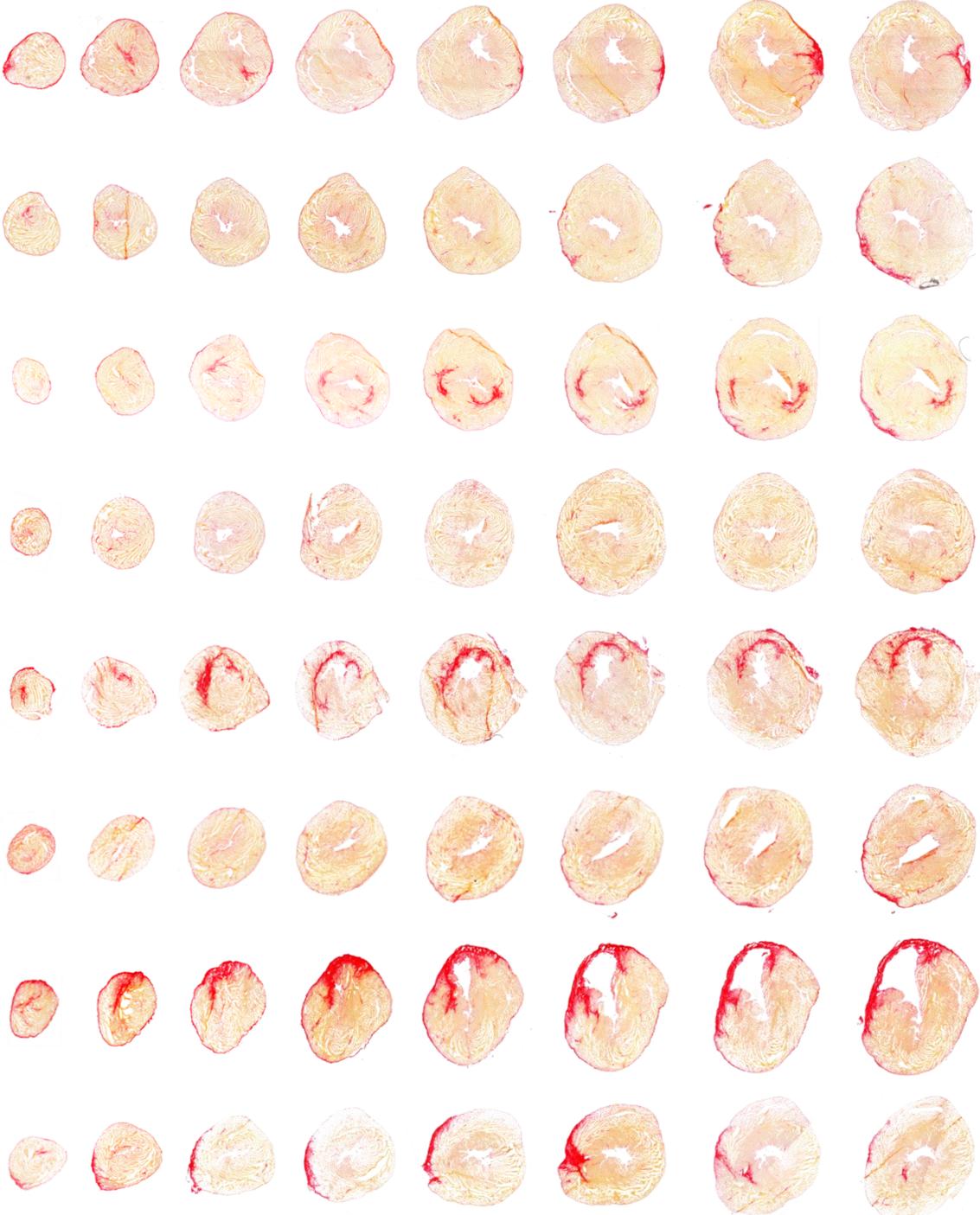
Annex-Abbildung 18: Segmentquantifizierung der Verformungsgeschwindigkeit des Herzens basal sowie nach I₃₀R_{4Wo} in CMBK-CTR (CMBK^{+fl}) und CMBK-KO (CMBK^{-fl}) (A) longitudinal; (B) radial; Auswertemethode: „Vevo Strain 2100“



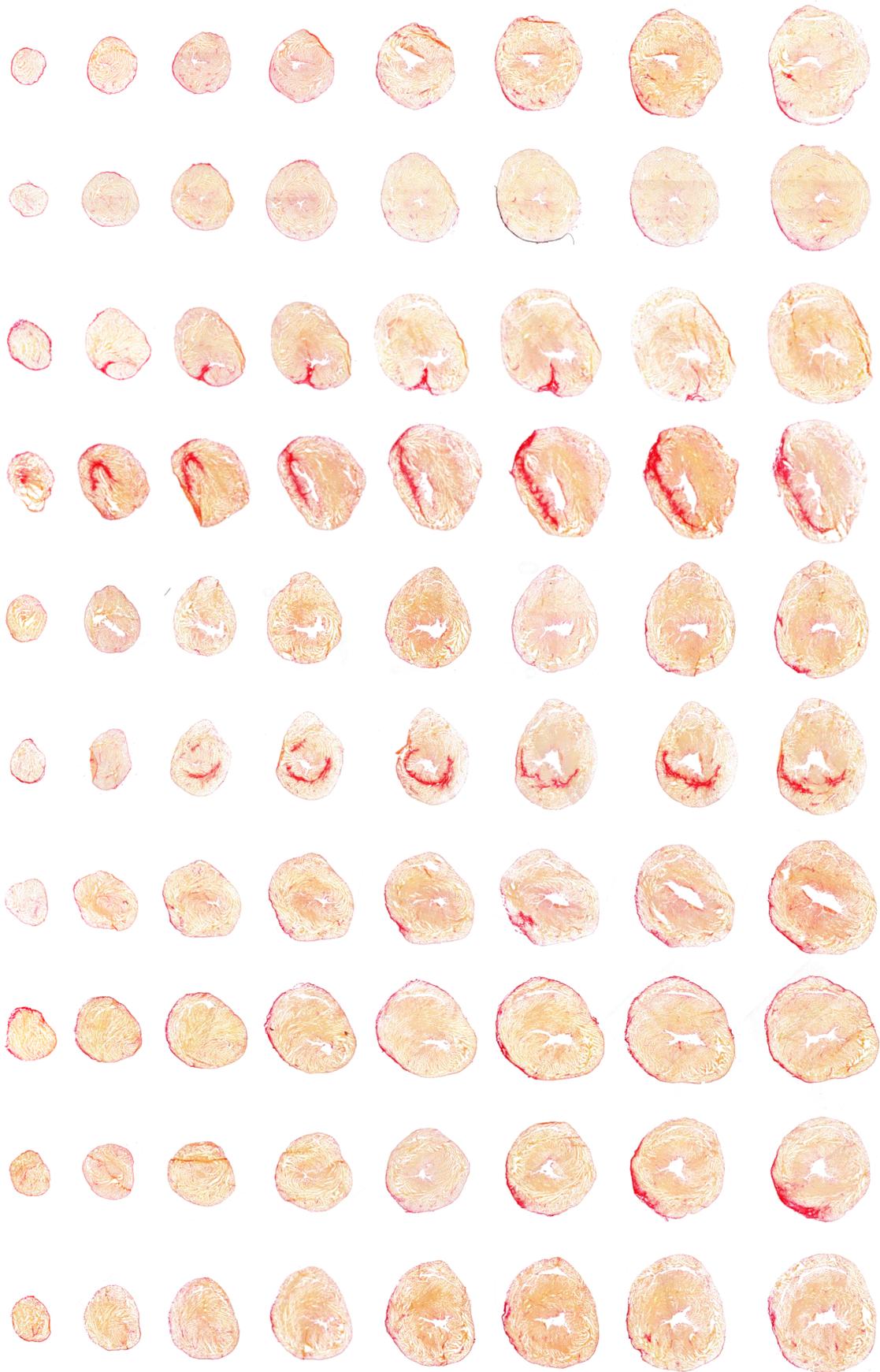
Annex-Abbildung 19: Durchschnittliche Verformungsgeschwindigkeit des Herzens basal sowie nach I₃₀R_{4Wo} in CMBK-CTR (CMBK^{+fl}) und CMBK-KO (CMBK^{-fl})
 Auswertemethode: „Vevo Strain 2100“



Annex-Abbildung 20: Fibrosierung der Herzsektionen der CMBK-Tiere nach I₃₀/R_{4Wo}
 In CMBK-KO (CMBK^{-fl})-Herzen zeigte sich eine erhöhte Fibrosierung (in % zum Gesamtgewebe) über alle Herzsektionen (Abbildung 42A) hinweg verglichen mit den Wurfgeschwisterkontrollherzen (CMBK^{+fl}). Balken zeigen Mittelwerte ± SEM mit n=12 für CMBK^{+fl} und n=13 für CMBK^{-fl}; *p<0,05, **p<0,01 CMBK^{+fl} vs. CMBK^{-fl}.



Annex-Abbildung 21: Fibrosefärbung der CMBK-Kontrollherzen nach I₃₀/R_{4w}



Annex-Abbildung 22: Fibrosefärbung der CMBK-Knockoutherzen nach I₃₀/R_{4w0}

7.2 Annex-Tabellen

Annex-Tabelle 1: Statistik der im akuten Myokardinfarktmodell operierten Mäuse nach Genotypen

Die Spalte „Ausfall“ bezeichnet diejenigen Tiere, die nicht in die Statistik mitaufgenommen werden konnte. Gründe hierfür schließen sich in den nachfolgenden Spalten an. Die Spalte „I/R“ gibt die Tiere an, die durch den Myokardinfarkt noch während der OP verstarben. Unter der Spalte „Substanz“ sind die Mäuse erfasst, die durch die Injektion des BK-Kanalöffners NS11021 verstarben (siehe hierzu Abschnitt 3.8.2). Die Spalte „Sonstiges“ umschließt weitere Gründe wie ein Ausfall der Heizplatte oder die Durchtrennung der LCA bei der Okklusion. Die meisten Mäuse verstarben prozentual in den globalen BK-Kohorten, denn neben einer vermutlich allgemein erhöhten Vulnerabilität der globalen BK-Knockoutmäuse wurden diese Tiere zu Beginn der vorliegenden Arbeit operiert.

	Anzahl operierter Tiere	Ausfall [%]	Anästhesie Beatmung [Tiere]	I/R [Tiere]	Substanz [Tiere]	Sonstiges [Tiere]
globale BK	70	15,7	3	3	-	5
SMBK	24	0	-	-	-	-
CMBK	338	6,5	3	10	6	3
CMsGC	107	3,7	1	2	-	1
gesamt	539	6,5	7	15	6	9

Annex-Tabelle 2: Basalcharakteristiken der globalen WT (BK^{+/+}) und BK-KO (BK^{-/-})

I/R: 30 min Ischämie / 120 min Reperfusion; *iPost*: Postkonditionierung; *SIL*: Sildenafil

	Risikoareal [cm ³]	Infarktgröße [cm ³]	Gesamtfläche [cm ³]	Herzgewicht / Gewicht [%]	Alter (Wochen)	
BK ^{+/+}	I/R (n=8)	0,056 ± 0,004	0,013 ± 0,001	0,104 ± 0,009	0,42 ± 0,01	11,0 - 17,5
	I/R sham (n=6)	0,061 ± 0,007	0,001 ± 0,000	0,109 ± 0,009	0,43 ± 0,01	11,0 - 16,0
	I/R + <i>iPost</i> (n=8)	0,060 ± 0,004	0,007 ± 0,001	0,106 ± 0,010	0,44 ± 0,01	9,0 - 12,5
	I/R + <i>SIL</i> (n=8)	0,057 ± 0,004	0,007 ± 0,001	0,097 ± 0,006	0,44 ± 0,01	9,0 - 13,0
BK ^{-/-}	I/R (n=11)	0,045 ± 0,003	0,017 ± 0,001	0,086 ± 0,006	0,43 ± 0,01	11,0 - 17,5
	I/R sham (n=4)	0,050 ± 0,009	0,000 ± 0,000	0,099 ± 0,016	0,42 ± 0,01	12,0 - 16,0
	I/R + <i>iPost</i> (n=9)	0,058 ± 0,005	0,019 ± 0,002	0,096 ± 0,006	0,43 ± 0,01	9,5 - 12,5
	I/R + <i>SIL</i> (n=8)	0,060 ± 0,006	0,023 ± 0,002	0,096 ± 0,008	0,43 ± 0,00	9,0 - 15,5

Annex-Tabelle 3: Basalcharakteristiken der SMBK-CTR (SMBK^{+fl}) und SMBK-KO (SMBK^{-fl})
I/R: 30 min Ischämie / 120 min Reperfusion; *iPost*: Postkonditionierung

	Risikoareal [cm ³]	Infarktgröße [cm ³]	Gesamtfläche [cm ³]	Herzgewicht / Gewicht [%]	Alter (Wochen)	
SMBK^{+fl}	I/R (n=6)	0,065 ± 0,007	0,015 ± 0,001	0,107 ± 0,010	0,40 ± 0,00	9,5 - 12,0
	I/R + <i>iPost</i> (n=6)	0,060 ± 0,006	0,005 ± 0,001	0,106 ± 0,011	0,42 ± 0,01	9,0 - 9,5
SMBK^{-fl}	I/R (n=6)	0,068 ± 0,004	0,016 ± 0,001	0,115 ± 0,003	0,42 ± 0,00	11,0 - 12,0
	I/R + <i>iPost</i> (n=6)	0,071 ± 0,005	0,008 ± 0,001	0,115 ± 0,006	0,41 ± 0,01	9,0 - 12,5

Annex-Tabelle 4: Basalcharakteristiken der CMBK-CTR (CMBK^{+fl}) und CMBK-KO (CMBK^{-fl})

I/R: 30 min Ischämie / 120 min Reperfusion; *CIN*: Cinaciguat; *ctr¹*: DMSO/H₂O von 9:1; *ctr²*: DMSO/0,9%ige NaCl-Lösung von 1:150; *ctr³*: 0,9%ige NaCl-Lösung; *ctr⁴*: 40 % DMSO/H₂O; *iPost*: Postkonditionierung; *iPre*: Präkonditionierung; *L-NAME*: N_ω-Nitro-L-Arginin-Methylester-Hydrochlorid; *NS*: NS11021; *PAX*: Paxilline; *RIO*: Riociguat; *SIL*: Sildenafil; *TAD*: Tadalafil

	Risikoareal [cm ³]	Infarktgröße [cm ³]	Gesamtfläche [cm ³]	Herzgewicht / Gewicht [%]	Alter (Wochen)	
CMBK^{+fl}	I/R (n=8)	0,044 ± 0,003	0,012 ± 0,001	0,090 ± 0,005	0,44 ± 0,01	10,0 - 14,5
	I/R <i>sham</i> (n=4)	0,041 ± 0,002	0,000 ± 0,000	0,080 ± 0,003	0,42 ± 0,00	9,5 - 12,0
	I/R + <i>iPost</i> (n=8)	0,056 ± 0,005	0,006 ± 0,001	0,105 ± 0,008	0,44 ± 0,01	10,0 - 15,0
	I/R + <i>iPre</i> (n=8)	0,063 ± 0,006	0,007 ± 0,001	0,097 ± 0,009	0,43 ± 0,01	11,5 - 12,5
	I/R + <i>PAX</i> (n=8)	0,049 ± 0,005	0,018 ± 0,001	0,087 ± 0,006	0,43 ± 0,01	10,0 - 13,0
	I/R + <i>ctr¹</i> (n=3)	0,050 ± 0,002	0,011 ± 0,001	0,101 ± 0,009	0,43 ± 0,01	10,5 - 13,0
	I/R + <i>NS</i> , 3 μM <i>i.v.</i> (n=6)	0,055 ± 0,006	0,014 ± 0,001	0,098 ± 0,009	0,43 ± 0,01	10,0 - 11,0
	I/R + <i>NS</i> , 3 μM <i>i.a.</i> (n=6)	0,064 ± 0,006	0,005 ± 0,001	0,108 ± 0,010	0,44 ± 0,01	8,5 - 9,5
	I/R + <i>NS</i> , 0,3 μM <i>i.a.</i> (n=8)	0,065 ± 0,004	0,010 ± 0,001	0,109 ± 0,007	0,43 ± 0,01	9,0 - 12,0
	I/R + <i>ctr²</i> (n=3)	0,058 ± 0,005	0,015 ± 0,002	0,098 ± 0,008	0,43 ± 0,02	10,0 - 12,0
	I/R + <i>SIL</i> (n=8)	0,061 ± 0,002	0,007 ± 0,000	0,108 ± 0,002	0,44 ± 0,01	9,5 - 11,5
	I/R + <i>ctr³</i> (n=3)	0,055 ± 0,004	0,015 ± 0,003	0,101 ± 0,010	0,41 ± 0,00	9,0 - 10,5
	I/R + <i>TAD</i> (n=8)	0,069 ± 0,004	0,010 ± 0,001	0,114 ± 0,006	0,43 ± 0,01	8,5 - 10,5
	I/R + <i>ctr⁴</i> (n=3)	0,081 ± 0,005	0,017 ± 0,001	0,139 ± 0,020	0,43 ± 0,01	11,0 - 15,5
	I/R + <i>RIO</i> (n=8)	0,063 ± 0,003	0,010 ± 0,001	0,100 ± 0,004	0,43 ± 0,01	11,0 - 14,5
	I/R + <i>CIN</i> (n=8)	0,070 ± 0,004	0,010 ± 0,001	0,114 ± 0,006	0,42 ± 0,01	10,0 - 13,5
	I/R + <i>L-NAME</i> + <i>iPost</i> (n=8)	0,073 ± 0,004	0,019 ± 0,001	0,117 ± 0,005	0,43 ± 0,01	11,0 - 12,5
	I/R + <i>L-NAME</i> + <i>SIL</i> (n=8)	0,069 ± 0,005	0,019 ± 0,001	0,108 ± 0,006	0,42 ± 0,01	12,5 - 16,0
	I/R + <i>L-NAME</i> (n=3)	0,052 ± 0,003	0,014 ± 0,001	0,86 ± 0,008	0,42 ± 0,00	10,5

	Risikoareal [cm ³]	Infarktgröße [cm ³]	Gesamtfläche [cm ³]	Herzgewicht / Gewicht [%]	Alter (Wochen)
I/R (n=8)	0,047 ± 0,004	0,018 ± 0,001	0,093 ± 0,009	0,45 ± 0,01	10,0 - 16,5
I/R sham (n=5)	0,047 ± 0,008	0,000 ± 0,000	0,087 ± 0,007	0,43 ± 0,01	9,5 - 10,5
I/R + iPost (n=8)	0,063 ± 0,007	0,018 ± 0,002	0,111 ± 0,007	0,44 ± 0,00	12,5 - 14,0
I/R + iPre (n=8)	0,055 ± 0,005	0,016 ± 0,001	0,102 ± 0,005	0,44 ± 0,01	8,0 - 12,5
I/R + PAX (n=8)	0,055 ± 0,006	0,020 ± 0,002	0,098 ± 0,009	0,44 ± 0,01	10,0 - 13,5
I/R + ctr¹ (n=3)	0,059 ± 0,004	0,020 ± 0,002	0,096 ± 0,007	0,44 ± 0,03	12,5 - 13,0
I/R + NS, 3 μM i.v. (n=3)	0,063 ± 0,006	0,026 ± 0,003	0,107 ± 0,012	0,43 ± 0,00	10,5 - 12,0
I/R + NS, 3 μM i.a. (n=4)	0,063 ± 0,003	0,022 ± 0,001	0,118 ± 0,006	0,46 ± 0,02	9,5 - 11,5
I/R + NS, 0,3 μM i.a. (n=8)	0,062 ± 0,004	0,020 ± 0,002	0,103 ± 0,007	0,46 ± 0,01	9,5 - 11,5
I/R + ctr² (n=3)	0,060 ± 0,004	0,022 ± 0,002	0,103 ± 0,005	0,42 ± 0,01	11,0 - 12,0
I/R + SIL (n=8)	0,056 ± 0,003	0,020 ± 0,001	0,096 ± 0,040	0,43 ± 0,01	9,0 - 11,0
I/R + ctr³ (n=3)	0,065 ± 0,008	0,023 ± 0,002	0,101 ± 0,011	0,44 ± 0,01	8,5 - 12,5
I/R + TAD (n=8)	0,066 ± 0,003	0,021 ± 0,002	0,112 ± 0,045	0,43 ± 0,01	9,0 - 11,5
I/R + ctr⁴ (n=3)	0,061 ± 0,003	0,019 ± 0,002	0,108 ± 0,003	0,43 ± 0,01	11,0 - 12,0
I/R + RIO (n=8)	0,069 ± 0,002	0,022 ± 0,002	0,114 ± 0,002	0,44 ± 0,01	11,0 - 14,5
I/R + CIN (n=8)	0,069 ± 0,005	0,026 ± 0,002	0,111 ± 0,007	0,42 ± 0,00	10,0 - 14,5
I/R + L-NAME + iPost (n=3)	0,072 ± 0,005	0,028 ± 0,003	0,118 ± 0,008	0,42 ± 0,01	10,5 - 11,5
I/R + L-NAME + SIL (n=3)	0,067 ± 0,010	0,027 ± 0,003	0,104 ± 0,010	0,43 ± 0,01	13,5 - 14,0

Annex-Tabelle 5: Basalcharakteristiken der permanenten Ligatur in CMBK-CTR (CMBK^{+/fl}) und CMBK-KO (CMBK^{-fl})

	Risikoareal [cm ³]	Infarktgröße [cm ³]	Gesamtfläche [cm ³]	Herzgewicht / Gewicht [%]	Alter (Wochen)
CMBK^{+/fl} permanente Ligatur (n=7)	0,071 ± 0,004	0,041 ± 0,004	0,116 ± 0,007	0,46 ± 0,03	12,5 - 13,5
CMBK^{-fl} permanente Ligatur (n=7)	0,071 ± 0,004	0,047 ± 0,003	0,114 ± 0,006	0,48 ± 0,02	12,5 - 14,0

Annex-Tabelle 6: Basalcharakteristiken der CMsGC-CTR (CMsGC^{+fl}) und CMsGC-KO (CMsGC^{-fl})

I/R: 30 min Ischämie / 120 min Reperfusion; CIN: Cinaciguat; *ctr*³: 0,9%ige NaCl-Lösung; *ctr*⁴: 40 % DMSO/H₂O; L-NAME: N_ω-Nitro-L-Arginin-Methylester-Hydrochlorid; NS: NS11021; SIL: Sildenafil; TAD: Tadalafil

	Risikoareal [cm ³]	Infarktgröße [cm ³]	Gesamtfläche [cm ³]	Herzgewicht / Gewicht [%]	Alter (Wochen)	
CMsGC^{+fl}	I/R (n=5)	0,057 ± 0,005	0,014 ± 0,002	0,101 ± 0,007	0,45 ± 0,00	18,5 - 20,0
	I/R + <i>iPost</i> (n=5)	0,054 ± 0,004	0,006 ± 0,001	0,097 ± 0,004	0,40 ± 0,01	15,5 - 20,0
	I/R + SIL (n=5)	0,069 ± 0,006	0,007 ± 0,001	0,109 ± 0,013	0,43 ± 0,02	16,0 - 21,5
	I/R + <i>ctr</i> ³ (n=3)	0,083 ± 0,003	0,021 ± 0,002	0,133 ± 0,002	0,41 ± 0,04	23,5
	I/R + TAD (n=5)	0,076 ± 0,004	0,007 ± 0,000	0,131 ± 0,003	0,47 ± 0,02	22,0 - 23,5
	I/R + <i>ctr</i> ⁴ (n=3)	0,096 ± 0,013	0,023 ± 0,004	0,158 ± 0,019	0,44 ± 0,01	23,5 - 25,0
	I/R + NS, 0,3 μM <i>i.a.</i> (n=5)	0,065 ± 0,006	0,007 ± 0,001	0,108 ± 0,008	0,44 ± 0,00	23,0 - 24,5
	I/R + CIN (n=5)	0,067 ± 0,004	0,007 ± 0,001	0,116 ± 0,005	0,47 ± 0,02	16,0 - 16,5
	I/R + L-NAME (n=5)	0,073 ± 0,003	0,016 ± 0,001	0,117 ± 0,004	0,43 ± 0,01	23,5 - 25,0
CMsGC^{-fl}	I/R (n=8)	0,070 ± 0,003	0,016 ± 0,001	0,113 ± 0,005	0,45 ± 0,01	17,5 - 20,0
	I/R + <i>iPost</i> (n=8)	0,056 ± 0,004	0,013 ± 0,001	0,094 ± 0,006	0,44 ± 0,01	15,5 - 20,0
	I/R + SIL (n=8)	0,062 ± 0,006	0,014 ± 0,001	0,098 ± 0,008	0,44 ± 0,01	16,0 - 21,5
	I/R + <i>ctr</i> ³ (n=3)	0,081 ± 0,005	0,020 ± 0,001	0,129 ± 0,007	0,46 ± 0,03	15,0 - 26,5
	I/R + TAD (n=8)	0,068 ± 0,003	0,014 ± 0,001	0,120 ± 0,007	0,47 ± 0,01	23,0 - 24,5
	I/R + <i>ctr</i> ⁴ (n=3)	0,075 ± 0,006	0,017 ± 0,002	0,116 ± 0,007	0,41 ± 0,01	23,0 - 27,0
	I/R + NS, 0,3 μM <i>i.a.</i> (n=8)	0,069 ± 0,004	0,009 ± 0,001	0,115 ± 0,007	0,42 ± 0,01	15,0 - 25,0
	I/R + CIN (n=8)	0,076 ± 0,005	0,018 ± 0,001	0,128 ± 0,006	0,43 ± 0,01	15,5 - 16,5
	I/R + L-NAME (n=8)	0,068 ± 0,003	0,015 ± 0,002	0,109 ± 0,004	0,42 ± 0,01	23,5 - 25,5

Annex-Tabelle 7: Basale Herzgewichte der weiblichen CMBK-Tiere (11-13 Wochen)

CMBK-CTR (CMBK^{+fl}); CMBK-KO (CMBK^{-fl}); KG: Körpergewicht; HG: Herzgewicht; TL: Tibialänge

	KG [g]	HG [mg]	TL [mm]	HG/KG [mg/g]	HG/TL [mg/mm]
CMBK ^{+fl} (n=6)	22,4 ± 0,6	94,2 ± 2,8	16,63 ± 0,14	4,22 ± 0,11	5,66 ± 0,15
CMBK ^{-fl} (n=6)	22,0 ± 0,6	97,1 ± 3,3	16,72 ± 0,26	4,41 ± 0,08	5,81 ± 0,15

Annex-Tabelle 8: Basale Herzgewichte der männlichen CMBK-Tiere (>45 Wochen)

*p<0,05, **p<0,01, ***p<001 bezogen auf männliche Tiere (11-13 Wochen); CMBK-CTR (CMBK^{+fl}); CMBK-KO (CMBK^{-fl}); KG: Körpergewicht, HG: Herzgewicht, TL: Tibialänge

	KG [g]	HG [mg]	TL [mm]	HG/KG [mg/g]	HG/TL [mg/mm]
CMBK ^{+fl} (n=7)	26,0 ± 1,9	164,2 ± 19,2*	17,38 ± 0,16	6,27 ± 0,45**	9,50 ± 1,19*
CMBK ^{-fl} (n=7)	26,2 ± 1,3	163,0 ± 16,7**	17,40 ± 0,14*	6,16 ± 0,40***	9,37 ± 0,96**

Annex-Tabelle 9: Basalwerte der Herzfunktionsparameter in CMBK-CTR (CMBK^{+fl}) und CMBK-KO (CMBK^{-fl})

EF: Auswurfraction; FS: Verkürzungsfraktion; IVS: Interventrikularseptumdicke; LVPW: linksventrikuläre Hinterwanddicke; LV-Vol.: linksventrikuläres Volumen; m_{LV}: linksventrikuläre Masse; TEDD: totaler enddiastolischer Durchmesser; *p<0,05, **p<0,01 CMBK^{+fl} vs. CMBK^{-fl}

	FS [%]	EF [%]	m _{LV} [mg]	IVS _{Systole} [µm]	IVS _{Diastole} [µm]
CMBK ^{+fl} (n=8)	35,1 ± 1,4	64,6 ± 1,8	145,1 ± 10,4	1,44 ± 0,04	1,00 ± 0,03
CMBK ^{-fl} (n=9)	31,0 ± 1,1*	59,0 ± 1,6*	143,9 ± 3,1	1,42 ± 0,04	1,00 ± 0,03

	LVPW _{Systole} [µm]	LVPW _{Diastole} [µm]	LV-Vol. _{Systole} [µl]	LV-Vol. _{Diastole} [µl]	TEED [µm]
CMBK ^{+fl} (n=8)	1,35 ± 0,06	0,92 ± 0,04	24,5 ± 2,3	68,2 ± 4,3	5,7 ± 0,3
CMBK ^{-fl} (n=9)	1,16 ± 0,02**	0,84 ± 0,02	29,8 ± 1,5	72,0 ± 1,7	5,9 ± 0,3

Annex-Tabelle 10: Herzfunktionsparameter nach I₃₀/R_{4w0} in CMBK-CTR (CMBK^{+fl}) und CMBK-KO (CMBK^{-fl})

EF: Auswurfraction; FS: Verkürzungsfraktion; IVS: Interventrikularseptumdicke; LVPW: linksventrikuläre Hinterwanddicke; LV-Vol.: linksventrikuläres Volumen; m_{LV}: linksventrikuläre Masse; TEDD: totaler enddiastolischer Durchmesser; §p<0,05, #p<0,001 zu Basalwerten

	FS [%]	EF [%]	m _{LV} [mg]	IVS _{Systole} [µm]	IVS _{Diastole} [µm]
CMBK ^{+fl} (n=11)	25,7 ± 1,6 [#]	50,4 ± 2,3 [#]	167,5 ± 6,0	1,48 ± 0,03	1,09 ± 0,02 [§]
CMBK ^{-fl} (n=12)	26,3 ± 1,4 [§]	51,5 ± 2,3 [§]	168,3 ± 5,3 [§]	1,51 ± 0,06	1,14 ± 0,04 [§]

	LVPW _{Systole} [µm]	LVPW _{Diastole} [µm]	LV-Vol. _{Systole} [µl]	LV-Vol. _{Diastole} [µl]	TEED [µm]
CMBK ^{+fl} (n=11)	1,11 ± 0,04 [§]	0,87 ± 0,03	40,3 ± 3,5 [§]	80,4 ± 5,4	6,2 ± 0,1
CMBK ^{-fl} (n=12)	1,11 ± 0,03	0,84 ± 0,02	37,8 ± 2,6 [§]	77,3 ± 2,6	6,2 ± 0,1 [§]

Annex-Tabelle 11: Bewertung der operierten CMBK-Tiere

CMBK-CTR (CMBK^{+ffl}) und CMBK-KO (CMBK^{-ffl}) wurden von drei Wissenschaftlern (A-C) unabhängig anhand der Auswurfraction (EF) und Fibrosierung nach I₃₀/R_{4W0} bewertet. Befand ein Wissenschaftler ein Herz für infarziert (+) wurde es in die Statistik mitaufgenommen. Mittels dieser Methode wurden zwei Herzen (D5309 und D5326) aus der Studie ausgeschlossen (*Begründung siehe unten*).

CMBK ^{+ffl}	A	B	C	CMBK ^{-ffl}	A	B	C
D5298	+	+	+	D5338	+	+	+
D5369	+	+	+	D5309	-	-	-
D5321	(+)	+	+	D5320	(+)	(+)	+
D5322	+	+	+	D5326	-	-	(-)
D5328	+	+	+	D5346	+	+	+
D5339	+	+	+	D5370	+	+	+
D9113	+	+	+	D9121	+	+	+
D9161	+	+	+	D9147	+	+	+
D9137	(+)	(+)	+	D9148	(+)	(+)	+
D9190	+	+	+	D9163	+	+	+
D9158	+	+	+	D9186	+	+	+
D9198	+	+	+	D9188	-	-	(+)
				D9189	+	+	+
				D9120	+	+	+
				D9162	+	+	+

D5309	+	
	-	<ul style="list-style-type: none"> • Herzscheiben unförmig • keine Narbe, sehr wenig Fibrose • EF von 61 %, echokardiographische Messungen technisch schwierig
D5326	+	
	-	<ul style="list-style-type: none"> • Herzscheiben unförmig • keine Narbe, wenig Fibrose • EF von 59 %
D9188	+	<ul style="list-style-type: none"> • atypische Fibrose nur im äußersten Randbereich lokalisiert
	-	<ul style="list-style-type: none"> • EF von 57 % • keine Narbe

7.3 Annex-Formeln

Verkürzung des Herzmuskels [FS]:

$$FS [\%] = \frac{(LVID_{Diast.} - LVID_{Syst.})}{LVID_{Diast.}} * 100$$

Volumen des linken Ventrikels in der Diastole [LV Vol_{Diast.}]:

$$LV Vol_{Diast.} [\mu l] = \frac{7}{(2,4 + LVID_{Diast.})} * (LVID_{Diast.})^3$$

Volumen des linken Ventrikels in der Systole [LV Vol_{Syst.}]:

$$LV Vol_{Syst.} [\mu l] = \frac{7}{(2,4 + LVID_{Syst.})} * (LVID_{Syst.})^3$$

Auswurfraction [EF]:

$$EF [\%] = \frac{(LV Vol_{Diast.} - LV Vol_{Syst.})}{LV Vol_{Diast.}} * 100$$

Totaler enddiastolischer Durchmesser [TEED]:

$$TEED [\mu m] = IVS_{Diast.} + LVID_{Diast.} + LVPW_{Diast.}$$

Masse des linken Ventrikels [mLV]:

$$mLV [mg] = 1,04 * ((TEED)^3 - (LVID_{Diast.})^3)$$

Annex-Formel 1: Berechnung der Herzfunktionsparameter anhand der echokardiographischen Messungen

Publikationen, Kongressbeiträge und Stipendien

Publikationen

Frankenreiter, S., Straubinger, J., Kniess, A., Mohr, E., Logan, A., Murphy, M., Gawaz, M., Krieg, T., Ruth, P. and Lukowski, R. "cGMP-elevating compounds and ischemic conditioning provide cardioprotection against ischemia and reperfusion injury via cardiomyocyte-specific BK channels." [**submitted** beim Journal **Circulation**, manuscript number: CIRCULATIONAHA/2017/028723]

Frankenreiter, S., Groneberg, D., Krieg, T., Ruth, P., Friebe, A. and Lukowski, R. "Cardioprotection by ischemic postconditioning and cGMP-elevating agents involves cardiomyocyte nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase." [**submitted** beim Journal **Cardiovascular Research**, manuscript number: CVR-2017-270]

Vorherige Arbeiten

Yabas, M., Teh, C.E., Frankenreiter, S., Lal, D., Roots, C.M., Whittle, B., Andrews, D.T., Zhang, Y., Teoh, N.C., Sprent, J., Tze, L.E., Kucharska, E.M., Kofler, J., Farrell, G.C., Bröer, S., Goodnow, C.C. and Enders, A. (2011) "ATP11C is critical for the internalization of phosphatidylserine and differentiation of B lymphocytes." **Nature Immunol.** 12(5):441-9.

Enders, A., Stankovic, S., Teh, C., Uldrich, A.P., Yabas, M., Juelich, T., Altin, J.A., Frankenreiter, S., Bergmann, H., Roots, C.M., Kyparissoudis, K., Goodnow, C.C. and Godfrey, D.I. (2012). "ZBTB7B (Th-POK) regulates the development of IL-17-producing CD1d-restricted mouse NKT cells." **J Immunol.** 189(11):5240-9.

Kongressbeiträge

Sandra Frankenreiter, Angelina Kniess, Thomas Krieg, Peter Ruth und Robert Lukowski; „Role of BK_{Ca} channels for ischemic postconditioning and survival of the myocardium“; Summer School Tracking fast signalling in processes in vivo - mechanisms, targets and tools; 18.-20.07.2014 in Kloster Frauenchiemsee, Deutschland (*Vortrag*)

Sandra Frankenreiter, Angelina Kniess, Peter Ruth, Thomas Krieg, Andreas Friebe und Robert Lukowski; „Cardioprotection against ischemia/reperfusion injury by cyclic GMP

signaling and mitochondrial BK channels“; Conference New Developments in Signal Transduction & cGMP research; 18.-20.01.2015 in Rottenburg am Neckar, Deutschland (*Poster*)

Sandra Frankenreiter, Angelina Kniess, Peter Ruth, Thomas Krieg und Robert Lukowski; „Role of BK_{Ca} channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury“; 2nd European Calcium Channel Conference; 13.-16.05.2015 in Alpbach, Österreich (*Poster*)

Sandra Frankenreiter, Angelina Kniess, Peter Ruth, Thomas Krieg, Andreas Friebe und Robert Lukowski; „Cyclic GMP signaling and mitochondrial BK channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury“; 7th International Conference on cGMP Generators, Effectors and Therapeutic Implications; 19.-21.06.2015 in Trier, Deutschland (*Poster*)

Sandra Frankenreiter; „BK channels as target of cGMP signaling in myocardial pre- and postconditioning and survival“; Summer Retreat; 27.-29.07.2016 in Kloster Frauenchiemsee, Deutschland (*Vortrag*)

Sandra Frankenreiter, Eva Mohr, Angelina Kniess, Peter Ruth, Thomas Krieg und Robert Lukowski; „Role of BK_{Ca} channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury“; 15th International Summer School Inflammation, Immunomodulation, Inspiration; 07.-09.08.2016 in Bönigen, Schweiz (*Vortrag*)

Sandra Frankenreiter, Eva Mohr, Angelina Kniess, Peter Ruth, Thomas Krieg, Andreas Friebe und Robert Lukowski; „Cardiomyocyte cGMP and mitochondrial BK channels exert cardioprotection against ischemia/reperfusion injury“; DPhG Jahrestagung 2016; 04.-07.10.2016 in München, Deutschland (*Poster*)

Stipendien

Boehringer Ingelheim Fonds travel grant für den zweimonatigen Forschungsaufenthalt in der Arbeitsgruppe von Thomas Krieg an der University of Cambridge, UK i.H.v. € 2200.- (2013)

Leopoldina-travel grant für die Kongressteilnahme an der 2nd European Calcium Channel Conference in Alpbach, Österreich i.H.v. € 300.- (2015)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von September 2012 bis Januar 2017 unter der wissenschaftlichen Anleitung von JProf. Dr. Robert Lukowski und Prof. Dr. Peter Ruth im Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und klinische Pharmazie des Pharmazeutischen Instituts der Universität Tübingen angefertigt.

Mein besonderer Dank geht an JProf. Dr. Robert Lukowski für die hervorragende Betreuung während meiner Promotionszeit, für die interessanten wissenschaftlichen Diskussionen und die entgegengebrachte Unterstützung, sowie für den Freiraum die wissenschaftlichen Fragestellungen mit eigenen Ideen und Lösungsvorschlägen anzugehen. Außerdem bedanke ich mich bei ihm dafür, dass er es mir ermöglicht hat neue, herausfordernde *in-vivo*-Techniken zu erlernen und interessante Kongresse zu besuchen.

Prof. Dr. Peter Ruth danke ich sehr für die Bereitstellung des spannenden Themas, sowie für die guten wissenschaftlichen Ideen, das entgegengebrachte Vertrauen und die zahlreichen interessanten und netten Gespräche am Institut und auf den Fahrten zu Kongressen.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Andreas Friebe von der Julius-Maximilians Universität in Würzburg bedanken - zum einen, dass er mir seine Mäuse bei Bedarf jederzeit zur Verfügung gestellt hat und zum anderen für die guten Gespräche und wissenschaftlichen Diskussionen als mein „Mentor“ in unserer DFG-Forschergruppe und natürlich für seine sofortige Zusage auch als Prüfer meiner Dissertation mitzuwirken.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Prof. Dr. Harald Groß für die Bereitschaft sich bei meiner mündlichen Prüfung als Prüfer zu beteiligen.

Ein großer Dank geht an Dr. Julia Straubinger für die große technische Unterstützung bei der Durchführung der echokardiographischen Messungen sowie für ihre große Hilfsbereitschaft mir bereits von Beginn meiner Promotion an wichtige Labortechniken beizubringen.

DANKSAGUNG

Ich möchte mich zudem besonders bei Dr. Carmen Methner und Dr. Thomas Krieg von der University of Cambridge, UK bedanken, dass ich bei ihnen die Operationstechniken zum akuten und chronischen Infarktmodell lernen durfte.

Ich danke Dr. Angela Logan und Dr. Michael Murphy von der MRC Mitochondrial Biology Unit, Cambridge, UK für die Kooperation zur ROS-Messung *in vivo*.

Außerdem bedanke ich mich ganz herzlich bei Clement, Iloni, Isolde, Katrin und Michael für die technische Hilfe sowie für die aufopferungsvolle Tierstallararbeit.

Ein besonderer Dank geht natürlich an Julia I., Julia S., Anne, Christina, Markus, Rebekka, Corinna, Friederike, Lena, Angelina, Lucas und Steffi für ihre Hilfsbereitschaft und die nette Atmosphäre im Labor sowie für die schöne Zeit auch außerhalb der Arbeit und die vielen gemeinsamen lustigen Unternehmungen. Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Masterstudentin Eva, die mit ihrer Arbeit das Vorankommen dieses Projektes sehr unterstützt hat, und bei allen anderen, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Des Weiteren danke ich unserer Forschergruppe FOR2060 „cGMP signalling in cell growth and survival“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) zum einen für die Finanzierung und zum anderen für die guten Kooperationen, Quervernetzungen und Freundschaften, die aus den gemeinsamen Treffen entstanden sind.

Abschließend möchte ich mich noch ganz herzlich bei Korbinian und meinen Eltern bedanken, die mich in meinem Vorhaben immer unterstützt haben, die immer ein offenes Ohr für mich haben und mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stehen.