

Einfluss der Ischämiedauer auf die protektive Wirkung
der ischämischen Postkonditionierung

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

vorgelegt von

Tim Frodermann

aus

Koblenz

Gießen 2019

Aus dem Institut für Physiologie,
unter der Leitung von Prof. Dr. R. Schulz,
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. K.-D. Schlüter

Gutachter: Prof. Dr. Dr. R. Matejec

Tag der Disputation: 17.06.2020

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	
1.1	Sozialmedizinische Bedeutung von ischämischen Herzkrankheiten	1
1.2	Akutes Koronarsyndrom (ACS)	1
1.3	Myokardinfarkt und Pathogenese	3
1.4	Therapie	4
1.5	Pathophysiologie – Ischämiephase	5
1.6	Frühes Reperfusionsgeschehen	5
1.7	Allgemeines Infarktgeschehen	6
1.8	Kardioprotektion – Prä- und Postkonditionierung	7
1.9	Fragestellung und methodische Voraussetzungen	9
2	Material	11
2.1	Chemikalien	11
2.2	Lösungen und Puffer	12
2.3	Geräte und Laborbedarf	14
2.3.1	Langendorff-System	14
2.3.2	Geräte	15
2.3.3	Laborbedarf	16
2.4	EDV	17
3	Methoden	19
3.1	Versuchsherzen	19
3.2	Versuche am isoliert perfundierten Herzen	19
3.2.1	Modell nach Langendorff-Prinzip	19
3.2.2	Versuchsaufbau	20
3.2.3	Versuchsvorbereitung	21
3.2.4	Präparation der Nagetierherzen	21
3.2.5	Versuchsdurchführung	21
3.2.6	Versuchsprotokoll	22
3.3	Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion	23
3.3.1	Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion	23
3.3.2	RNA-Isolierung aus Herzmuskelgewebe	26

3.3.3	Bestimmung der RNA-Konzentration mittels NanoDrop®	27
3.3.4	Synthese von cDNA aus RNA	28
3.3.5	Vorbereitung der Primer	29
3.3.6	Polymerase-Kettenreaktion im iCycler®	30
3.3.7	Auswertung der real-time PCR	31
3.4	Proteinnachweis durch die Gelelektrophorese	32
3.4.1	Proteinisolierung aus den Kardiomyozyten	32
3.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
3.4.3	Aufbau und Durchführung der SDS-PAGE	33
3.4.4	Übertragung durch Western Blot	34
3.4.5	Nachweis durch Chemilumineszenz	36
3.4.6	Auswertung der Bilder	38
3.4.7	Statistik	38
4	Ergebnisse	39
4.1	Untersuchungen der Herzfunktionen an Rattenherzen in der Langendorff-Apparatur	39
4.1.1	Untersuchung der Herzrate	39
4.1.1.1	Herzrate nach 15 Minuten Ischämiedauer	39
4.1.1.2	Herzrate nach 60 Minuten Ischämiedauer	40
4.1.2	Untersuchung des linksventrikulär enddiastolischen Drucks	41
4.1.2.1	Linksventrikulär enddiastolischer Druck (LVEDP) nach 15 Minuten Ischämiedauer	41
4.1.2.2	Linksventrikulär enddiastolischer Druck (LVEDP) nach 60 Minuten Ischämiedauer	43
4.1.3	Untersuchung des linksventrikulär entwickelten Druckanstiegs	45
4.1.3.1	Der linksventrikulär entwickelte Druckanstieg (LVDP) nach 15 Minuten Ischämiedauer	45
4.1.3.2	Der linksventrikulär entwickelte Druckanstieg (LVDP) nach 60 Minuten Ischämiedauer	46
4.1.4	Untersuchung des Frequenz-Druck-Produktes	48
4.1.4.1	Das Frequenz-Druck-Produkt (RPR) nach 15 Minuten Ischämie	48
4.1.4.2	Das Frequenz-Druck-Produkt (RPR) nach 60 Minuten Ischämie	49

4.1.5	Untersuchung des Verhältnisses von Herzgewicht zu Körpergewicht (HW/BW)	50
4.2	Beschreibung der transkriptionellen Adaption mittels Polymerase-Kettenreaktion zur quantitativen Erfassung der Änderungen	51
4.2.1	Expression von Mef2c	52
4.2.2	Expression von Gata4	53
4.2.3	Expression von BNP	54
4.2.4	Expression von Serca2a	55
4.2.5	Expression von Arginase 1	55
4.3	Western Blot	56
4.3.1	Proteinnachweis von Gata4	57
4.3.2	Proteinnachweis von Serca2a	57
4.3.3	Proteinnachweis von Arginase 1	58
4.4	Untersuchungen der Herzfunktionen an Mäuseherzen in der Langendorff-Apparatur	59
4.4.1	Untersuchung des systolischen Drucks	59
4.4.2	Untersuchung des diastolischen Drucks	62
4.4.3	Untersuchung des ventrikulär entwickelten Druckanstiegs	64
4.5	Veränderung des Transkriptionsmusters	67
4.5.1	Expression von Arginase 1	67
4.5.2	Expression von Gata4	68
4.5.3	Expression von Mef2c	69
5	Diskussion	71
5.1	Hauptbefunde	71
5.2	Beeinflussung des Expressionsverhaltens von Mef2c	72
5.3	Beeinflussung des Expressionsverhaltens von Gata4	74
5.4	Beeinflussung des Expressionsverhaltens von BNP	75
5.5	Beeinflussung des Expressionsverhaltens von Serca2a	76
5.6	Beeinflussung des Expressionsverhaltens von Arginase 1	77

6	Zusammenfassung	80
7	Summary	81
8	Abkürzungsverzeichnis	V
9	Literaturverzeichnis	VIII
10	Publikationsverzeichnis	XV
11	Danksagung	XVI
12	Erklärung	XVII

1 Einleitung

1.1 Sozialmedizinische Bedeutung von ischämischen Herzkrankheiten

Das Wort Ischämie stammt aus dem Altgriechischen und bedeutet übersetzt „das Zurückhalten von Blut“. Von ischämischen Herzerkrankungen spricht man sobald sich die Problematik auf das Herz bezieht, was meistens auf einer Verengung der Herzkranzgefäße durch atherosklerotische Plaques basiert. Die Bezeichnung „Ischämische Herzerkrankung“ wird synonym der Koronaren Herzerkrankung (KHK) verwendet. Die KHK führt zu einer Verminderung der koronararteriellen Perfusion des Herzens bis hin zur Koronarinsuffizienz. Das Sauerstoffangebot steht dabei in einem Missverhältnis zum Sauerstoffbedarf. Folgen der ischämischen Herzerkrankung stellen allen voran Myokardinfarkte und Herzinsuffizienz dar, welche zu den Herz-Kreislauf-Erkrankungen gezählt werden und seit mehreren Jahren die häufigste Todesursache in der Bundesrepublik Deutschland und anderen Industrienationen darstellen.

Das Statistische Bundesamt (Destatis) beziffert die Zahl der Todesfälle infolge dieser Erkrankungen im Jahr 2015 auf über 356.000 Menschen - allein in Deutschland. Das entspricht circa 39 % aller Sterbefälle, wobei Männer häufiger als Frauen betroffen sind. Die zweithäufigste Todesursache stellen Krebserkrankungen mit annähernd 25 % dar („Statistisches Bundesamt,“ 2017). Im Deutschen Herzbericht 2016 ist die Zahl der Mortalität von Herzerkrankungen für das Jahr 2014 genauer differenziert. Demnach starben im Jahr 2014 121.116 Menschen an ischämischen Herzerkrankungen und 44.551 an Herzinsuffizienz. Neben Herzerkrankungen wie Herzklappenvitien, Herzrhythmusstörungen und angeborenen Fehlbildungen stellen die erstgenannten Störungsbilder den größten Anteil dar (Meinertz, 2016). Infolge verbesserter Prävention, Diagnostik und Therapie ist die Letalität bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen in den letzten 20 Jahren deutlich zurückgegangen und die Lebenserwartung in Deutschland gestiegen (Roessner, Pfeifer, & Müller-Hermelink, 2008).

1.2 Akutes Koronarsyndrom (ACS)

Der Begriff „Akutes Koronarsyndrom“ (ACS) fasst die drei Verlaufsformen der KHK zusammen, die jede für sich lebensbedrohlich ist. Dazu zählen die instabile Angina pectoris, der akute Myokardinfarkt und der plötzliche Herztod (Hamm et al., 2005). Bei der instabilen Angina pectoris liegt eine reversible Myokardischämie ohne konsekutive Nekrose vor (Roessner et al., 2008). Der Myokardinfarkt ist definiert als myokardialer Zelltod, hervorgerufen durch eine anhaltende Myokardischämie (Thygesen et al., 2007).

Von einem plötzlichen Herztod wird gesprochen, wenn der Patient vor dem Tod typische Symptome der myokardialen Ischämie verspürte und im Elektrokardiogramm (EKG) zusätzlich typische Ischämie-Veränderungen vorlagen (Schofer, Hamm, Katus, Kelm, & Blankenberg, 2014).

Das Leitsymptom des ACS ist der akute Thoraxschmerz, welcher als dumpf, drückend oder einengend beschrieben wird. Der Schmerz ist typischerweise retrosternal lokalisiert (links > rechts) und kann in Schulter, Arme, Rücken, Hals, Kiefer oder Oberbauch ausstrahlen. Andere Symptome wie Dyspnoe, Kaltschweißigkeit oder Angstzustände können den Schmerz begleiten. Anhand klinischer Symptome lässt sich ein Herzinfarkt nicht von einer instabilen Angina pectoris unterscheiden. Zur weiteren Differenzierung des ACS dienen deshalb das EKG und die Blutuntersuchung (Labor).

In dem ersten apparativen Diagnoseschritt wird mit Hilfe des EKG untersucht, ob ein „ST-segment-elevation myocardial infarction“ (STEMI) vorliegt. Im Falle des STEMI liegt i.d.R. ein kompletter Verschluss einer Koronararterie vor, was zu einem transmuralen Infarkt führt, welcher eine schlechtere Prognose als der NSTEMI aufweist (Achenbach, Szardien, Zeymer, Gielen, & Hamm, 2012).

Sind keine ST-Streckenveränderungen vorhanden, wird anhand einer Blutuntersuchung zwischen einem „Non-ST-segment-elevation myocardial infarction“ NSTEMI und einer instabilen Angina pectoris differenziert. Der NSTEMI weist einen hochgradigen, aber nicht kompletten Verschluss der blutversorgenden Gefäße auf. Da das Myokard von außen nach innen mit Blut versorgt wird, ist bei einem NSTEMI meist die subendokardiale Schicht von der Durchblutungstörung betroffen. Die Biomarker Troponin und das Enzym Kreatinkinase muscle brain (CK-MB) sind beim NSTEMI erhöht, welche bei einer instabilen Angina pectoris im Referenzbereich liegen.

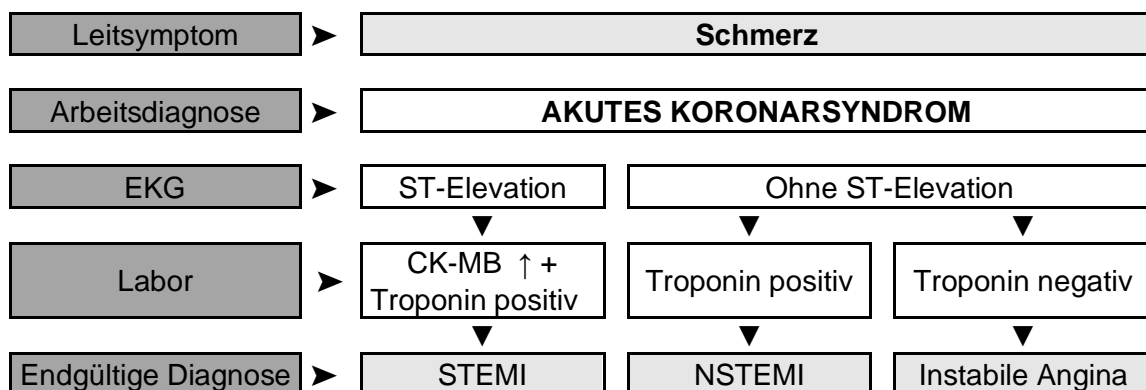


Abbildung 1.2-1: Leitlinien Akutes Koronarsyndrom – modifiziert aus Hamm et. al., Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, 2005

1.3 Myokardinfarkt und Pathogenese

Bei über 95 % der Herzinfarkte ist die Ursache ein Gefäßverschluss durch Thrombenbildung in Folge einer Plaqueruptur auf dem Boden einer KHK. Die Pathogenese der Atherosklerose beruht auf einem über Jahrzehnte ablaufendem Prozess, dessen Ausgangspunkt auf eine endotheliale Dysfunktion zurückgeht. Begünstigt wird eine Funktionsstörung der innersten Gefäßschicht, der Intima, durch die kardiovaskulären Risikofaktoren. Zu den Hauptrisikofaktoren zählen arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Nikotinabusus, familiäre Prädisposition, ein höheres Lebensalter (Männer ≥ 45 Jahre, Frauen ≥ 55 Jahre) sowie eine LDL-Cholesterin-Erhöhung und HDL-Cholesterin-Erniedrigung (Herold, 2013).

Eine Schädigung der Intima kompensiert das Endothel zunächst mit veränderten Adhäsions- und Permeabilitätseigenschaften für Plasmabestandteile und der lokalen Produktion von Zytokinen, vasoaktiven Substanzen und Wachstumsfaktoren. Im Verlauf setzt ein Entzündungsprozess an der geschädigten Stelle ein und es bilden sich „*fatty streaks*“, welche die früheste atherosklerotische Läsion darstellen. Im subintimalen Raum kommt es zur Aufquellung und Einlagerung von Wasser, Plasmabestandteilen und Fettablagerungen. Lipoproteine führen zum Einwandern von Makrophagen und Monozyten, welche diese phagozytieren. Dabei wandeln sich die Makrophagen in Schaumzellen, sogenannte „*foam cells*“ um. Aufgrund von Wachstumsfaktoren siedeln sich zudem glatte Muskelzellen unter der Intima an. Eine Veränderung der Adhäsionseigenschaften an der Endotheloberfläche bewirkt ein Anheften von Leukozyten und Thrombozyten. Diese Entwicklung kann bereits im Kindesalter beginnen und führt zunächst zu keiner relevanten Stenosierung der Gefäße.

Über mehrere Jahre entwickeln sich die „*fatty streaks*“ zu komplizierten Plaques. Dabei bildet sich durch den Einfluss von Wachstumsfaktoren eine fibröse Schicht zwischen der atherosklerotischen Läsion und dem Gefäßlumen. Unter dieser sich ins Lumen wölbenden Kappe befinden sich Lipide, Leukozyten, Makrophagen und Zelldebris, die zusammen einen nekrotischen Kern ansetzen. Durch diese abdichtende Schicht kommt es zu einer Störung der Vasomotorik. Da die durch Stickstoffmonoxid (NO) vermittelte endothelabhängige Vasodilatation nach einem Ischämieerz unzureichend ist, ist die Konsequenz ein Ungleichgewicht zu Gunsten vasokonstriktiver Mediatoren wie Endothelin, Thromboxan oder Angiotensin II. Getriggert durch körperliche Belastung, Vasokonstriktion, Hypertonie oder Tachykardie kann es im weiteren Verlauf zur Instabilität oder Plaque-Ruptur kommen. Aber auch Ulzerationen der fibrösen Kappe können zu einem Übertritt von thrombogenem Inhalt mit Bildung eines in das

Gefäßlumen vorwölbendem Abscheidungsthrombus führen. Dieser Thrombus kann Auslöser einer transienten oder persistierenden, partiellen oder kompletten Gefäßokklusion mit konsekutiver Ischämie sein.

Seltener Gründe (< 5%) für einen Gefäßverschluss stellen Vaskulitiden, kongenitale Koronaranomalien, anhaltende Vasospasmen, Aortendissektionen mit Beteiligung der Herzkranzgefäße oder Embolien, die ihren Ursprung außerhalb des Koronarsystems haben, dar. Die Folge einer Ischämie ist die Infarzierung eines nicht mehr von Blut versorgten Gewebeareals, welches im Verlauf nekrotisch wird.

1.4 Therapie

Im Rahmen der akuten Herzinfarkttherapie hat die frühzeitige Diagnosestellung und die Einleitung der Therapie eine große Bedeutung. Prähospital soll medikamentös der myokardiale Sauerstoffbedarf reduziert werden. Durch antiischämische Substanzen wie Nitrate, Betablocker oder Calciumantagonisten wird der Bedarf durch Reduktion von Vorlast, Herzfrequenz, Blutdruck und Herzkontraktilität gesenkt. Gleichzeitig wird durch eine koronare Vasodilatation die Sauerstoffversorgung am Herzen verbessert.

Ein weiterer Therapieansatz ist die Vorbeugung, die durch Thrombozyten-Aggregationshemmer wie Acetylsalicylsäure und Antikoagulanzen wie Heparine, die Bildung weiterer Thromben verhindern soll (Achenbach et al., 2012). Die Revaskularisation einer okkludierten Koronararterie sollte so früh wie möglich erfolgen, um eine weitere Ausdehnung des Infarktareals zu verhindern. Die bevorzugte Therapie beim STEMI zur Wiedereröffnung stellt die perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) mit der Möglichkeit einer Stent-Implantation dar. Ist die Möglichkeit einer Katheter-Intervention innerhalb von 90 Minuten nicht gegeben, sollte eine Fibrinolyse durchgeführt werden. Nicht ST-Hebungsinfarkte werden aufgrund der Risikomerkmale der Patienten individuell behandelt. Das Spektrum reicht von der konservativen Therapie bis zur PTCA (Hamm et al., 2005). Neben diesen beiden Therapiemöglichkeiten kann auch eine operative Revaskularisation mittels aortokoronarem Bypass nötig sein (Bonzel et al., 2008).

1.5 Pathophysiologie - Ischämiephase

In der Frühphase der akuten Ischämie kommt es hypoxiebedingt zu einem intrazellulären Energiedefizit. Da die Sauerstoffreserven des Myokards rasant aufgebraucht werden, führt dies zum Abbau von Adenosintriphosphat (ATP) und zur Entstehung von Hypoxanthin. Die Kardiomyozyten stellen ihre Energiegewinnung von aerober auf anaerobe Glykolyse um. Die Ansammlung des Endproduktes Laktat ist die Folge, was zu einer Gewebsazidose mit pH-Wert-Veränderung führt (Jennings, 1969). Durch den Ausfall der ATP-abhängigen Ionenporter kommt es zum Kaliumausstrom und Calciueinstrom in die Kardiomyozyten. Das Membranpotential kann dadurch nicht mehr aufrecht erhalten werden und es bilden sich intrazelluläre Ödeme mit osmotisch bedingter Ruptur des Sarkolemms. Zelluläre Bestandteile werden freigesetzt und es kommt zur Produktion freier Radikale, welche zu weiteren Zellschäden führen (Murphy & Steenbergen, 2008). Somit entsteht eine Entzündungsreaktion, die im weiteren Verlauf zum unkoordinierten Zelltod führt. Die Nekrose induziert die Aktivierung des Komplementsystems, generiert freie Radikale und triggert eine Zytokinkaskade (Holmes, Borg, & Covell, 2005).

1.6 Frühes Reperfusionsgeschehen

Eine zügige Revaskularisation ist - wie unter Punkt 1.4 beschrieben - ein wichtiges Therapieziel in der Herzinfarkt-Therapie, um den Myokardschaden gering zu halten. Paradoxerweise kommt es nach der Wiedereröffnung des verschlossenen Gefäßes zu weiteren Zellschäden.

Eine wesentliche Rolle am akuten postischämischen Reperfusionsgeschehen nehmen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) ein. Zu ihnen zählen unter anderen das Superoxid-Anion (O_2^-), das Hydrogen-Peroxid (H_2O_2) und das Hydroxyl-Radikal ($OH\cdot$). Sie entstehen während der normalen Zellatmung in Mitochondrien, NADPH-Oxidasen, Xanthin-Oxidasen und NO-Synthasen. In moderater Konzentration erfüllen sie als Signalmoleküle physiologische Funktionen. Antioxidative Stoffwechselwege, wie der durch die Superoxiddismutase katalysierte Weg, fungieren als Schutzsystem, indem sie für ein ausgewogenes Maß an ROS sorgen. Ist diese Balance durch einen Überschuss an ROS gestört, wird diese Stoffwechsellage als oxidativer Stress bezeichnet. In hohen

Konzentrationen führen ROS dann zu Beeinträchtigungen der Zellenfunktionen durch Schäden an Lipiden, Proteinen und DNA (Schieber & Chandel, 2014).

1.7 Allgemeines Infarktgeschehen

Generell unterliegt das Infarktgeschehen einer Dynamik und läuft in mehreren aufeinanderfolgenden Phasen ab (Holmes et al., 2005). Der Akutphase folgt die Inflammationsphase. Durch den Zellschaden und die Entzündungsreaktion wandern neutrophile Granulozyten in das Nekroseareal ein (Fang, Moore, Dart, & Wang, 2015). Diese besitzen für die Abwehr von Bakterien bestimmte Enzyme, deren Aktivität weitere Zellschäden hervorrufen. Neben der Myeloperoxidase, welche OH⁻ produziert (Vinten-Johansen, 2004), trägt die NADPH-Oxidase mit der Produktion von O₂⁻ einen entscheidenden Anteil dazu bei (Babior, 2000). Des Weiteren wandern Monozyten in das Entzündungsgebiet ein und differenzieren sich in Makrophagen. Diese phagozitieren Zelldebris nekrotischer Kardiomyozyten und produzieren Zytokine, Enzyme und Wachstumsfaktoren, welche die Wundheilung und Narbenbildung im Verlauf wesentlich beeinflussen (Weihrauch, Arras, Zimmermann, & Schaper, 1995).

Im Anschluss folgt die fibrotische Phase. Sie beginnt, sobald es zu einem rasanten Anstieg an Fibroblasten und Kollagen im Infarktareal kommt und wird auch proliferative Phase genannt. Beim menschlichem Herzen setzt diese am 7. Tag nach dem Infarktgeschehen ein und dauert ungefähr drei Wochen (Holmes et al., 2005). In dieser Phase der Wundheilung nimmt die Anzahl der Makrophagen ab und Fibroblasten bilden den größten Anteil in der Infarktregion. Es entsteht eine „reife“ Narbe aus Bindegewebe und Kollagenfasern, die das Narbengewebe vernetzen und damit stabilisieren.

Fibroblasten gehen im Verlauf in die Apoptose, sodass der Zellanteil in der Narbe geringer wird (Takemura et al., 1998). In dieser Ausreifungsphase kommt es zu einer Verminderung der Narbendicke. Diese Umbauvorgänge des Myokards werden als „*Remodeling*“ bezeichnet. Dabei kommt es zu kontinuierlichen Umbau- und Anpassungsprozessen mit Veränderungen der Herzarchitektur und Biomechanik. Neben der Reduzierung der Wanddicke und Ausbreitung des infarzierten Gebiets, dilatiert der linke Ventrikel. Die Zunahme des Ventrikelumfangs führt zu einer Steigerung der systolischen und diastolischen Wandspannung. Zur Kompensation dieser höheren Anforderung hypertrophiert das Myokard in den nicht infarzierten Arealen. Die Hypertrophie hat zur Folge, dass eine systolische Funktionseinschränkung mit einer weiteren Zunahme der Füllungsdrücke entsteht. Es resultiert eine Progression der

linksventrikulären Dilatation und eine Steigerung des myokardialen Sauerstoffverbrauchs. Die Folge ist ein Circulus vitiosus mit stetiger Abnahme der Leistungsfähigkeit und Lebensqualität (Renz-Polster & Krautzig, 2013).

1.8 Kardioprotektion - Prä- und Postkonditionierung

Sowohl in der Ischämie- als auch in der Reperfusionsphase kommt es zu Schäden an den Kardiomyozyten bis hin zum Zelltod. Um die Ischämietoleranz zu erhöhen und den Gewebeschaden gering zu halten, wird an Therapiemöglichkeiten geforscht. Zu diesen zählen die ischämischen und die pharmakologischen Konditionierungen. Bei beiden Ansätzen unterscheidet der Zeitpunkt der Intervention in Bezug auf das eigentliche Ischämieereignis zwischen Präkonditionierung und Postkonditionierung. Dabei zielen alle Konditionierungen auf das Eingreifen in Signaltransduktionswege der Kardiomyozyten ab, um eine schützende Wirkung auf ein lang andauerndes Ischämieereignis zu erlangen.

Weitere Formen der Konditionierungen stellen die heterotopen Konditionierungen dar. Sie werden auch als Fernkonditionierungen bezeichnet, bei denen in anderen Organen oder peripheren Gefäßgebieten kurze Ischämiephasen erzeugt werden. In diesen Arealen werden potentiell kardioprotektive Substanzen ausgeschüttet, die über den Blutweg zum Herzen gelangen (Przyklenk, Darling, Dickson, & Whittaker, 2003).

Bei den ischämischen Konditionierungen wird vor, beziehungsweise nach, dem eigentlichen Ischämieereignis, durch kurze repetitive Unterbrechungen der Koronarperfusion und folgender Reperfusion, ein Reiz gesetzt, welcher das Herz vor dem schädigenden Ereignis schützt. Bereits 1986 konnte Charles E. Murry in einem Experiment mit Hunden eine Reduzierung der Infarktgröße um 75 % durch Präkonditionierung nachweisen. Während die Kontrolltiere (n = 5) einer 40-minütigen Okklusion der Koronararterien ausgesetzt waren, erhielt die Versuchsgruppe (n = 7) eine Präkonditionierung von vier Zyklen aus wechselnder Okklusion und Reperfusion von jeweils fünf Minuten. Neben der Reduzierung der Infarktgröße wiesen die konditionierten Tiere auch eine Verminderung der Anzahl von Reperfusionsarrhythmien und der myokardialen Apoptose auf (Murry, Jennings, & Reimer, 1986).

Während die Präkonditionierung sich nur schwer in den klinischen Alltag integrieren lässt, bietet die Postkonditionierung eine bessere Umsetzbarkeit. Das Myokard wird hierbei nach dem Infarkt dem protektiven Stimulus ausgesetzt. Die schützende Wirkung der Postkonditionierung konnte Zhao et. al ebenfalls bei Versuchen an Hunden

nachweisen. Er verglich die Kontrolltiere (n = 10), welche 60 Minuten Ischämie und anschließend drei Stunden Reperfusion erfuhren, mit konditionierten Hunden. Die präkonditionierten Hunde (n = 9) erhielten vor dem einstündigen Ischämieereignis eine Ischämie von fünf Minuten und eine Reperfusion von zehn Minuten. Die postkonditionierten Hunde (n = 10) machten drei Zyklen aus wechselnder Ischämie und Reperfusion von je 30 Sekunden durch, ehe auch sie die dreistündige Reperfusion durchliefen. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass die Postkonditionierung ähnlich positive Effekte auf das Myokard hatte wie die Präkonditionierung. Sie führte zu einer Reduzierung der Infarktgröße und des Gewebeödems und schützte die endotheliale Funktion (Zhao et al., 2003).

Die positiven Effekte der ischämischen Konditionierungen sind auf verschiedene Signaltransduktionswege zurückzuführen, welche nicht vollends verstanden sind. Dabei nehmen sie Einfluss auf die Funktion der Mitochondrien, die für die Energiegewinnung der Zelle und somit für das Zellüberleben unverzichtbar sind. Gleichwohl sind die Mitochondrien an der Regulation der Apoptose und Nekrose beteiligt. Eine entscheidende Rolle nimmt hierbei die mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP) ein (Hausenloy, Duchon, & Yellon, 2003). Vorrangig in der frühen Reperfusionsphase, aber auch während der Ischämiedauer, erhöhen ROS, Calcium und anorganische Phosphate die Öffnungswahrscheinlichkeit der mPTP. Im geöffneten Zustand ist sie unselektiv durchlässig für Wasser und andere Moleküle. Dadurch kann das mitochondriale Membranpotential nicht mehr aufrechterhalten werden, was letztlich zum Versagen der Atmungskette und der Energiegewinnung führt (Hausenloy et al., 2003).

Ein bekannter Signalweg der Kardioprotektion durch ischämische Präkonditionierung ist der *reperfusion injury salvage kinase* (RISK)-pathway (Hausenloy et al., 2003). Er kann durch Mediatoren wie Adenosin, Bradykinin und Opioide aktiviert werden. Diese binden an G-Protein-Rezeptoren, welche das Signal intrazellulär weiterleiten. Dort werden parallel verschiedene Kinase-Wege in Gang gesetzt. Zum einen wird mit Hilfe der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) die Proteinkinase B (AKT) (Tsang, Hausenloy, Mocanu, & Yellon, 2004) und zum anderen die mitogen-aktivierte Kinase (MEK 1/2, auch extrazellulär regulierte Kinase (ERK 1/2) genannt) aktiviert (Darling et al., 2005). Beide Signaltransduktionswege vereinen sich bei der p70-ribosomalen-S6-Proteinkinase (p70_{S6K}) wieder. Diese aktiviert durch Phosphorylierung die Glykogensynthasekinase-3-β, wodurch die Öffnungswahrscheinlichkeit der mPTP verringert wird, was letztlich zur Kardioprotektion führt (Heusch, Boengler, & Schulz, 2008).

1.9 Fragestellung und methodische Voraussetzungen

Für die Lebensqualität aller Patienten ist es von besonderer Bedeutung, den Myokardschaden gering zu halten. Dafür müssen Signalwege in den Kardiomyozyten auf molekularbiologischer Ebene erforscht und verstanden werden. Es ist bereits erforscht, dass die Signalwege durch ischämische Konditionierungen angestoßen werden und protektive Effekte auf das Myokard haben.

In der hier vorliegenden Arbeit soll der Einfluss der Ischämiedauer auf die protektive Wirkung der ischämischen Postkonditionierung untersucht werden. Neben der Ischämiedauer nehmen verschiedene Faktoren Einfluss auf das Ausmaß eines Myokardschadens in Folge eines Herzinfarktes. Die Gefäßokklusion einer Koronararterie kann an unterschiedlichen Orten erfolgen. Liegt der Verschluss eher zentral vor, ist das Versorgungsgebiet der Herzkranzarterie und somit das geschädigte Areal im Falle einer Ischämie größer als bei einem peripheren Verschluss. Eine weitere Beeinflussung kann durch das Vorliegen verschiedener Versorgungstypen sowie Kollateralarterien entstehen. Auch die Hämodynamik kann Auswirkungen auf die Ausprägung des Myokardschadens nehmen. Insbesondere die Herzfrequenz, welche Einfluss auf den myokardialen Sauerstoffverbrauch nimmt, ist hierbei entscheidend. Im experimentellen Langendorff-Modell wird durch die Unterbrechung der Perfusion eine globale Ischämie simuliert. Dadurch wird der Einfluss der Faktoren bezüglich des Ausmaßes des Myokardschadens auf die Bedeutung der Ischämiedauer reduziert. In dem Modell lassen sich Ischämiedauer sowie Konditionierungsmanöver beliebig nachstellen. Zudem ist die Aufzeichnung von Herzparametern möglich. Neben nicht-ischämischen Kontrollherzen, Versuchsherzen mit kürzerer und Versuchsherzen mit längerer Ischämiedauer wurden Herzen unterschiedlicher Ischämiedauer und zusätzlicher Postkonditionierung auf den Einfluss der Ischämiedauer untersucht.

Nach der Analyse der Herzparameter im Langendorff-Modell wurde die transkriptionelle Adaption der Versuchsherzen in der Polymerase-Kettenreaktion untersucht. In einem

letzten Schritt wurden anschließend die Genexpressionen auf Proteinebene bestätigt. Dazu wurden folgende Fragestellungen beantwortet:

- Nimmt die Dauer der Ischämie Einfluss auf die protektive Wirkung der Postkonditionierung?
- Wenn ja, sind positive Effekte, wie nach einer kurzen Ischämie, ebenfalls nach einer langen Ischämie festzustellen?
- Lassen sich Beeinflussungen des frühen Postinfarkt-Remodelings in Abhängigkeit von der Ischämiedauer nachweisen?

2 Material

2.1 Chemikalien

Albumin Fraktion V (BSA)	Carl-Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
Aqua bidest.	Braun, Melsungen
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloroform	Carl-Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP)	Invitrogen, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Darmstadt
Ethanol	Carl-Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
Glucose	Carl-Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
Isopropanol	Carl-Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
iQ™SYBR® Green Supermix	Bio-Rad Laboratories, München
Kaliumchlorid	Carl-Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
Laemmli Puffer (2x)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magnesiumchlorid	Carl-Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
Methanol	Carl-Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
MOPS SDS Running Buffer (20x)	Novex, Carlsbad, USA
M-MLV Reverse Transcriptase	Invitrogen, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl-Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe

Natriumdihydrogenphosphat	Carl-Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Carl-Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
NuPAGE Antioxidant	Novex, Carlsbad, USA
NuPAGE Transfer Buffer (20x)	Novex, Carlsbad, USA
Oligonukleotide (Oligo dt)	Roche, Rotkreuz, Schweiz
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Physiologische Kochsalzlösung	Carl-Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
Primer	Invitrogen, Darmstadt
RNAasin® Plus RNase Inhibitor	Promega, Dübendorf
RT-Puffer (5x)	Invitrogen, Darmstadt
Salzsäure	Carl-Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific, Schwerte
Tris-Buffered Saline (20x) TBS	AppliChem, Darmstadt
Tris	Carl-Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
TRIzol	Invitrogen, Darmstadt
Tween® 20	AppliChem, Darmstadt

2.2 Lösungen und Puffer

Langendorff-Perfusionslösung:

NaCl	140,0 mM
KCL	2,7 mM
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,4 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1,0 mM

Glucose	5,0 mM
CaCl ₂ x 2H ₂ O	1,8 mM
NaHCO ₃	24,0 mM

Reaktionsmix für cDNA Synthese je Probe:

RT-Puffer (5x)	6,0 µl
Oligo dt	3,0 µl
dNTP	3,0 µl
DTT	1,5 µl
RNAsin	0,6 µl
M-MLV-RT	0,9 µl

PCR Mix pro Probe:

SYBR Green® Supermix	10,0 µl
Primer	0,6 µl
Aqua bidest.	6,4 µl

Antikörper Lösung:

Bovines Serumalbumin	5 %
TBS	1 %
Tween 20	0,1 %
Antikörper	(x)
Antikörper	Abcam, Cambridge, UK
	Calbiochem / Merck, Darmstadt
	Novus Biologicals, Wiesbaden
	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
	Santa Cruz, Heidelberg

Zell-Lyse-Puffer (1x) – Cell Signaling Technology® #9803:

Tris-HCl (pH7,5)	20,0 mM
NaCl	150,0 mM
Na ₂ EDTA	1,0 mM
EGTA	1,0 mM
Triton	1 %
Sodium pyrophosphate	2,5 mM
β-Glycerolphosphate	1,0 mM
Na ₃ VO ₄	1,0 mM
Leupeptin	1,0 µg/ml

Transferpuffer:

Aqua bidest.	375 ml
NuPAGE Transfer Buffer (20x)	25 ml
Methanol	100 ml
NuPAGE Antioxidant	500 µl

Tris-buffered-line:

Tris/HCl	10 mmol/l
NaCl	150 mmol/l
pH 7,4	

2.3 Geräte und Laborbedarf

2.3.1 Langendorff-System

Schlauchpumpe	Ismatec Reglo Dig NS-4/8V1.13
Umwälzpumpe	MGW Lauda Typ DP8/17
Relaisbox	Univ. Relaisbox R2 Elec.
	MGW Lauda

Druckaufnehmer

Combitrans 1-fach Set Mod. II

J.-L.-Universität Gießen Braun

Thermokammer

Eigenbau des

Physiologischen Institutes

der J.-L.-Universität Gießen

2.3.2 Geräte

Allegra 21 Zentrifuge

Beckman Coulter, Krefeld

Allegra 25R Zentrifuge

Beckman Coulter, Krefeld

Chemilumineszenz Gerät

Peqlab Biotechnologie, Erlangen

Cyclogene Thermal Cycler

Techne, Wertheim-Bestenheim

Dri-Block DB-2D

Techne, Wertheim-Bestenheim

Gefrierschrank (-80°C)

Thermo Scientific, Schwerte

Gefrierschrank (-80°C)

Sanyo, München

Gefrierschrank (-20°C)

Liebherr Comfort,
Ochsenhausen

Gefrierschrank (-20°C)

Bosch, Gerlingen

iCycler

Bio-Rad Laboratories, München

Kühlschrank (4°C)

Liebherr Comfort,
Ochsenhausen

Kühlraum

Eigenbau des
Physiologischen Institutes
der J.-L.-Universität Gießen

Laborwaage Acculab

Sartorius, Göttingen

Microfuge® 18

Beckman Coulter

Minishaker MS1

Ika, Staufen

Minishaker MS2

Ika, Staufen

Precellys 24 lysis & homogenization

Peqlab Biotechnologie, Erlangen

Rocking Platform RT 26	Biometra, Göttingen
Spektrophotometer	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
NanoDrop® ND-1000	
Ultraschall Prozessor UP100H	Hielscher, Teltow
UV Stratalinker 2400	Stratagene, Amsterdam, Niederlande

2.3.3 Laborbedarf

Altromin® Tierfutter	Altromin, Lage
Bechergläser	Ilmabor, Ilmenau
Cellstar Tube 50ml	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Eisbehälter	Welabo, Düsseldorf
Entwicklerschalen	Labcor, Gaithersburg, USA
Eppendorf-Röhrchen	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Filterpapiere	Biotec. Fischer, Reiskirchen
Hamilton Microliterspritze Nr. 710	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Kanüle	Braun, Melsungen
Krokodilklemme	Eickemeyer, Tuttlingen
Leinen OP Zwirn Et. Nr. 40	Gruschwitz, Neu-Ulm
Messzylinder	Duran, Wertheim
Nitrilhandschuhe Micro Touch	Ansell, Brüssel, Belgien
NuPAGE 10% Bis-Tris-Gel 10well	Novex, Carlsbad, USA
Papiertücher	Brod, Hanau
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
PCR Deckelkette flach 8er	Sarstedt, Nümbrecht
PCR Tubes - Multiply® 8er-Kette	Sarstedt, Nümbrecht

Pipetten Reference 10/100/1000µl	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Pipettenspitzen 10/200/1000µl	Sarstedt, Nümbrecht
Plastikeinmalschälchen	Carl-Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
Precell Röhrchen	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Präparationsbesteck	Aesculap, Hamburg
Präparationsbesteck	Eickenmeyer, Tuttlingen
Reaktionsgefäße 0,5/1,5/2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Skalpell Feather® Nr. 21	Osaka, Japan
Spritze 5ml	Braun, Melsungen
Western Blot Glasplatte	Biometra, Göttingen
Western Blot Handrolle	Novex, Carlsbad, USA
Western Blot Schwamm	Novex, Carlsbad, USA
Whatman Protan Nitrocellulose Membran	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
XCell2 Blot Module	Novex, Carlsbad, USA
XCell SureLock Electrophoresis Cells	Novex, Carlsbad, USA
Zellkulturschale	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Zellstoff	Hartmann, Heidenheim

2.4 EDV

Bio-Rad iQ5 Version 2.0	Bio-Rad Laboratories, München
ChemiCapt 5000	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Excel	Microsoft, Redmond, USA
Mendeley	Elsevier, Amsterdam, Niederlande

NanoDrop ND-1000 Version 3.5.1

Phylab

QuantityOne

SPSS 20

Word

LabVIEW® USA

Eigenprogrammierung des
Physiologischen Institutes der J.-L.-
Universität Gießen mittels LabVIEW
von Nat. Instruments

Bio-Rad Laboratories, München

IBM, Ehningen

Microsoft, Redmond, USA

3 Methoden

3.1 Versuchsherzen

Für die Präparation der Versuchsherzen dienten drei bis vier Monate alte Wistar-Ratten (Janvier Labs, Frankreich) und transgene JDP2-Mäuse, beziehungsweise deren nicht-transgene Wurfgeschwister aus der hauseigenen Züchtung des Tierstalls des Physiologischen Instituts. JDP2-Mäuse sind doppelt-transgene Mäuse, die sowohl das JDP2-Gen als auch einen Transaktivator unter Kontrolle des α -MHC Promoters tragen. Der Transaktivator wird durch Gabe des Antibiotikums Doxycyclin (Dox) konstitutiv gehemmt (Tet-Off-System). Das Absetzen des Antibiotikums wiederum aktiviert den Transaktivator und induziert die JDP2-Expression. Die hier verwendeten Mausherzproben entstammen einer älteren Versuchsserie mit konstitutiv induzierter JDP2-Expression (Hill et al., 2013).

Jederzeit hatten die Tiere freien Zugang zu Nahrung (Standardfutter: Altromin®) sowie zu Trinkwasser. Die Haltung der Tiere erfolgte nach den internationalen Richtlinien für Versuchstierhaltung (EU-Direktive 2010/63/EU) im zentralen Tierstall der JLU.

3.2 Versuche am isoliert perfundierten Herzen

3.2.1 Modell nach Langendorff – Prinzip

Das 1895 von Oscar Langendorff entwickelte Modell ermöglicht die Perfusion eines Versuchsherzens ohne Körper- und Lungenkreislauf (Döring, 1990). Das isolierte Herz wird in einer Apparatur an der Aorta fixiert und mit einer Langendorff-Lösung perfundiert. Es erhält alle notwendigen Substanzen, damit es über mehrere Stunden weiterschlagen kann. Charakteristisch für das Langendorff-Modell ist, dass die Nährlösung retrograd über die Aorta bis an die geschlossene Aortenklappe fließt und ab dort die Coronararterien orthograd perfundiert. Es folgt der physiologische Fluss bis in den Sinus Coronarius und das rechte Herz. Über die Pulmonalarterie gelangt die Perfusionslösung aus dem Herzen. Mit Hilfe dieses Modells lassen sich neben den physiologischen Untersuchungen auch Pathophysiologien nachstellen, in diesem Fall Ischämien unterschiedlicher Dauer.

3.2.2 Versuchsaufbau

Die Versuche wurden unter konstanten Bedingungen durchgeführt. Das Herz wurde in einer Thermokammer mit 37°C an einer Perfusionskanüle fixiert. Die gleichbleibende Temperatur des Raums wurde erreicht, indem dieser von warmem Wasser in einer zweiten Kammer umspült und aufgeheizt wurde. Durch Sensoren wurden die Temperatur in beiden Räumen gemessen und jeweils entsprechend reguliert. In einem Reservoir auf einer Wärmeplatte befand sich das Perfusat. Dieses war mit Carbogen, bestehend aus 95 % Sauerstoff und 5 % Kohlendioxid, angereichert und hatte einen pH-Wert von 7,4. An einer Rollenpumpe wurde die Flussrate eingestellt, mit der die Flüssigkeit aus dem Reservoir durch einen Wärmetauscher floss. Dieser sorgte für die konstante Temperatur von 37°C. Nach der Erwärmung passierte die Flüssigkeit einen Schlauch, der mit einem Druckaufnehmer zur Messung des Aortendrucks - gleichbedeutend mit dem Perfusionsdruck - verbunden war. Am Ende des Schlauchs befand sich die Perfusionskanüle, an der das Versuchsherz angebracht war.

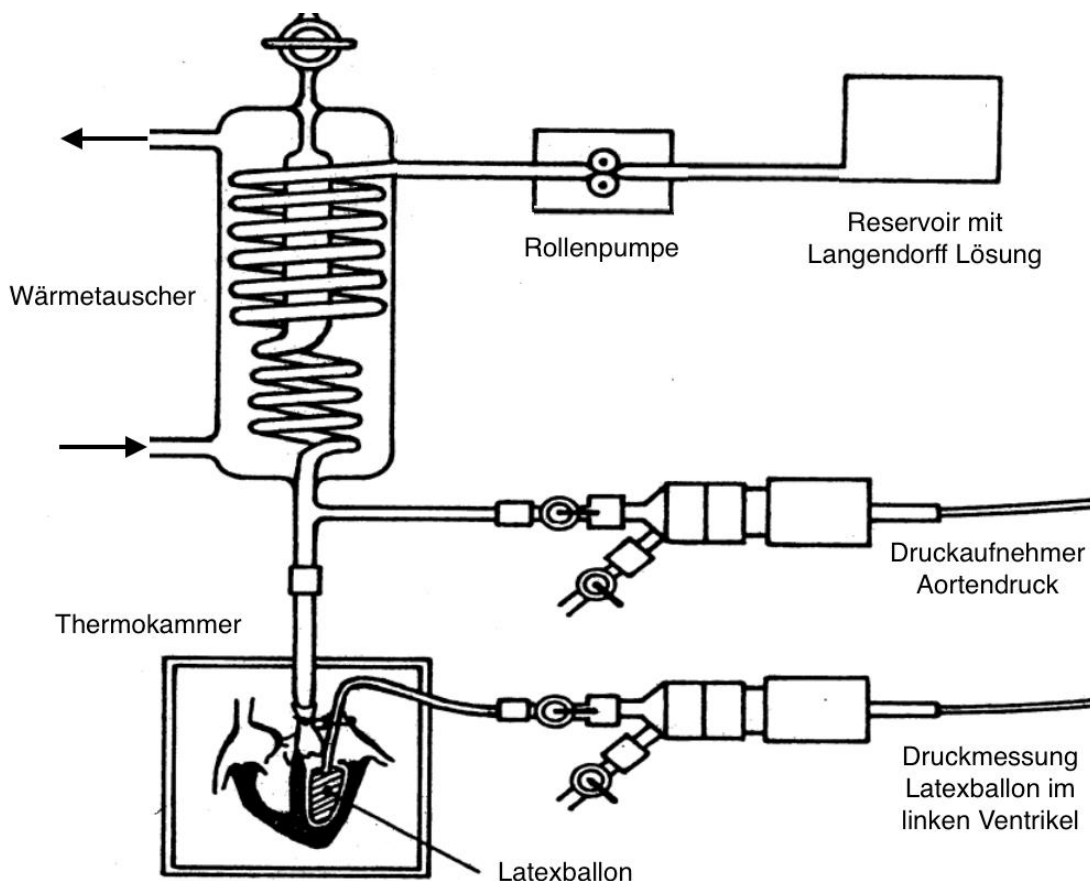


Abbildung 3.2.2-1: Langendorff-Modell, modifiziert aus Döring, 1990

3.2.3 Versuchsvorbereitung

Vor jedem Versuch wurden die benötigten Lösungen und Substanzen hergestellt und die Apparatur luftblasenfrei mit Aqua bidest. durchspült. Es folgte die Kalibrierung der Druckaufnehmer auf den Umgebungsdruck als Normalnull. Das Versuchsherz konnte dann an die Anlage angeschlossen werden.

3.2.4 Präparation der Nagetierherzen

Für die Versuche wurden die Tiere aus der hauseigenen Züchtung des Tierstalls des Physiologischen Instituts verwendet. Die Tiere wurden mit Isofluran 4-5 % betäubt und anschließend mittels Genickbruch getötet. Es folgte die zügige Entnahme von Herz und Lunge aus dem Thorax. Bei der Resektion war es von Bedeutung, eine ausreichende Länge der Aorta ascendens zu erhalten, um sie anschließend über die Perfusionskanüle aufziehen zu können. Um in einem weiteren Arbeitsschritt das Herz von Lunge und Bindegewebe frei zu präparieren, wurde das Explantat in eine Petrischale mit 4°C kalter physiologischer Kochsalzlösung platziert. Dies reduzierte den Sauerstoffverbrauch während der kurzen Ischämiephase. Nach der Isolierung des Herzens wurde es der vorbereiteten Langendorff-Apparatur hinzugefügt. Von der Betäubung bis zum Hinzufügen des Versuchsherzens in das Modell vergingen nur wenige Minuten.

3.2.5 Versuchsdurchführung

Das isolierte Herz wurde mit einer Krokodilklemme an der Perfusionskanüle fixiert und anfangs mit einer Flussrate von 2-3 ml/min mit der Langendorff-Lösung perfundiert. Währenddessen wurde der linke Ventrikel mit einem Schnitt durch ein Skalpell eröffnet und ein Latexballon eingebracht. Dieser wurde mit einem Druckaufnehmer verbunden. Das Herz konnte nun endgültig über die Aorta mit einem chirurgischen Faden an der Kanüle fixiert und die Krokodilklemme entfernt werden. Bei konstantem Strömungswiderstand wurde durch den Perfusionsfluss ein bestimmter Perfusionsdruck erzeugt. Die Flussrate konnte erhöht werden bis sich ein Perfusionsdruck von 50mmHg einstellte. Nach Erreichen dieses Wertes wurde der Fluss konstant gehalten und durfte nicht mehr verändert werden. Durch das Befüllen des Latexballons mit Aqua bidest. wurde der physiologische diastolische Druck von 10-12mmHg eingestellt. Es folgte eine insgesamt 10-minütige Stabilisierungsphase, ehe die Ischämien von unterschiedlicher Dauer durch Pausieren des Perfusionsflusses gemäß Versuchsprotokoll eingestellt wurden. In jeder Versuchsreihe schloss sich an die Ischämie eine Reperfusionphase

an, in welcher kontinuierlich die Herzparameter aufgezeichnet wurden. Mit Hilfe eines verbundenen Computers und des Programms „Phylab“ wurden die Messwerte aufgezeichnet:

- | | |
|---------------------|--|
| 1. HR [Schläge/min] | Herzrate |
| 2. P sys [mmHg] | Linksventrikulärer systolischer Druck |
| 3. P dias [mmHg] | Linksventrikulärer diastolischer Druck |
| 4. PP [mmHg] | Perfusionsdruck |

Aus diesen Parametern wurden weitere berechnet:

- | | |
|-----------------------------|---|
| 5. LVDP [mmHg] | Linksventrikulär entwickelter Druck
(P sys. – P dias.) |
| 6. RPP [Schläge/min x mmHg] | Kardiovaskuläres Produkt (HR x LVDP) |

3.2.6 Versuchsprotokoll

Jede Versuchsreihe in der Langendorff-Apparatur begann mit einer Stabilisierungsphase von fünf bzw. zehn Minuten. Anschließend folgte die Ischämiephase von unterschiedlicher Dauer. Einige Herzen erhielten im Anschluss an diese Phase eine Postkonditionierung von 3 x 30 Sekunden, mit je 30 Sekunden Perfusion dazwischen. Die letzte Phase bestand aus einer Reperfusion von 30 bzw. 180 Minuten. Nach jedem Versuch wurden die rechten und linken Herzhälften voneinander getrennt und die Herzvorhöfe entfernt. Anschließend wurden die Proben bei -80°C tiefgefroren.

Ratten	Stab.	Ischämie	Postk.	Reperfusion	
Kontrolle	10'			180'	n=8
Ischämie 15'	10'	15'		180'	n=8
Ischämie 15' / Postk.	10'	15'	3x30"	180'	n=8
Ischämie 60'	10'	60'		180'	n=8
Ischämie 60' / Postk.	10'	60'	3x30"	180'	n=7
Mäuse	Stab.	Ischämie		Reperfusion	
Wildtyp Kontrolle	5'			30'	n=10
Wildtyp Ischämie	5'	45'		30'	n=9
Transgen Kontrolle	5'			30'	n=6
Transgen Ischämie	5'	45'		30'	n=6

Abbildung 3.2.6-1: Übersicht der Versuchsgruppen

3.3 Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion

3.3.1 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion

In der Molekularbiologie wird zur Amplifikation einer bestimmten DNA-Sequenz die Polymerase-Kettenreaktion genutzt. Kary Mullis entwickelte diese Methode, bei der Fragmente der Nukleinsäuren *in vitro* vervielfältigt werden können (Mullis et al., 1986). Um eine Verdoppelung des DNA-Gehaltes zu erreichen, ist demnach ein Reaktionszyklus aus drei aufeinanderfolgenden Schritten notwendig. Der Amplifikationszyklus wiederholt sich mehrmals und führt so zu einer exponentiellen Vermehrung des DNA-Gehaltes.

Der erste Schritt eines Reaktionszyklus ist die Denaturierung, die bei 95°C stattfindet. Die DNA-Doppelhelix wird durch Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen in zwei Einzelstränge getrennt. Im zweiten Schritt, der Hybridisierung, heftet sich der

Oligonucleotid-Primer an das 3'-Ende der Einzelstränge an. Die Primer bestehen dabei aus etwa 15-25 Basenpaaren und binden an spezifische DNA-Abschnitte. Damit die Oligonucleotide optimal an die komplementären DNA-Einzelstränge anlagern können, ist auf eine Primer spezifische Temperatur zu achten. Der letzte Schritt ist die Elongation. Eine DNA-Polymerase komplementiert mit freien Nucleotiden die Einzelstränge zu Doppelsträngen von 5'-3'-Richtung. Damit die DNA-Polymerase effektiv arbeiten kann, findet dieser Schritt bei 72°C statt. Bei dem ersten Durchgang der PCR entstehen längere DNA-Doppelstränge als bei den Folgenden, da die Synthese durch die DNA-Polymerase bis zum Ende des Matrizenstranges erfolgt oder durch eine erneute Erhöhung der Temperatur für die nächste Denaturierungsphase beendet wird. Die nun doppelt vorliegende Doppelstrang-DNA wird wieder auf 95°C erhitzt, sodass es zu einer erneuten Aufspaltung und dem Anheften der Primer kommt. Während der Ursprungsstrang nochmals bis zum Ende des Matrizenstranges synthetisiert wird, endet bei der im ersten Zyklus entstandenen DNA die Elongation am Beginn des ursprünglichen Primers. In jedem Zyklus wird die DNA verdoppelt, sodass nach n Zyklen theoretisch 2^n Kopien vorliegen. Aus der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) entwickelte sich die real-time PCR (RT-PCR), welche in Thermocyclern durchgeführt wird. Bei dieser Methode wird die DNA-Amplifikation in Echtzeit beobachtet und eine Genexpression kann untersucht werden. In den sich 20-40-fach wiederholenden Zyklen findet jeweils eine Denaturierung bei 95°C statt. Da die DNA-Polymerase besonders hitzebeständig sein muss, stammt das verwendete Enzym aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* und wird *Taq-Polymerase* genannt.

Die Menge der entstandenen DNA-Produkte lässt sich in Form von Fluoreszenzsignalen messen. Dabei nimmt die Lichtemission proportional zu der entstandenen DNA-Menge zu. Grundlegend für die Analyse ist der interkalierende Farbstoff SYBR Green®. Dieser grünliche Farbstoff hat eine hohe Affinität zu doppelsträngiger DNA und erlaubt so eine quantitative Messung der DNA nach jedem Zyklus.

In dieser Arbeit wurde der iQ™ SYBR® Green Supermix verwendet, welcher sowohl den genannten Farbstoff als auch die Taq-Polymerase enthält. Die rt-PCR findet in drei aufeinanderfolgenden Phasen statt. In der ersten Phase (Initiationsphase) läuft die Amplifikation nur schleppend an, da die Reaktionsprodukte noch nicht optimal zueinander finden. Hierbei wird lediglich die Hintergrund-Fluoreszenz erfasst. Es folgt die entscheidende, exponentielle Phase, bei der die DNA-Vervielfältigung optimal abläuft. Der Ct-Wert für „*cycle threshold*“ ist der Schwellenwert, der den Zyklus angibt, bei dem die Fluoreszenz zum ersten Mal signifikant erhöht gegenüber dem Hintergrundsignal bestimmt werden kann. In der letzten sogenannten Plateauphase sind

die Reagenzien, wie Primer oder Nukleotide, zum größten Teil verbraucht und die Vervielfältigung verläuft nur noch suboptimal.

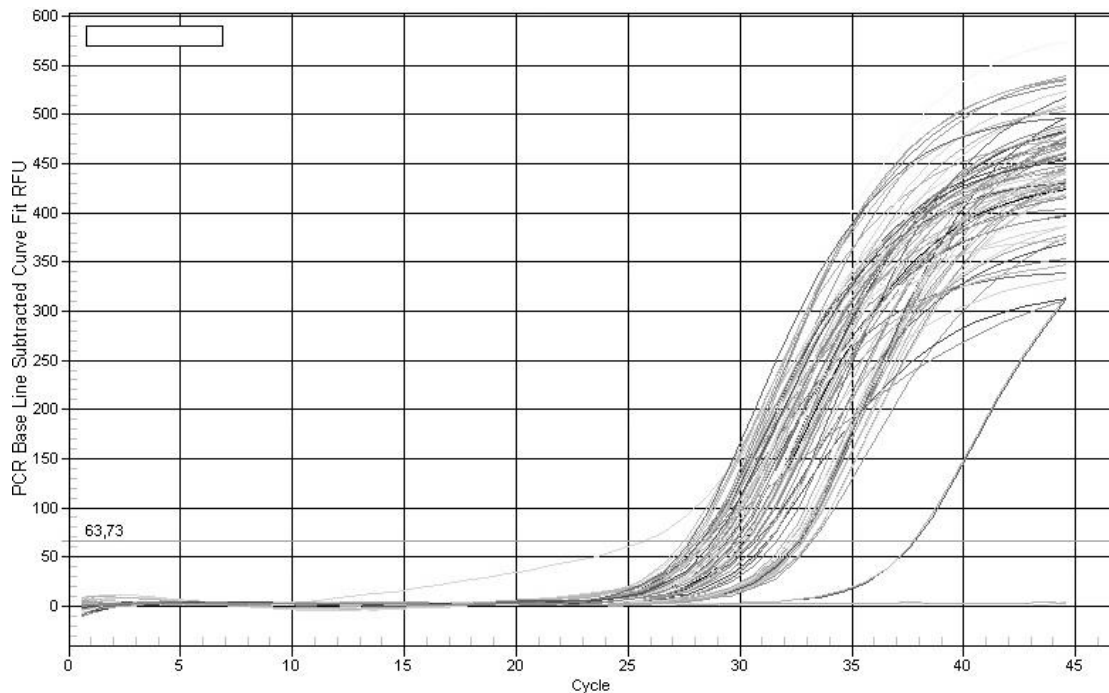


Abbildung 3.3.1-1: Beispiel eines real-time PCR-Verlaufs mit dem ct-Wert

Das in dieser Arbeit verwendete SYBR Green® bindet unspezifisch an die Doppelhelix und erlaubt daher keine Rückschlüsse darauf, welcher Teil der DNA vervielfältigt wurde.

Ein weiteres Risiko zur Verfälschung der Ergebnisse besteht in der Tatsache, dass der Farbstoff an Primer binden kann. Aus diesem Grund muss im Anschluss an die DNA-Amplifikation eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden. Dabei trennt sich durch eine stetige Erhöhung der Temperatur die Doppelhelix auf und SYBR Green® wird freigesetzt. Dies führt zu einer Abnahme des Fluoreszenzsignals, welche erfasst werden soll. Während unspezifische DNA-Abschnitte eine niedrigere Schmelztemperatur haben, ist diese in dem spezifischen, amplifizierten Bereich höher und somit eine Differenzierung möglich. Die Schmelztemperatur wird bestimmt durch die spezifischen Eigenschaften des DNA-Abschnitts, d.h. der Länge und der Zusammensetzung der Basenpaare.

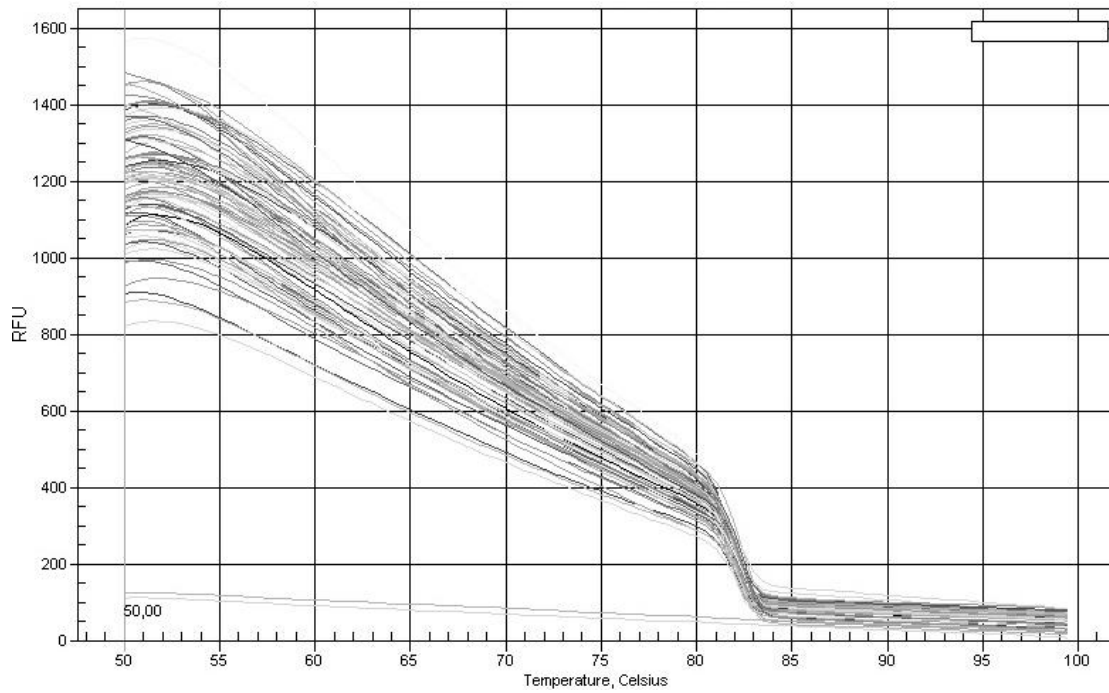


Abbildung 3.3.1-2: Beispiel für den Abfall des Fluoreszenzsignals bei steigender Temperatur

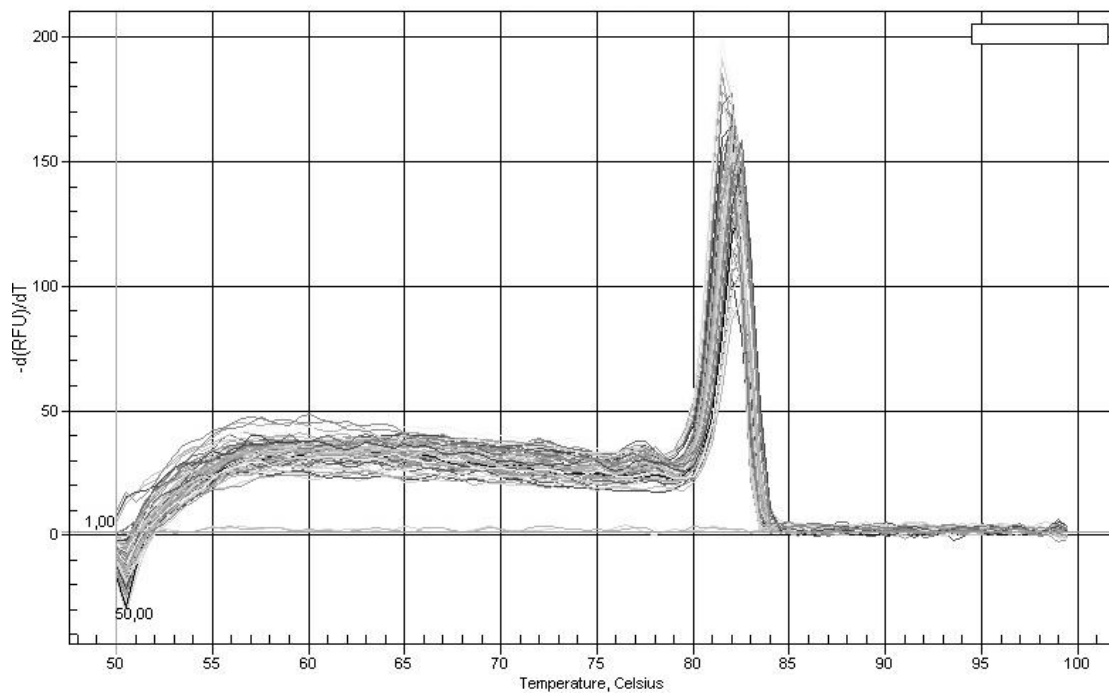


Abbildung 3.3.2-3: Beispiel einer Schmelzkurve

3.3.2 RNA-Isolierung aus Herzmuskelgewebe

Um die Genexpressionen der Kardiomyozyten zu analysieren, musste aus den Zellen zuerst die RNA isoliert werden. Für die RNA-Extraktion wurden die bei -80°C gefrorenen

Proben auf Eis zwischengelagert, um Enzymaktivitäten zu inhibieren. Die linken Ventrikel wurden einzeln und nacheinander in kleinen Plastikschaalen mit einem Skalpell halbiert. Die eine Hälfte wurde erneut tiefgefroren und die andere in ein Precell-Röhrchen mit Keramikkügelchen gegeben. Anschließend wurde der Hälfte in dem Plastikröhrchen 1ml Trizol hinzugefügt, um die Zellen zu lysieren. Bei 5000 rpm wurden die Röhrchen für 20 Sekunden im Homogenisator Precellys® 24 homogenisiert und danach 200 µl Chloroform hinzupipettiert. Dieses Gemisch wurde für 10 Sekunden gevortext, bis es eine milchige Farbe annahm. Mit Hilfe der Zentrifuge wurde das Homogenat in 15 Minuten bei 4°C und 12.500 rpm aufgetrennt. In der obersten der drei Schichten befand sich nun die RNA.

Aus den Eppendorf-Gefäßen, welche zunächst fünf Minuten unter UV-Licht im UV-Stratalinker® bestrahlt wurden, erfolgte dann das Abpipettieren von 500 µl der obersten Schicht und die Hinzugabe von Isopropanol in gleicher Menge. Dieses 1ml-Gemisch wurde kurz gevortext und über Nacht bei -20°C eingefroren. Der nächste Schritt bestand aus der 15-minütigen Zentrifugation bei 4°C und 12.500 rpm. Anschließend zeigte sich am Grund der Eppendorf-Gefäße ein weißes Pellet, welches die RNA enthielt. Die obere Flüssigkeit wurde verworfen und mit 1ml Ethanol 70 % ersetzt. Das Pellet wurde durch leichtes Vortexen vom Grund gelöst und erneut bei bereits oben genannter Einstellung zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und der Inhalt der Eppendorfgefäße mit der enthaltenen RNA für eine Stunde getrocknet. Im nächsten Schritt wurde 50 µl Aqua bidest. hinzugefügt, gevortext und die Eppendorfgefäße eine weitere Stunde bei 4°C gelagert.

3.3.3 Bestimmung der RNA-Konzentration mittels NanoDrop®

Um bei der Herstellung von cDNA auf gleiche RNA-Konzentrationen zurückgreifen zu können, mussten zunächst eben diese gemessen werden. Mit Hilfe des Spektrophotometers NanoDrop ND-1000® wurden die Konzentrationen der RNA in ng/µl bestimmt. Dabei wurde das Gerät mit einer Aqua bidest.-Messung kalibriert, um Messfehler zu minimieren.

Der Sensor des Geräts wurde nach jeder Messung mit einem Tuch gereinigt. Für eine Messung wurde 1,5 µl einer Probe luftblasenfrei auf den Sensor pipettiert und die Konzentration mit Hilfe des Computerprogramms „NanoDrop ND-1000, Version 3.5.1“ gemessen. Anschließend wurde jede Probe schrittweise mit Aqua bidest. auf 800-1000 ng/µl verdünnt. Nun folgte die Entnahme und Umfüllung von 3 µg RNA aus jeder Probe in neue Eppendorfgefäße, die jeweils mit Aqua bidest. ergänzt wurden, bis alle Proben

15 µl besaßen. Dies entsprach dem dreifachen Ansatz, zudem hatten nach diesem Schritt alle Proben die gleiche RNA Konzentration.

3.3.4 Synthese von cDNA aus RNA

Für die Amplifizierung von spezifischen Gensequenzen mittels der Polymerase-Kettenreaktion musste die hergestellte RNA in komplementäre DNA (cDNA) transkribiert werden. Die mRNA lag dabei als Template vor. Während die Proben 15 Minuten bei 60°C im Thermocycler® denaturierten, wurde ein Reaktionsmix angesetzt. Der dreifache Ansatz setzte sich wie folgt zusammen und musste mit der Anzahl der Proben multipliziert werden:

Reaktionsmix je Probe:

RT-Puffer	6,0 µl
Oligo dt	3,0 µl
dNTP	3,0 µl
DTT	1,5 µl
RNAsin	0,6 µl
M-MLV-RT	0,9 µl

Jeder 15 µl RNA-Probe wurde ein 15 µl Reaktionsmix hinzugefügt, sodass ein 1:1 Verhältnis vorlag. Dieses Gemisch wurde erneut in den Thermocycler® gegeben, um anschließend die Reverse Transkription für 60 Minuten bei 37°C zu starten.

Zunächst entstand dabei eine RNA-DNA-Verbindung, ehe der RNA-Strang durch einen zweiten, komplementären DNA-Strang ersetzt wurde. Zur Stabilisierung der synthetisierten Doppelhelix erfolgte eine fünfminütige Erhitzung auf 95°C. Für die gleiche Dauer wurden in einem letzten Schritt im Thermocycler® die Proben auf 5°C heruntergekühlt. Zu der entstandenen cDNA wurden 270 µl Aqua bidest. hinzupipettiert, sodass 300 µl cDNA in einer Verdünnung von 1:10 vorlagen. Die cDNA ließ sich nun bei -20°C in einem Kühlschrank lagern.

3.3.5 Vorbereitung der Primer

Um die rt-PCR durchführen zu können, mussten die Primer vorbereitet werden. Da die cDNA in einer Verdünnung von 1:10 vorlag, musste dieses Verhältnis auch bei dem Ansetzen der Primer berücksichtigt werden. Der Primer setzte sich aus einem Forward- und einem Reverse-Anteil zusammen, die den zu amplifizierenden Bereich flankierten. Von jedem Anteil wurden 15 µl, sowie 270 µl Aqua bidest. in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert.

Verwendete Primer:

HPRT:	CCA GCG TCG TGA TTA GTG AT	Forward Primer
	CAA GTC TTT CAG TCC TGT CC	Reverse Primer
B2M:	GCC GTC GTG CTT GCC ATTC	Forward Primer
	CTG AGG TGG GTG GAA CTG AGA C	Reverse Primer
Mef2c:	CAG TTG GGA GAC CGT ACC AC	Forward Primer
	GTG AGT CCA ATG GGG GAG TG	Reverse Primer
Gata4:	CTA TGG CCG CCA ACC ACG GG	Forward Primer
	CGC GGA GTG GGC ACG TAG AC	Reverse Primer
BNP:	ATG ATT CTG CTC CTG CTT TTC C	Forward Primer
	TCT GCA TCG TGG ATT GTT CTG	Reverse Primer
Serca:	CGA GTT GAA CCT TCC CAC AA	Forward Primer
	AGG AGA TGA GGT AGC GGA TGA A	Reverse Primer
Arginase 1:	GGA AGC ATC TCT GGC CAC GCC	Forward Primer
	CAC CGG TTG CCC GTG CAG AT	Reverse Primer

3.3.6 Polymerase-Kettenreaktion im iCycler®

Die rt-PCR, wie unter 3.3.1 beschrieben, wurde im iCycler® der Firma Bio-Rad durchgeführt. Dafür wurden 3 µl jeder cDNA-Probe zusammen in ein Tube mit 17 µl des PCR Mix gegeben. Jeder Durchgang wurde in Doppelbestimmung durchgeführt und enthielt zudem zwei Tubes ohne cDNA als Negativkontrolle. Der einfache Ansatz für einen PCR-Mix setzte sich wie folgt zusammen und musste mit der Anzahl der Proben multipliziert werden:

PCR Mix pro Probe:

SYBR Green®	10,0 µl
Primer	0,6 µl
Aqua bidest.	6,4 µl

Die Tubes wurden verschlossen in dem iCycler® platziert und die PCR mit Hilfe des Computerprogramms „Bio-Rad iQ5“ gestartet. Dabei wurde auf die vorgegebenen Laufprotokolle zurückgegriffen. Diese unterschieden sich lediglich in der Temperatur in der Hybridisierungs-Phase und waren dabei spezifisch auf die verwendeten Primer zugeschnitten.

Laufprotokoll der RT-PCR:

Phase 1:	1x	180 Sekunden	95°C	Initiale Denaturierung
Phase 2:	45x	30 Sekunden	95°C	Denaturierung
		30 Sekunden	x°C	Hybridisierung
		30 Sekunden	72°C	Amplifikation
Phase 3:	100x	10 Sekunden	50°C – 100°C	Schmelzkurve

Spezifische Temperaturen der Primer für das Annealing:

HPRT:	63°C
B2M:	65°C
Mef2C:	62°C
Gata 4:	66°C
BNP:	58°C

Serca:	57°C
Arginase 1:	68°C

In der dritten Phase erhöhte sich die Temperatur sukzessive von 50°C auf 100°C zur Erstellung einer Schmelzkurve. Dabei stieg die Temperatur alle zehn Sekunden um 0,5°C an.

3.3.7 Auswertung der real-time PCR

Für die Auswertung wurde auf die relative Quantifizierung zurückgegriffen. Dabei wurde die Expression der untersuchten Gene auf ein Housekeeping Gen (HKG) bezogen. Als HKG wird in dieser Arbeit B2M gewählt. Dieses gilt als Referenzstandard, da die Expression trotz unterschiedlicher Einflüsse konstant bleibt. Der Expressionsunterschied (Ratio) wird über die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode berechnet (Livak & Schmittgen, 2001). Zuerst subtrahiert man den Ct-Wert des Referenzgens von dem Ct-Wert des Zielgens.

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct Zielgen} - \text{Ct HKG}$$

Anschließend wird von diesem behandelten ΔCt -Wert der Mittelwert der Kontrollgruppe subtrahiert.

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct Behandlung} - \Delta\text{Ct Kontrolle}$$

Der relative Expressionsunterschied errechnet sich aus der Formel:

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

3.4 Proteinnachweis durch die Gelelektrophorese

Für den Nachweis von Proteinen bedient man sich gelelektrophoretischer Methoden. Nachdem die Proteine durch Zelllyse gewonnen werden, werden in einem nächsten Arbeitsschritt die Proteine in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) nach Molekülmasse aufgetrennt. Anschließend werden die separierten Proteine mittels Western Blot von dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. In dem letzten Schritt werden anhand eines immunologischen Nachweises die Ergebnisse abgebildet und ausgewertet.

3.4.1 Proteinisolierung aus den Kardiomyozyten

Um Proteine zu isolieren, mussten die Zellen aufgelöst werden. Für 0,1 g Gewebe wurden 500 µl Zell-Lyse-Puffer benötigt und zusammen in ein Precell-Röhrchen gegeben.

Zell-Lyse-Puffer (1x) – Cell Signaling Technology® #9803:

Tris-HCl 8pH7,5)	20,0 mM
NaCl	150,0 mM
Na ₂ EDTA	1,0 mM
EGTA	1,0 mM
Triton	1,0 %
Sodium pyrophosphate	2,5 mM
β-Glycerolphosphate	1,0 mM
Na ₃ VO ₄	1,0 mM
Leupeptin	1,0 µg/ml
PMSF	1,0 mM (frisch hinzufügen)

Die Röhrchen wurden je zweimal 20 Sekunden bei 6000 rpm zentrifugiert und anschließend zehn Minuten auf Eis gelagert. Mit dem Ultraschallprozessor wurden die Proben bei einer Einstellung von 0,7 „Cycle“ und 60 % Amplitude für je 30 Sekunden beschallt. Im nächsten Schritt wurden die Proben bei 14000xg bei 4°C für zehn Minuten zentrifugiert. Von dem Überstand wurden 10µl in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert und mit 490µl Aqua bidest. ergänzt, sodass ein 1:50-Verhältnis entstand. Von diesem Gemisch wurden 100µl in neue Reaktionsgefäße pipettiert und 50µl Laemmli-Puffer (2x)

hinzugegeben. Für fünf Minuten wurden die Proben bei 95°C im Dri-Block DB-2D erhitzt und anschließend bei -20°C gelagert.

3.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Methode wurde 1970 von Ulrich Laemmli entwickelt und dient der Auftrennung von Proteinen (LAEMMLI, 1970). Vor der Gelelektrophorese müssen die Proben mit Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) und Mercaptopropandiol vorbehandelt werden. SDS sorgt für eine stark negative Ladung und überdeckt so die Eigenladung der Proteine. Durch das Reduktionsmittel Mercaptopropandiol werden Disulfidbrücken aufgetrennt und die Proteine denaturiert. In dieser Arbeit befinden sich diese beiden Substanzen bereits in dem Laemmli-Puffer. Das Prinzip der Gelelektrophorese ist, dass denaturierte Proteine auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen werden und dieses unter elektrische Spannung gesetzt wird. Aufgrund von chemischen Eigenschaften, wie der Molekülmasse und der Ladung, beginnen die Proteine auf dem Gel zu wandern. Sie bewegen sich dabei von der negativ geladenen Kathode zur positiv geladenen Anode. Da aufgrund der Vorbehandlung die Eigenladung der Proteine überdeckt wird und nicht mehr ins Gewicht fällt, trennen sich die Moleküle aufgrund ihrer Masse auf. Die Gelmatrix wirkt dabei wie ein Sieb und kleine Moleküle wandern schneller und somit in der gleichen Zeit weiter als größere. Um bei der Auswertung die einzelnen Proteine identifizieren zu können, wird ergänzend ein Referenzprotein mit bekannter Molekülmasse aufgetragen.

3.4.3 Aufbau und Durchführung der SDS-PAGE

Bei der gesamten Durchführung wurden Nitrilhandschuhe getragen, da Acrylamid toxisch ist. Zu Beginn wurden die benötigten Laufpuffer hergestellt.

Laufpuffer 1: 50 ml MOPS SDS Running Buffer (20x) mit
950 ml sterilem Wasser

Laufpuffer 2: 200 ml Running Buffer (1x) mit
500 µl NuPAGE Antioxidant

In dieser Arbeit wurde für die Gelelektrophorese das NuPAGE System von Novex® verwendet. In einer Gelkammer wurde ein Klammerrahmen platziert, in welchen später die Fertiggele vertikal eingesetzt werden konnten. Dabei musste die Beschriftung nach außen und die Ohrenplatten nach innen zeigen.

Bei den Fertiggelelen handelte es sich um NuPAGE 10 % Bis-Tris Protein Gele. Für einen Durchlauf konnten bis zu zwei Gele à 10 „wells“ benutzt werden. Diese wurden vorsichtig ausgepackt und mit sterilem Wasser abgespült. Sowohl die Geltaschen als auch die untere Gelöffnung wurden mit Laufpuffer 1 gespült. Anschließend konnten die Fertiggele in den Klammerrahmen gestellt und der Klemmkeil gespannt werden. Zwischen den Gelen befand sich die innere Kammer, welche mit 180 ml Laufpuffer 2 befüllt wurde. Erst nachdem diese innere Kammer auf ihre Dichtigkeit überprüft war, konnte in die äußere Kammer 600 ml Laufpuffer 1 gegossen werden.

Die Taschen der Fertiggele wurden mit einer Spritze und Kanüle mit Laufpuffer 2 gespült. Ehe die Proben nun aufgetragen werden konnten, wurden diese bei 95°C für fünf Minuten gekocht, in der Microfuge®18 abzentrifugiert und im MS2 Minishaker gemischt. Mit einer Microliterspritze Hamilton wurden die Proben langsam in die Taschen der Gele gefüllt. Dabei war zu beachten, dass es zu keinem Vermischen der Proben kam. Nun wurden die Kabel in die an der Kammer vorgesehenen Anschlüsse eingesteckt und eine Spannung von 200 Volt für 50 Minuten angelegt. Die Moleküle begannen nun auf der Polyacrylamidmatrix zu wandern.

3.4.4 Übertragung durch Western Blot

Der Brite Edwin Southern entwickelte 1975 die nach ihm benannte Methode des Southern Blots. Mit diesem Verfahren kann eine Gensequenz der DNA nachgewiesen werden. Von ihr abgeleitet ist der Western Blot, bei welchem Proteine nach der gelelektrophoretischen Auftrennung auf eine Trägermembran übertragen werden (Towbin, Staehelin, & Gordon, 1979). Es gibt drei Möglichkeiten des Proteintransfers. In dieser Arbeit wurde das Semidry Blotting angewendet, bei dem die negativ geladenen Proteine durch ein elektrisches Feld Richtung Anode wandern. Die Moleküle wurden von der SDS-Page auf eine Nitrocellulose Membran geblottet. Dafür musste ein Transferpuffer (500 ml) hergestellt werden:

Transferpuffer:

Aqua bidest.	375 ml
NuPAGE Transfer Buffer (20x)	25 ml
Methanol	100 ml
NuPAGE Antioxidant	500 µl

Zudem benötigte man für den Blot von zwei Polyacrylamidgelen:

4x Filterpapiere (9 x 7,5 cm)

2x Nitrocellulose Membranen

5x Schwämme

40 ml des Transferpuffers wurden für die Gele gebraucht. In kleinen Wannen mit je 10 ml wurden die Filterpapiere und die Nitrocellulose eingelegt. Mit dem restlichen Transferpuffer wurden die Schwämme eingeweicht und mit einer Handrolle luftblasenfrei ausgedrückt. Nachdem die SDS-Page abgeschlossen wurde, konnten die Fertiggele aus der Kammer entnommen und an den vorgesehenen Markierungen vorsichtig aufgespalten werden. Das Gel mit den separierten Proteinen konnte per Hand vorsichtig abgenommen und in den Transferpuffer eingelegt werden. Anschließend wurden die Materialien zu einem Blotsandwich aufgebaut. Um Luftblasen zu vermeiden, wurde dieser Arbeitsschritt in einer Entwicklerschale mit Pufferlösung ausgeführt und nach jeder Schicht per Handrolle abgefahren. Im Gegensatz zu der SDS-Page wanderten die Proteine während des Western Blots senkrecht entlang des Polyacrylamid Gels.

Die Reihenfolge der Schichten:

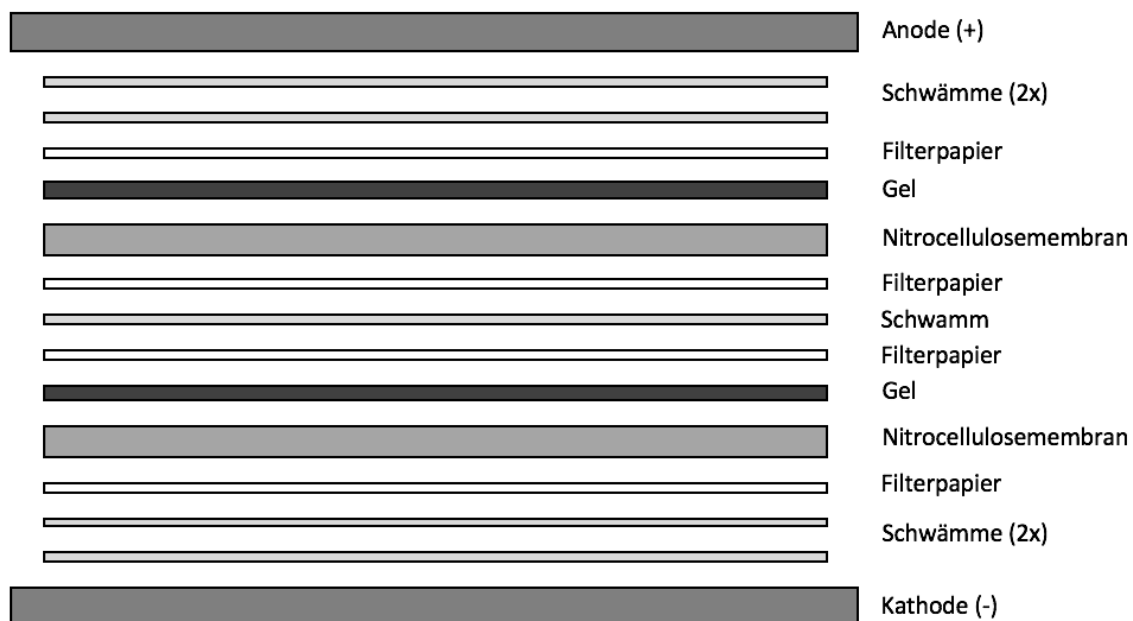


Abbildung 3.4.4-1: Querschnittsschema des Blotsandwichs

Das Blotsandwich wurde über einer Schale zusammengedrückt und konnte in die Klemmkeile gespannt werden. Die innere Blotkammer wurde mit 40 ml Transferpuffer und die äußere Kammer mit 600 ml Wasser zum Kühlen befüllt. Anschließend wurde für

eine Stunde eine Spannung von 30 V angelegt. Nach dieser Zeit waren die Proteine von den Gelen auf die Membrane transferiert. Der Stromfluss wurde beendet und die Kammer auseinandergelassen. Die Nitrocellulosemembranen wurden für eine Minute in steriles Wasser eingelegt und anschließend für eine Stunde auf dem Schüttler geblockt. Dazu wurden die Membranen mit Bovine-serum-albumin 5 % (BSA) in Tris-buffered-line (1x) überzogen.

Tris-buffered-line:

Tris/HCl	10 mmol/l
NaCl	150 mmol/l
pH 7,4	

Auf diese Weise wurden freie Bindungsstellen mit Proteinen besetzt, an welche sich die Antikörper bei der Detektion nicht binden konnten. Zum Abschluss des Blottings wurden die Membranen mit sterilem Wasser abgewaschen und zwischen zwei neuen Filterpapieren im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

3.4.5 Nachweis durch Chemilumineszenz

Durch den Western Blot wurden die aufgetrennten Proteine aus der SDS-Page auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Zur Detektion und Darstellung der separierten Proteine auf der Membran diente nach einer Immunmarkierung die Chemilumineszenz. Die Grundlage ist dabei eine chemische Reaktion von Luminol und einer Peroxidase. Als Folge dieser Reaktion werden die Moleküle in einen elektronisch angeregten Zustand versetzt und sind dann als Lichtemission in dem Chemilumineszenz-Gerät detektierbar (Albrecht, Brandl, & Adam, 1990). Die Proteinbanden wurden zunächst durch die indirekte Methode der Immunmarkierung gekennzeichnet. Die Membranen wurden für zwei Stunden mit einem Primärantikörper auf einem Schüttler bei niedriger Einstellung und Raumtemperatur inkubiert. Dabei banden die Primärantikörper spezifisch an die passenden Antigene auf der Blotmembran an. Pro Membran wurden 5 ml der Antikörper-Lösung benötigt.

Antikörper Lösung: BSA 5 % in 1x TBS + 0,1 % Tween 20 + Antikörper (x)

Die Konzentrationen der unterschiedlichen Antikörper für die Lösungen waren verschieden und mussten beim Ansetzen der Lösung berücksichtigt werden. Nach der Inkubation mit der Primärantikörper-Lösung mussten die Membranen dreimal für zehn Minuten in 1x TBS + 0,1 % Tween 20 gewaschen werden. Nicht gebundene Antikörper

wurden so wieder von der Membran abgelöst. Im nächsten Schritt wurden die Membranen mit einem Sekundärantikörper inkubiert. Dieser war mit Horseradish-peroxidase (HRP) konjugiert und konnte an den Primärantikörper auf der Membran binden. Diese Inkubation durfte nicht länger als eine Stunde dauern, da die Enzyme sonst unspezifische Bindungen eingehen.

<u>Verwendete Antikörper</u>	<u>Primärantikörper</u>	<u>Sekundärantikörper</u>
Anti-Aktin (42kDa)	Anti-rabbit 1:1000 (Sigma Aldrich)	Sheep-anti-rabbit 1:2000 (Affinity Biologicals)
Anti-Arginase 1 (35kDa)	Anti-rabbit 1:1000 (Sigma Aldrich)	Sheep-anti-rabbit 1:2000 (Affinity Biologicals)
Anti-Gata4 (48kDa)	Anti-rabbit 1:1000 (Novus Biologicals)	Sheep-anti-rabbit 1:2000 (Affinity Biologicals)
Anti-Serca (92kDa)	Anti-goat 1:200 (Santa Cruz)	Donkey-anti-goat 1:5000 (Jackson Immuno Research)

Die Sekundärantikörper, die an keinen Primärantikörper gebunden hatten, wurden zweimal zehn Minuten mit 1x TBS mit Tween 20 und einmal ohne Tween 20 ausgewaschen. Das Detektiergerät stand in einem lichtgeschützten Raum, in welchem der letzte Schritt durchgeführt wurde.

In einer Schale mit „*enhanced chemiluminescence*“ (ECL) - Lösung wurden die Blots für zwei Minuten inkubiert und konnten anschließend mit einer Pinzette auf einer Glasplatte platziert werden. Diese wurde in das Gerät gegeben, welches mit Hilfe des Computerprogramms „ChemiCapt“ nach Einstellung der Schärfe ein Lichtbild erstellte. Die Belichtungsdauer wurde dabei von dem Gerät vorgeschlagen und konnte manuell weiter optimiert werden. Die Bilder wurden im Original und Inverse im „Tiff-Format“ gespeichert.

3.4.6 Auswertung der Bilder

Die quantitative Auswertung der Proteine erfolgte mit dem Programm „Quantity One“. Die Tiff-Bilder wurden aufgerufen und jede Proteinbande wurde durch einen Rahmen markiert und ins Verhältnis zum Hintergrund gesetzt. Das Programm generierte das Volumen in der Intensität x mm². Diese Werte wurden in Excel übernommen und ins Verhältnis zum Referenzprotein Aktin gesetzt. So erhielt man die relativen Proteinwerte, aus denen der Mittelwert, die Standardabweichung und der Median berechnet werden konnten.

3.4.7 Statistik

Die relativen Expressionsunterschiede aus der rt-PCR und die relativen Proteinwerte aus den Western Blot-Versuchen wurden in Excel-Tabellen aufgeführt. Daraus wurden der Mittelwert, die Standardabweichung und der Median berechnet. Zum Vergleich zweier Gruppen diente ein konventioneller T-Test. Bei einem Vergleich von mehreren Gruppen wurde mit dem Statistikprogramm „SPSS 20“ die nichtparametrische ANOVA nach Kruskal-Wallis mit anschließendem Post-hoc-Test herangezogen. Ergebnisse mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant anerkannt. Aus Übersichtsgründen wurde bei der Darstellung von Verläufen auf Standardabweichungen verzichtet.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen der Herzfunktionen an Rattenherzen in der Langendorff-Apparatur

Um den Einfluss der Ischämiedauer und die protektive Wirkung der Postkonditionierung auf das Myokard zu untersuchen, wurden funktionell verschiedene Herzparameter mit Hilfe des Langendorff-Modells ausgewertet. Neben der Herzrate, dem linksventrikulär enddiastolischen Druck (LVEDP) wurde der linksventrikulär entwickelte Druck (LVDP) sowie das Frequenz-Druck-Produkt (Herzrate x LVDP) aufgezeichnet bzw. errechnet. Zudem wurde das Verhältnis des Herzfeuchtgewichtes zum Körpergewicht ermittelt. Wie unter Punkt 3.2.6 aufgezeigt, wurden vier Versuchsgruppen mit der nicht-ischämischen Kontrollgruppe verglichen. Die Versuchsgruppen unterschieden sich durch unterschiedliche Ischämiedauern von 15 und 60 Minuten und durch die Abstinenz (I/R) oder den Erhalt (IPoC) des Postkonditionierungsmanövers.

4.1.1 Untersuchung der Herzrate

4.1.1.1 Herzrate nach 15 Minuten Ischämiedauer

Dargestellt ist der Verlauf der Herzrate während der 180-minütigen Reperfusion nach 15 Minuten Ischämie. Bei beiden Versuchsgruppen zeigten sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Veränderungen gegenüber der Kontrollgruppe oder im direkten Vergleich.

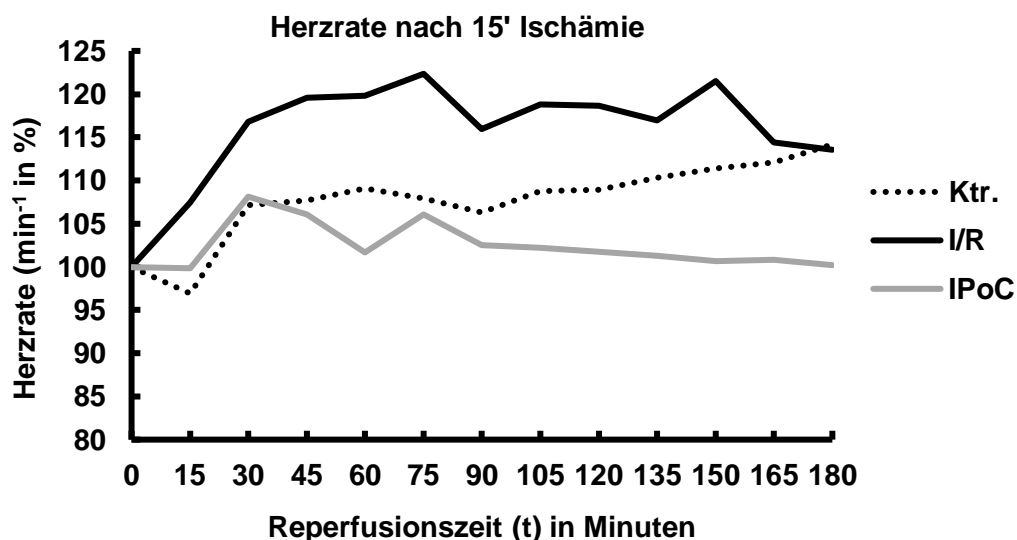


Abbildung 4.1.1.1-1: Darstellung der Mittelwerte der Herzrate während der 180-minütigen Reperfusion nach einer Ischämiedauer von 15 Minuten. Die Werte beziehen sich auf die normierte Ausgangsrate in Prozent.

Nach Beendigung der Reperfusion zeigte die Ischämie-Gruppe ohne Postkonditionierung eine nahezu unveränderte Herzrate. Die Gruppe mit Postkonditionierung zeigte eine geringe Senkung der Herzrate. Beide Werte waren im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant verändert, $p > 0,05$.

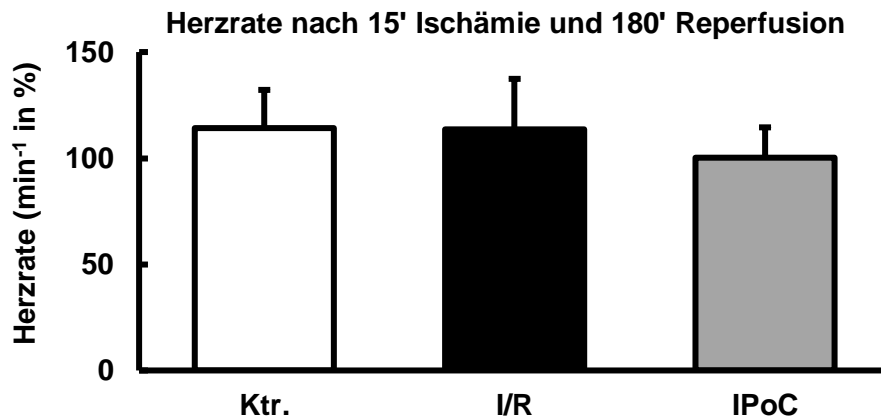


Abbildung 4.1.1.1-2: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Herzrate nach einer Ischämiedauer von 15 Minuten und 180 Minuten Reperfusion. Die Werte beziehen sich auf die normierte Ausgangsrate in Prozent, $p > 0,05$.

4.1.1.2 Herzrate nach 60 Minuten Ischämiedauer

Dargestellt ist der Verlauf der Herzrate in der 180-minütigen Reperfusion nach einer Ischämiedauer von 60 Minuten. Eine leichte Erhöhung der Herzrate war bei beiden Versuchsgruppen zu beobachten, jedoch erreichte diese nicht das Signifikanzniveau, ($p > 0,05$).

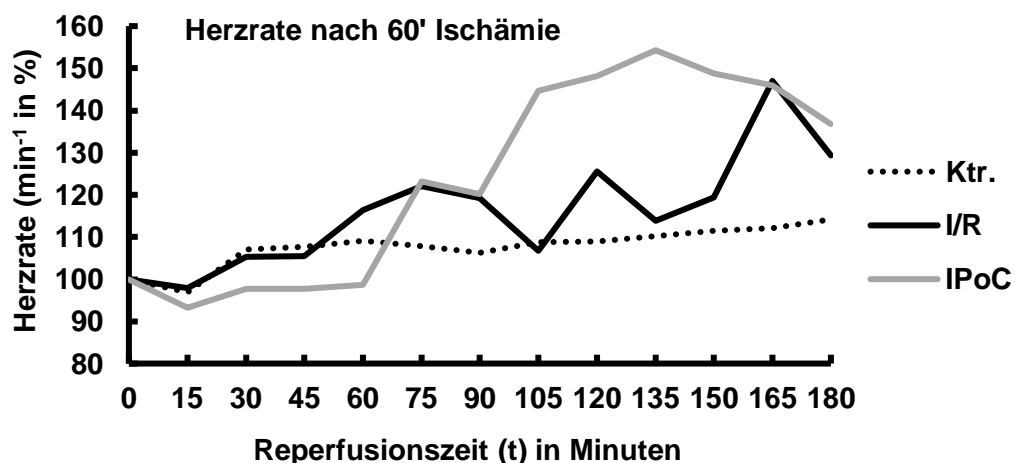


Abbildung 4.1.1.2-1: Darstellung der Mittelwerte der Herzrate im Verlauf der 180-minütigen Reperfusion nach einer Ischämiedauer von 60 Minuten. Die Werte beziehen sich auf die normierte Ausgangsrate in Prozent.

Nach Ende der 180-minütigen Reperfusion waren die Herzraten bei beiden Gruppen mit einer vorherigen Ischämie gering erhöht. Die Veränderungen waren nicht signifikant, $p > 0,05$.

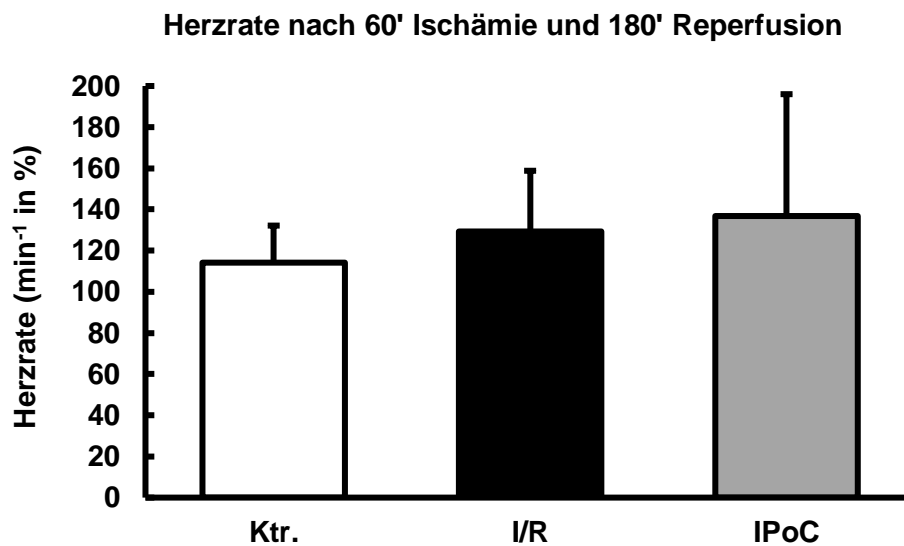


Abbildung 4.1.1.2-2: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Herzrate nach einer Ischämiedauer von 60 Minuten und 180 Minuten Reperfusion. Die Werte beziehen sich auf die normierte Ausgangsrate in Prozent, $p > 0,05$.

4.1.2 Untersuchung des linksventrikulär enddiastolischen Drucks

4.1.2.1 Linksventrikulär enddiastolischer Druck (LVEDP) nach 15 Minuten Ischämiedauer

Der LVEDP kann als ein Maß für den irreversiblen Schaden am Myokard betrachtet werden. Er ist unter anderem bei Herzinsuffizienz erhöht. Bei der Betrachtung des LVEDPs während der Reperfusionsphase zeigte sich eine Erhöhung in der I/R-Gruppe. Die postkonditionierten Versuchsherzen zeigten eine Abnahme des LVEDPs. Beide Veränderungen waren nicht signifikant, $p > 0,05$.

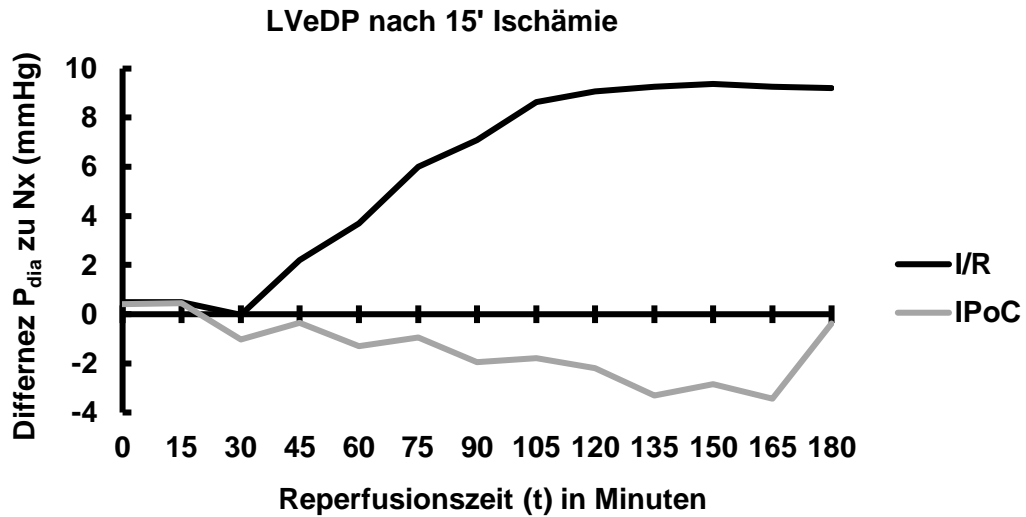


Abbildung 4.1.2.1-1: Darstellung der Mittelwerte des linksventrikulär enddiastolischen Drucks während der 180-minütigen Reperfusion nach einer Ischämiedauer von 15 Minuten. Die Werte zeigen die Differenzen der Versuchsgruppen zu den Kontrollherzen in mmHg.

Nach der Stabilisierungsphase bzw. vor der Ischämiephase wurden die enddiastolischen Drücke aufgezeichnet.

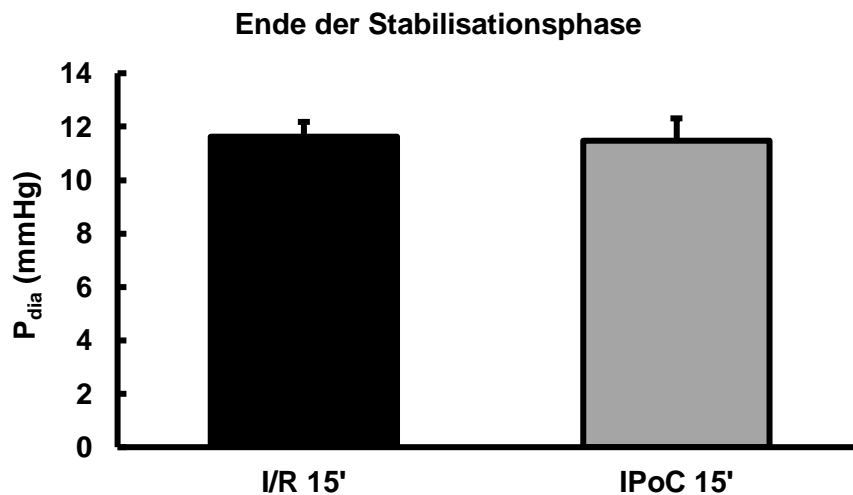


Abbildung 4.1.2.1-2: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen des LVEDP vor der Ischämiedauer von 15 Minuten. Die Werte sind in mmHg angegeben, $p > 0,05$.

Nach der kürzeren Ischämiedauer von 15 Minuten mit anschließender 180-Minuten-Reperfusion war der LVeDP bei der I/R-Gruppe erhöht. Die postkonditionierten Versuchsherzen zeigten eine minimale Erniedrigung des enddiastolischen Drucks. Beide Veränderungen waren nicht signifikant, $p > 0,05$.

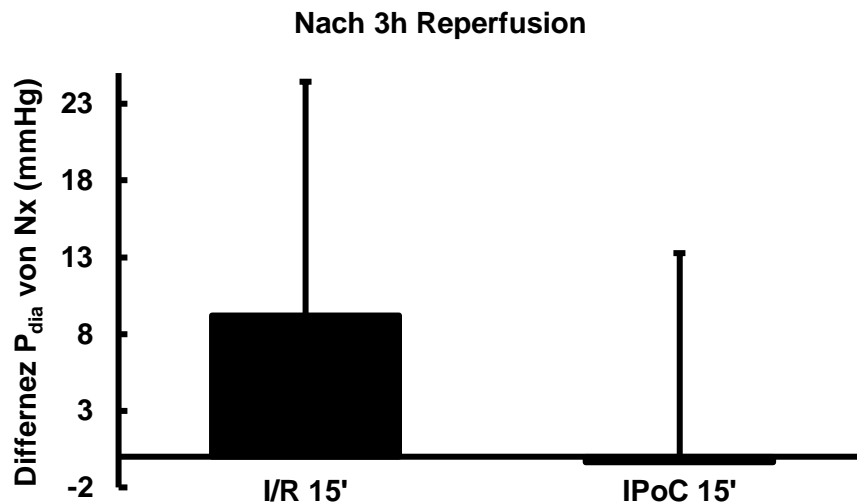


Abbildung 4.1.2.1-3: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichung des LVeDP nach einer Ischämiedauer von 15 Minuten und 180 Minuten Reperfusion. Die Werte zeigen die Differenzen der Versuchsgruppen zu den Kontrollherzen in mmHg, $p > 0,05$.

4.1.2.2 Linksventrikulär enddiastolischer Druck (LVeDP) nach 60 Minuten Ischämiedauer

Während der 180-minütigen Reperfusion nach einer Ischämiedauer von 60 Minuten zeigte sich anfangs ein starker Anstieg des enddiastolischen Drucks. Nach einer zwischenzeitlichen leichten Erholung nahm der enddiastolische Druck bei beiden Gruppen stetig zu.

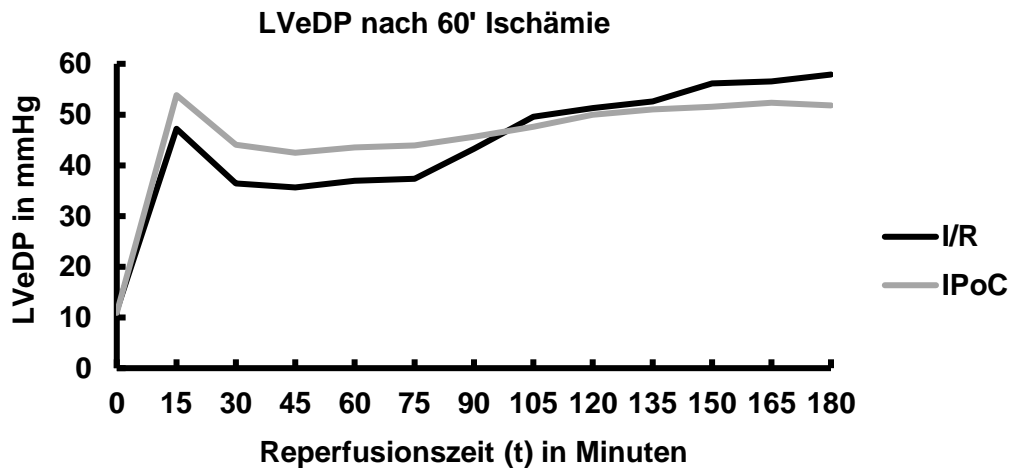


Abbildung 4.1.2.2-1: Darstellung der Mittelwerte des linksventrikulär enddiastolischen Drucks während der 180-minütigen Reperfusion nach einer Ischämiedauer von 60 Minuten. Die Werte sind in mmHg angegeben.

Nach der Stabilisierungsphase bzw. vor der Ischämiephase wurden die enddiastolischen Drücke aufgezeichnet.

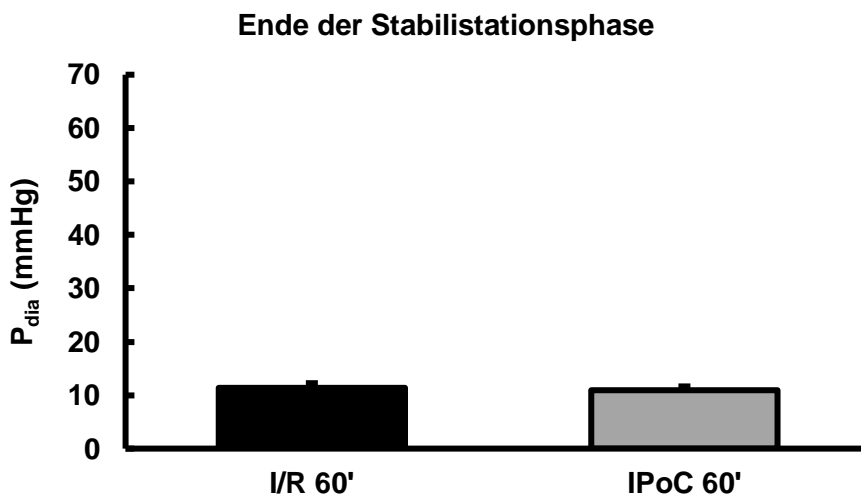


Abbildung 4.1.2.2-2: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen des LVEDP vor der Ischämiedauer von 60 Minuten. Die Werte sind in mmHg angegeben, $p > 0,05$.

Bei beiden Gruppen mit einer Ischämiedauer von 60 Minuten war der LVEDP nach der 180-minütigen Reperfusion deutlich erhöht. Beide Veränderungen zeigten einen signifikanten Anstieg, $p < 0,05$.

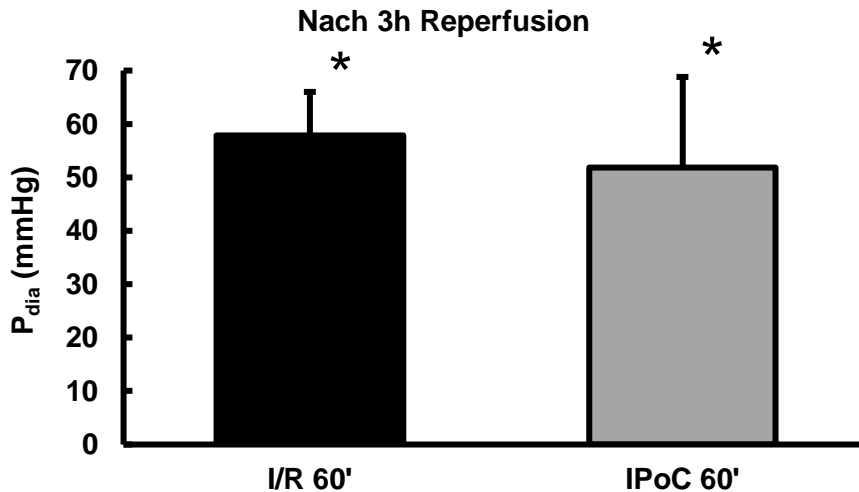


Abbildung 4.1.2.2-3: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichung des LVeDP nach einer Ischämiedauer von 60 Minuten und 180 Minuten Reperfusion. Die Werte sind in mmHg angegeben, *=p<0,05 gegenüber der präischämischen Werte aus Abbildung 4.1.2.2-2.

4.1.3 Untersuchung des linksventrikulär entwickelten Druckanstiegs

4.1.3.1 Der linksventrikulär entwickelte Druckanstieg (LVDP) nach 15 Minuten Ischämiedauer

Der LVDP ist ein aussagekräftiger Parameter, um die Erholung des Mykards nach einer Schädigung durch Ischämie zu beurteilen. Er ist die Differenz aus systolischem und diastolischem Druck. Dargestellt ist der Verlauf des LVDP während der 180-minütigen Reperfusion.

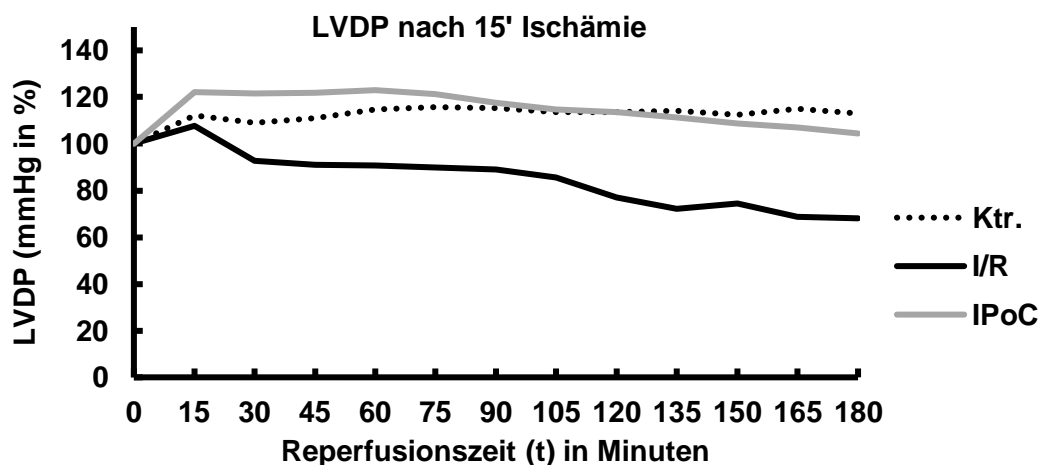


Abbildung 4.1.3.1-1: Darstellung der Mittelwerte des LVDP während der 180-minütigen Reperfusion nach einer Ischämiedauer von 15 Minuten. Die

Werte beziehen sich auf den normierten entwickelten Ausgangsdruck in Prozent.

Nach einer Ischämiedauer von 15 Minuten und anschließender Reperfusion über 180 Minuten war der LVDP bei der Gruppe ohne Postkonditionierung (I/R) signifikant niedriger $p < 0,05$ als bei der Kontrollgruppe. Bei der Gruppe mit Postkonditionierung (IPoC) kam es im Vergleich zur Kontrollgruppe zu keinem signifikanten Abfall des LVDP, $p > 0,05$.

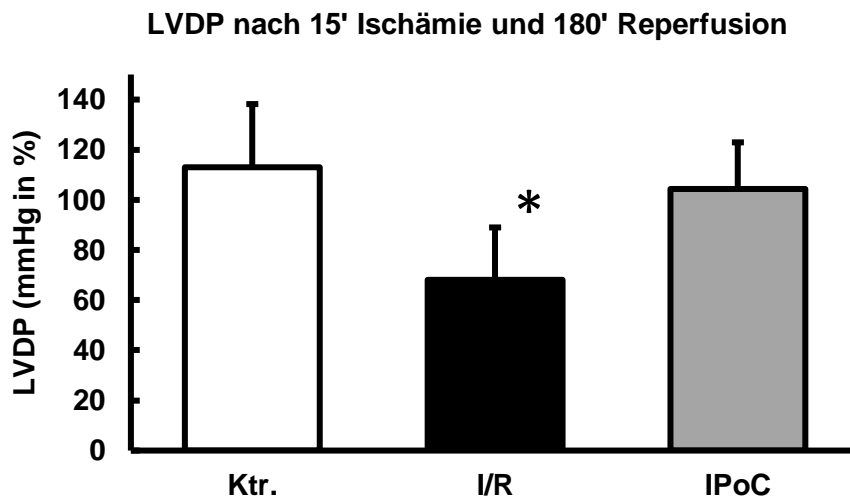


Abbildung 4.1.3.1-2: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen des LVDP nach einer Ischämiedauer von 15 Minuten und 180 Minuten Reperfusion. Die Werte beziehen sich auf den normierten entwickelten Ausgangsdruck in Prozent, $*=p < 0,05$.

4.1.3.2 Der linksventrikulär entwickelte Druckanstieg (LVDP) nach 60 Minuten Ischämiedauer

Dargestellt ist der Verlauf des LVDP während der 180-minütigen Reperfusion nach einer Ischämiedauer von 60 Minuten. Bei beiden Gruppen mit vorheriger Ischämie kam es zu einem Abfall des LVDP.

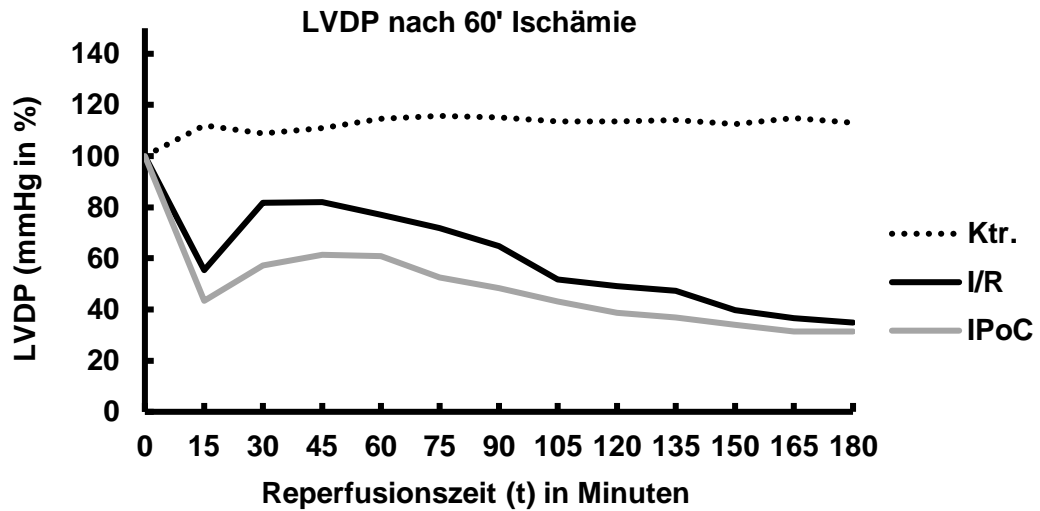


Abbildung 4.1.3.2-1: Darstellung der Mittelwerte des LVDP im Verlauf während der 180-minütigen Reperfusion nach einer Ischämiedauer von 60 Minuten. Die Werte beziehen sich auf den normierten entwickelten Ausgangsdruck in Prozent.

Nach 60 Minuten Ischämie und 180 Minuten Reperfusion kam es zu einem signifikanten Abfall des LVDP beider Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe, $p < 0,05$.

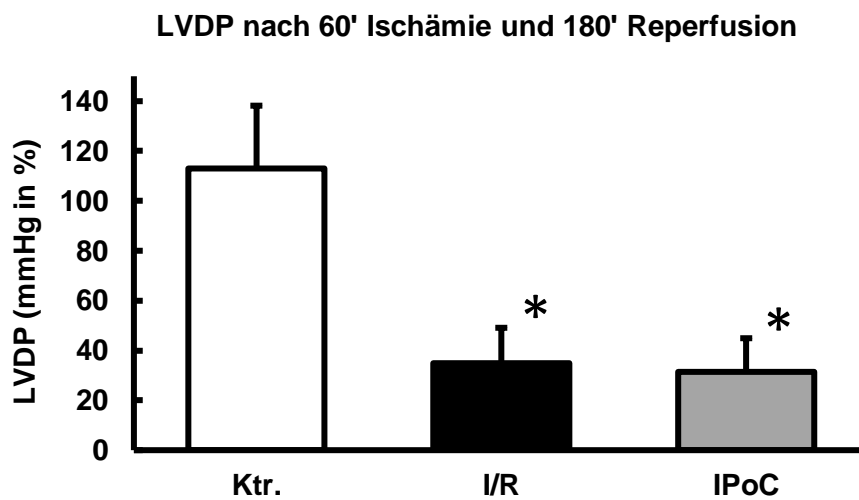


Abbildung 4.1.3.2-2: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen des LVDP nach 60 Minuten Ischämie und 180 Minuten Reperfusion. Die Werte beziehen sich auf den normierten entwickelten Ausgangsdruck in Prozent, $* = p < 0,05$.

4.1.4 Untersuchung des Frequenz-Druck-Produktes

4.1.4.1 Das Frequenz-Druck-Produkt (RPP) nach 15 Minuten Ischämiedauer

Das Frequenz-Druck-Produkt ist das Produkt aus der Herzrate pro Minute und dem linksventrikulär entwickelten Druck in mmHg. Es ist indirekt ein verlässliches Maß für den Energie- bzw. Sauerstoffverbrauch des Myokards. Dargestellt ist der Verlauf des RPP in der 180-minütigen Reperfusion nach 15 Minuten Ischämie.

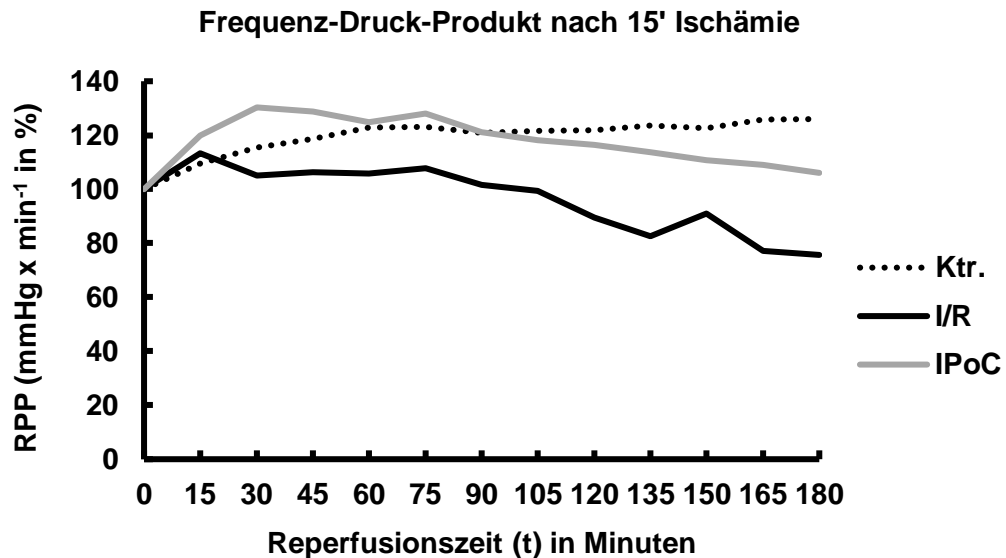


Abbildung 4.1.4.1-1: Darstellung der Mittelwerte des RPP im Verlauf während der 180-minütigen Reperfusion nach einer Ischämiedauer von 15 Minuten. Die Werte beziehen sich auf das normierte entwickelte Ausgangsprodukt in Prozent.

Nach Ende der 180 Minuten Reperfusion war das RPP bei den Versuchsherzen mit 15 Minuten Ischämie ohne Postkonditionierung signifikant erniedrigt, $p < 0,05$. Die Herzen mit Postkonditionierung konnten sich soweit erholen, dass kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollherzen vorhanden war, $p > 0,05$.

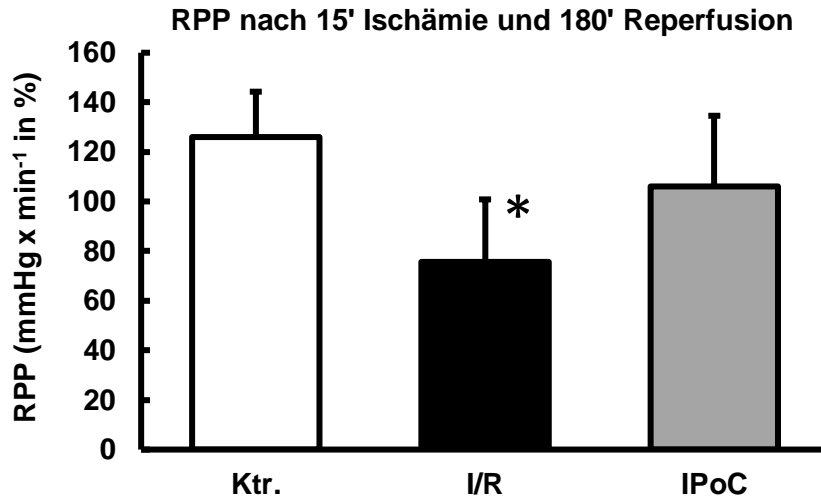


Abbildung 4.1.4.1-2: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen des RPP nach einer Ischämiedauer von 15 Minuten und 180 Minuten Reperfusion. Die Werte beziehen sich auf das normierte entwickelte Ausgangsprodukt in Prozent, *=p<0,05.

4.1.4.2 Das Frequenz-Druck-Produkt (RPP) nach 60 Minuten Ischämiedauer

Das Frequenz-Druck-Produkt war im Verlauf der 180 Minuten Reperfusion sowohl bei den Versuchsherzen mit als auch ohne Postkonditionierung erniedrigt.

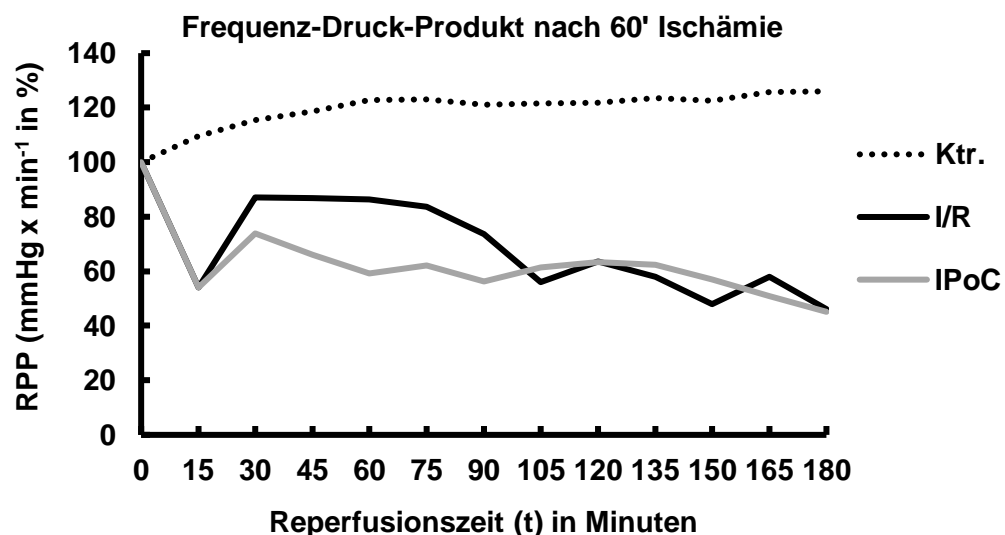


Abbildung 4.1.4.2-1: Darstellung der Mittelwerte des RPP im Verlauf während der 180-minütigen Reperfusion nach einer Ischämiedauer von 60 Minuten. Die Werte beziehen sich auf das normierte entwickelte Ausgangsprodukt in Prozent.

Nach 180 Minuten Reperfusion waren die RPP bei beiden Reihen der Versuchsherzen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt, $p < 0,05$. Es zeigte sich keine Besserung durch Postkonditionierung.

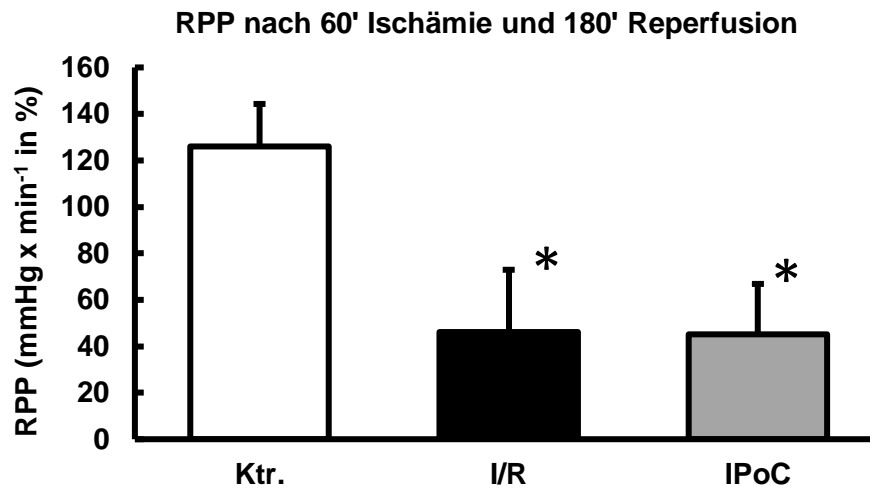


Abbildung 4.1.4.2-2: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen des RPP nach einer Ischämiedauer von 60 Minuten und 180 Minuten Reperfusion. Die Werte beziehen sich auf das normierte entwickelte Ausgangsprodukt in Prozent, $*=p < 0,05$ gegenüber Ktr.

4.1.5 Untersuchung des Verhältnisses von Herzgewicht zu Körpergewicht (HW/BW)

Um die Ödem-Bildung als Parameter eines endothelialen Schrankenversagens zu beurteilen, wurden die Herzen gewogen und in das Verhältnis zum Körpergewicht gesetzt. Die Quotienten sind in dem nachfolgenden Diagramm dargestellt. Die Herzen mit der Ischämiedauer von 15 Minuten und 180 Minuten Reperfusion zeigten keine signifikanten Veränderungen, ($p > 0,05$). Bei den Versuchsherzen mit einer Ischämiedauer von 60 Minuten zeigte sich eine signifikante Erhöhung des HW/BW-Quotienten.

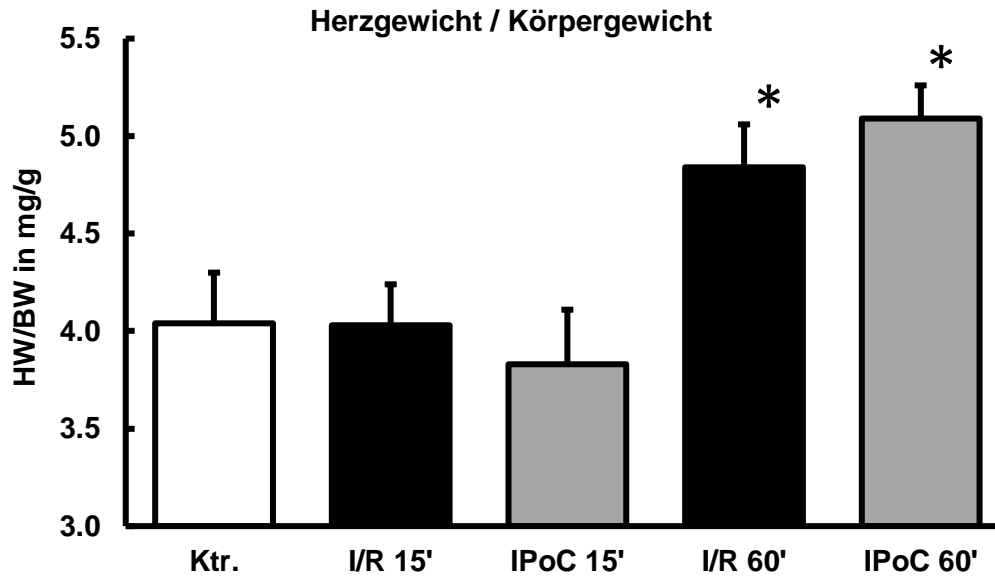


Abbildung 4.1.5-1: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichung von dem Quotienten aus Herzgewicht und Körpergewicht nach der 180-minütigen Reperfusion. Die Werte sind in mg/g angegeben, *=p<0,05.

4.2 Beschreibung der transkriptionellen Adaption mittels Polymerase-Kettenreaktion zur quantitativen Erfassung der Änderungen

Nach den Herzfunktionen wurde die Genexpression verschiedener Transkriptionsfaktoren und Enzyme untersucht. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion ließ sich nachweisen, dass ein bestimmtes Protein postischämisch auf Transkriptionsebene verändert wurde. Im Einzelnen wurden die Expressionen von Mef2C (Myocyte-specific enhancer factor 2c), Gata4 (Transkription Faktor Gata4), BNP (brian natriuretic peptide), Serca2a (Sarcoplasmatic/endoplasmatic reticulum calcium ATPase) und Arginase 1 untersucht. Alle diese Faktoren können das Remodeling des Myokards nach einer Ischämie beeinflussen.

4.2.1 Expression von Mef2C

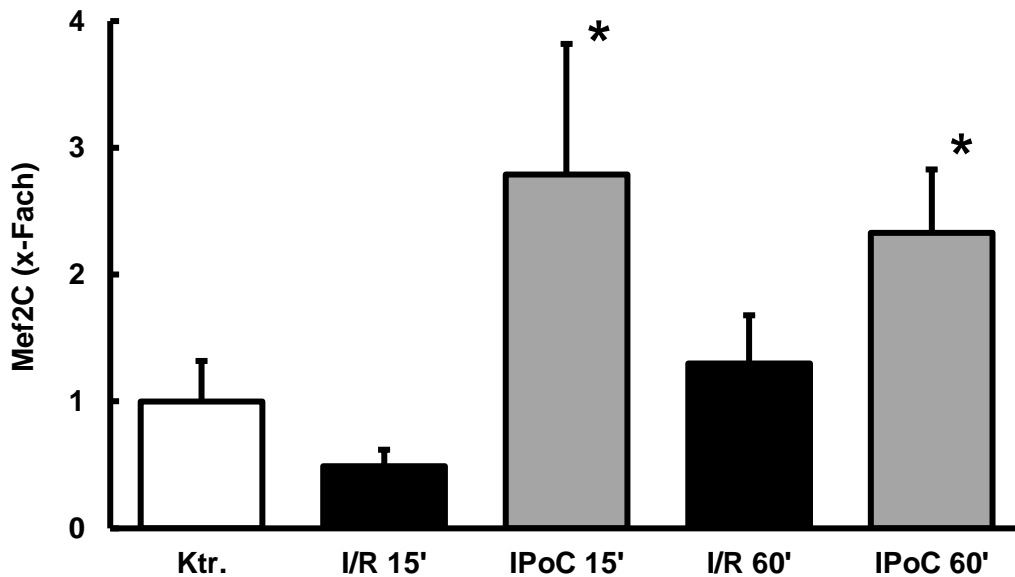


Abbildung 4.2.1-1: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Mef2c – Expression nach 180 Minuten Reperfusion. Die Werte beziehen sich auf die normierte Expression der Kontrollgruppe in Prozent. ANOVA: *= $p < 0,05$ versus Kontrolle.

Bei Betrachtung der Expression von Mef2c zeigte sich bei beiden Ischämie-Gruppen mit Postkonditionierung (IPoC) eine signifikante Erhöhung gegenüber der Kontrollgruppe, $p < 0,05$. Die Ischämiegruppen ohne Postkonditionierung (I/R) zeigten bei einer kürzeren Ischämiephase von 15 Minuten eine reduzierte und bei einer längeren Phase von 60 Minuten eine leicht erhöhte Expression von Mef2c. Beide Veränderungen waren jedoch nicht signifikant.

4.2.2 Expression von Gata4

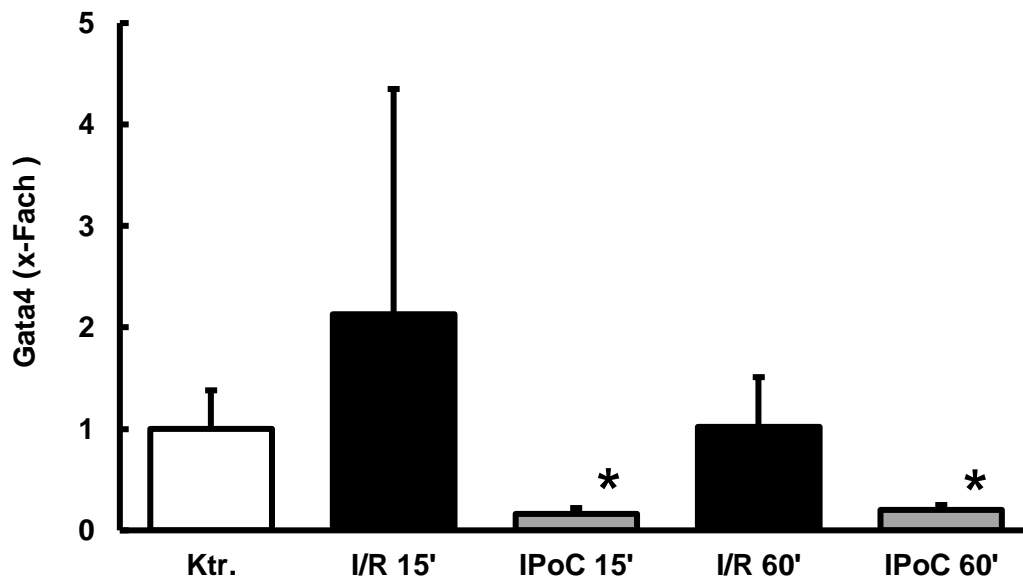


Abbildung 4.2.2-1: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Gata4-Expression nach 180 Minuten Reperfusion. Die Werte beziehen sich auf die normierte Expression der Kontrollgruppe in Prozent. ANOVA: *= $p < 0,05$ versus Ktr.

Die Untersuchung von Gata4 zeigte bei den postkonditionierten Ischämie-Gruppen (IPoC) jeweils eine signifikant erniedrigte Expression gegenüber der Kontrollgruppe. Die Expressionen von Gata4 waren bei beiden Ischämiegruppen ohne Postkonditionierung dagegen leicht erhöht, wiesen aber keine signifikanten Veränderungen auf.

4.2.3 Expression von BNP

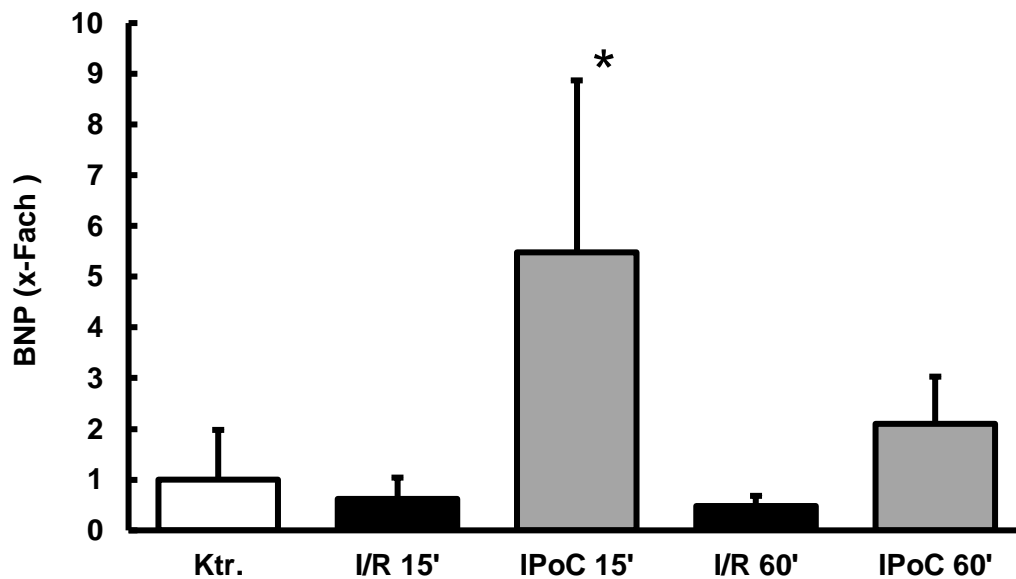


Abbildung 4.2.3-1: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der BNP-Expression nach 180 Minuten Reperfusion. Die Werte beziehen sich auf die normierte Expression der Kontrollgruppe in Prozent. ANOVA: *= $p < 0,05$ versus Ktr.

Während die Expressionen von BNP bei den Ischämiegruppen ohne Postkonditionierung (I/R) leicht erniedrigt waren, zeigten sich Erhöhungen bei den postkonditionierten Gruppen (IPoC). Eine signifikante Erhöhung gegenüber der Kontrollgruppe war jedoch nur bei der IPoC-Gruppe, welche einer 15-minütigen Ischämie ausgesetzt war, mit $p < 0,05$ erkennbar. Die BNP-Expression der IPoC 60'-Versuchsherzen war nur leicht erhöht, $p > 0,05$.

4.2.4 Expression von Serca2a

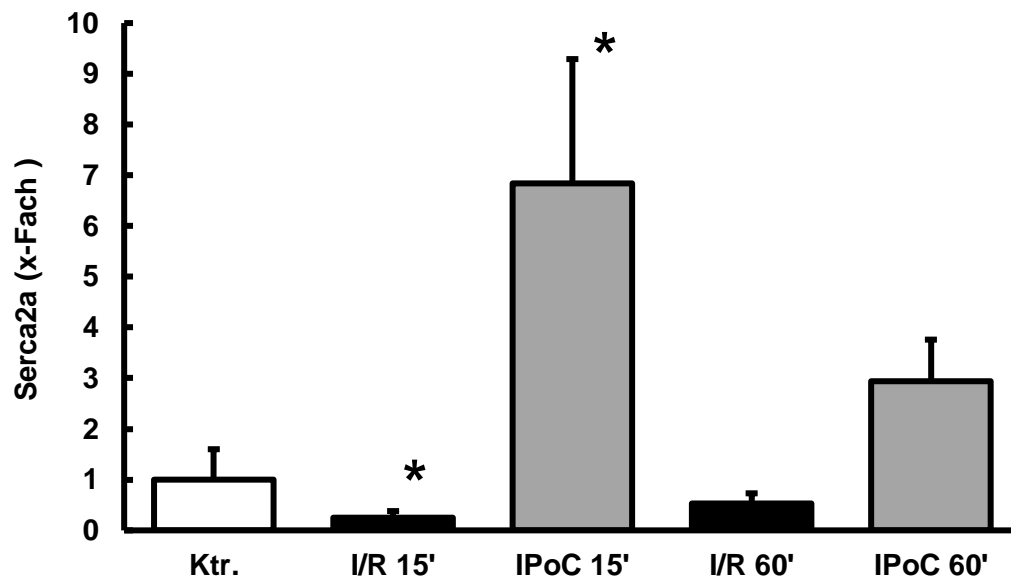


Abbildung 4.2.4-1: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Serca2a-Expression nach 180 Minuten Reperfusion. Die Werte beziehen sich auf die normierte Expression der Kontrollgruppe in Prozent. ANOVA: *=p<0,05 versus Ktr.

Bei der Veranschaulichung der Serca2a-Expressionen zeigten sich signifikante Veränderungen bei beiden Gruppen mit den kürzeren Ischämiedauern von 15 Minuten. Während die Gruppe ohne Postkonditionierung signifikant erniedrigt war, war die mit Postkonditionierung signifikant erhöht. Die beiden Gruppen mit Ischämiedauern von 60 Minuten waren ohne Signifikanzen verändert. Aber auch hier zeigte sich die Expression der I/R-Gruppe erniedrigt und die der IPoC-Gruppe erhöht.

4.2.5 Expression von Arginase 1

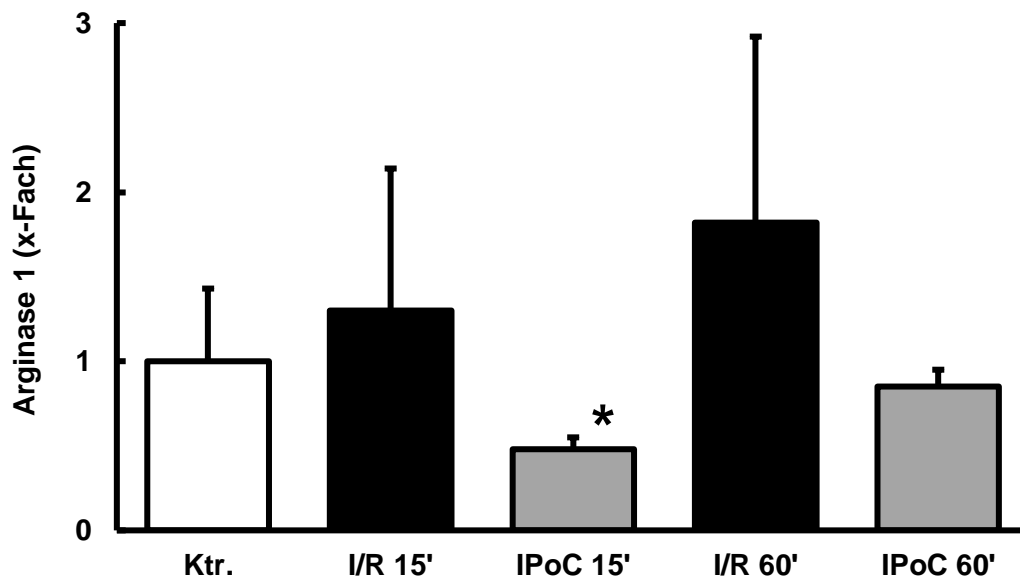


Abbildung 4.2.5-1: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Arginase 1-Expression nach 180 Minuten Reperfusion. Die Werte beziehen sich auf die normierte Expression der Kontrollgruppe in Prozent. ANOVA: *=p<0,05 versus Ktr.

Betrachtet man die Expressionen von Arginase 1, zeigten sich Erhöhungen bei den Gruppen ohne Postkonditionierungen. Die Expression stieg dabei mit zunehmender, vorheriger Ischämiedauer, auch wenn diese nicht signifikant war. Bei den postkonditionierten Gruppen zeigte sich bei der IPoC 15'-Gruppe eine signifikante Erniedrigung der Arginase 1-Expression. Es kam zu einer Steigerung bei den IPoC 60'-Versuchsherzen, welche jedoch immer noch unter der der Kontrollgruppe lag.

4.3 Western Blot

Um die Ergebnisse zur transkriptionellen Regulation auf Proteinebene zu bekräftigen, wurden im Anschluss Western Blots durchgeführt. Im Einzelnen wurden Gata4, Serca2a und Arginase 1 untersucht. Während der Reperfusionsdauer von 180 Minuten nahm die Expression des Transkriptionsfaktors Gata4 in allen Gruppen ab. Die Versuche mit den Antikörpern von Serca2a und Arginase 1 zeigten zwar eine höhere Konzentration an Proteinen, allerdings ließen sich auch hier keine validen Daten erheben.

4.3.1 Proteinnachweis von Gata4

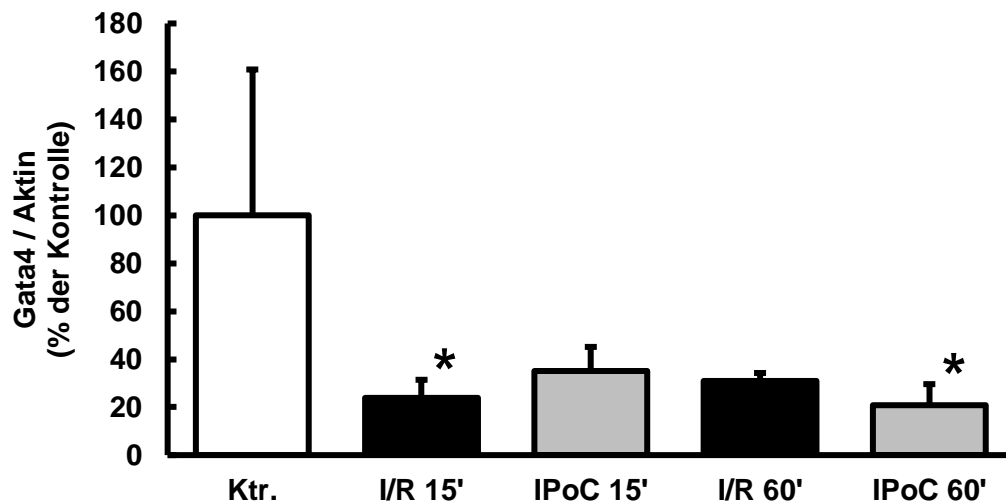


Abbildung 4.3.1-1: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Gata4-Expression nach 180 Minuten Reperfusion im Western Blot. Die Werte beziehen sich auf die normierte Expression der Kontrollgruppe in Prozent. ANOVA: *= $p < 0,05$ versus Ktr.

Alle vier Versuchsgruppen zeigten im Vergleich zur Kontrolle eine deutliche Erniedrigung.

4.3.2 Proteinnachweis von Serca2a

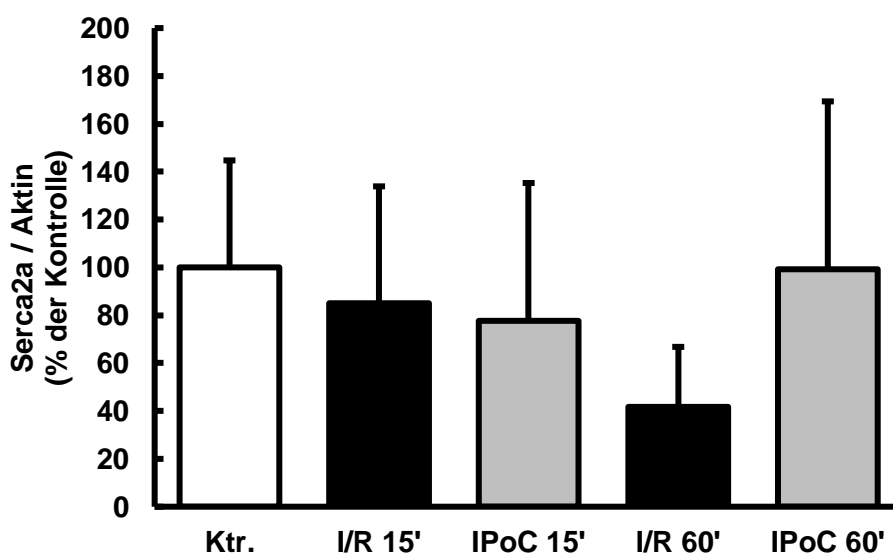


Abbildung 4.3.2-1: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Serca2a-Expression nach 180 Minuten Reperfusion im Western Blot.

Die Werte beziehen sich auf die normierte Expression der Kontrollgruppe in Prozent. ANOVA: $p > 0,05$ versus Ktr.

Die vier Versuchsgruppen zeigten ähnliche Proteinkonzentrationen wie die Kontrollgruppe. Signifikante Unterschiede waren nicht vorhanden.

4.3.3 Proteinnachweis von Arginase 1

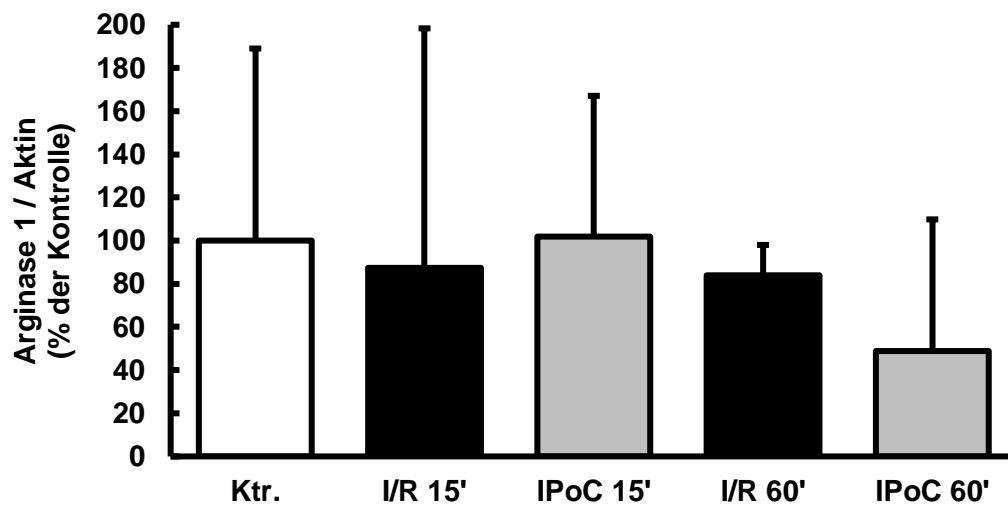


Abbildung 4.3.3.-1: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Arginase 1-Expression nach 180 Minuten Reperfusion im Western Blot. Die Werte beziehen sich auf die normierte Expression der Kontrollgruppe in Prozent. ANOVA: $p > 0,05$ versus Ktr.

Die Ergebnisse aus den Arginase 1 Western Blots ließen keine signifikant erniedrigten oder erhöhten Proteinnachweise erkennen.

4.4 Untersuchungen der Herzfunktionen an Mäuseherzen in der Langendorff-Apparatur

Unter Punkt 3.1 ist beschrieben, dass neben Rattenherzen auch Mäuseherzen untersucht wurden. Neben den transgenen JDP2-Mäusen (TG) dienten deren nicht-transgene Wurfgeschwister (WT) für die Versuche im Langendorff-Modell. Ein Unterschied zu den Versuchen mit Rattenherzen besteht darin, dass andere Zeiten für die Ischämie und die Reperfusion gewählt wurden. Der Grund ist die geringere Belastbarkeit der Mäuseherzen gegenüber einer Ischämie. Neben den Kontrollreihen ohne Ischämie (Nx) wurde bei den Versuchsreihen (I/R) eine Ischämiedauer von 45 Minuten und eine Reperfuionszeit von 30 Minuten gewählt. Ein weiterer Unterschied war die Einstellung der Herzfrequenzen auf kontinuierliche 600 Schläge pro Minute mit einem externen Schrittmacher. Aufgezeichnet wurde der systolische und diastolische Druck. Daraus ließ sich der ventrikulär entwickelte Druck (systolischer Druck - diastolischer Druck) berechnen.

4.4.1 Untersuchung des systolischen Drucks

Aufgezeichnet ist der systolische Druck während der 30-minütigen Reperfusion nach einer Ischämiedauer von 45 Minuten bei den Versuchsherzen der nicht-transgenen Mäuse (WT - I/R). Es zeigten sich zu keinem Zeitpunkt der Reperfusion signifikante Unterschiede zu den Kontrollgruppen (WT - Nx).

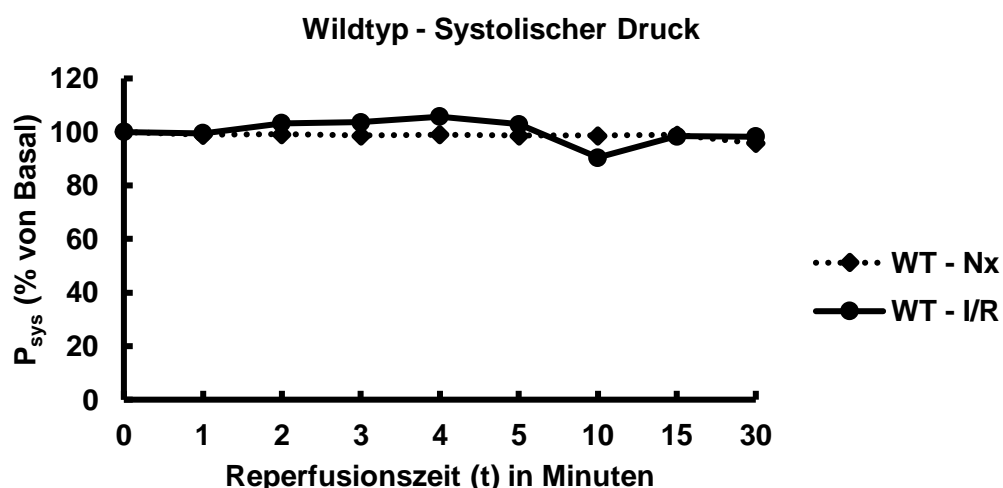


Abbildung 4.4.1-1: Darstellung der Mittelwerte des linksventrikulär systolischen Drucks bei den Wildtyp-Mäusen während der 30-minütigen Reperfusion nach einer Ischämiedauer von 45 Minuten. Die Werte beziehen sich auf den normierten entwickelten Ausgangsdruck in Prozent.

Nach Beendigung der 30-minütigen Reperfusion zeigte sich bei den transgenen Mäusen kein signifikanter Unterschied zwischen der Versuchsreihe mit und der ohne Ischämie, $p > 0,05$.

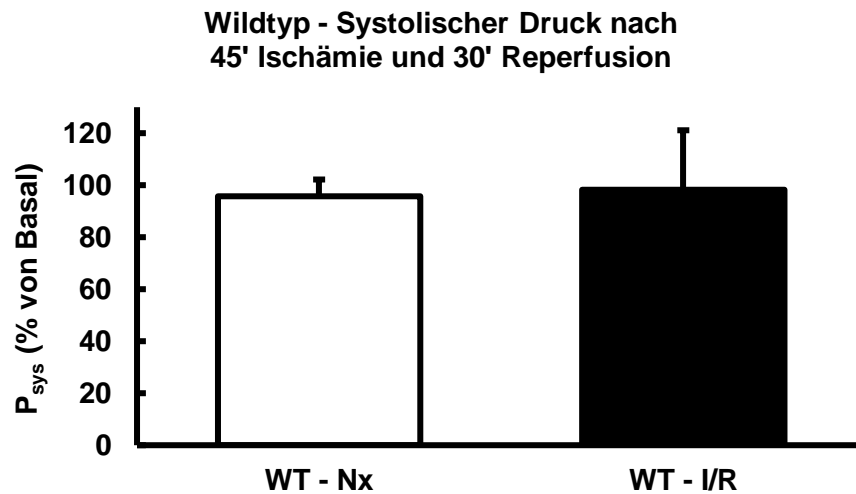


Abbildung 4.4.1-2: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen des systolischen Drucks bei den Wildtyp-Mäusen nach einer Ischämiedauer von 45 Minuten und 30 Minuten Reperfusion. Die Werte beziehen sich auf den normierten entwickelten Ausgangsdruck in Prozent, $p > 0,05$.

Die transgenen Mäuse mit der JDP2-Expression zeigten in den ersten Minuten der Reperfusion einen signifikanten Abfall des systolischen Druckes, $p < 0,05$, mit anschließender Erholung. Erst ab der fünften Minute war der Unterschied nicht mehr signifikant und überstieg nach 15 Minuten den Druck der Versuchsherzen ohne Ischämie (Nx). Nach 30 Minuten Reperfusion bewegte sich der systolische Druck der I/R-Reihe auf das Niveau der Nx-Versuchsgruppe.

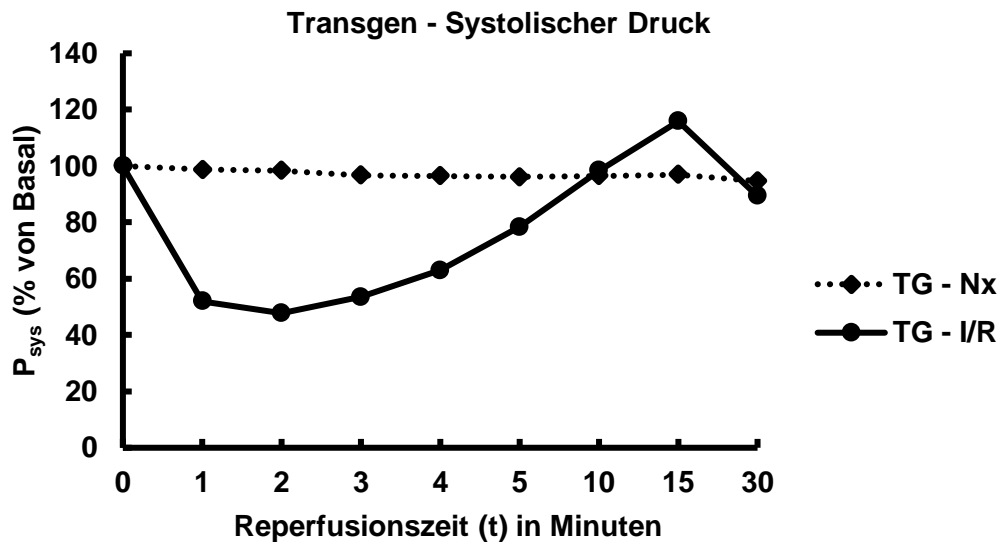


Abbildung 4.4.1-3: Darstellung der Mittelwerte des linksventrikulär systolischen Drucks bei den transgenen Mäusen während der 30-minütigen Reperfusion nach einer Ischämiedauer von 45 Minuten. Die Werte beziehen sich auf den normierten entwickelten Ausgangsdruck in Prozent.

Nach Beendigung der Reperfusion war bei den transgenen Mäusen der systolische Druck der Gruppe mit Ischämie ähnlich hoch wie der der Kontrollgruppe. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied, $p > 0,05$.

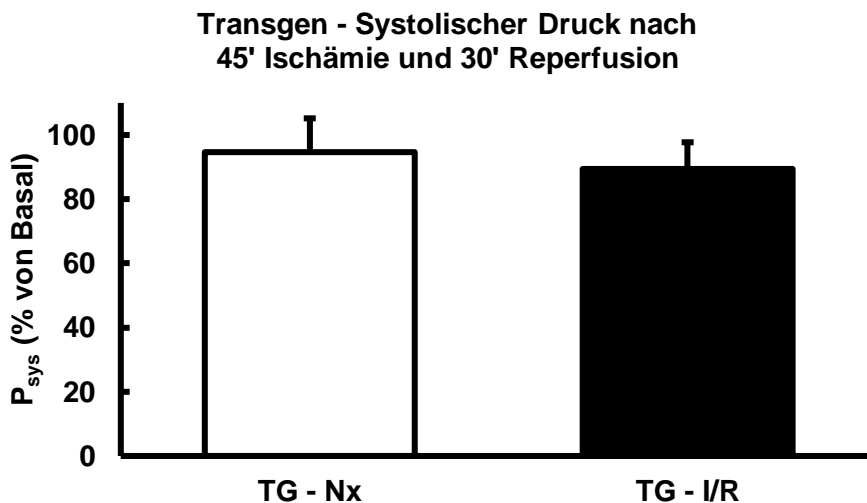


Abbildung 4.4.1-4: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen des systolischen Drucks bei den transgenen Mäusen nach einer Ischämiedauer von 45 Minuten und 30 Minuten Reperfusion. Die Werte beziehen sich auf den normierten entwickelten Ausgangsdruck in Prozent, $p > 0,05$.

4.4.2 Untersuchung des diastolischen Drucks

Im Gegensatz zum systolischen Druck war bei den nicht-transgenen Mäusen (WT) der diastolische Druck bei der Gruppe mit Ischämie (I/R) während der kompletten Reperfusion signifikant erhöht, $p < 0,05$. Ab der vierten Minute senkte sich der diastolische Druck der I/R-Gruppe.

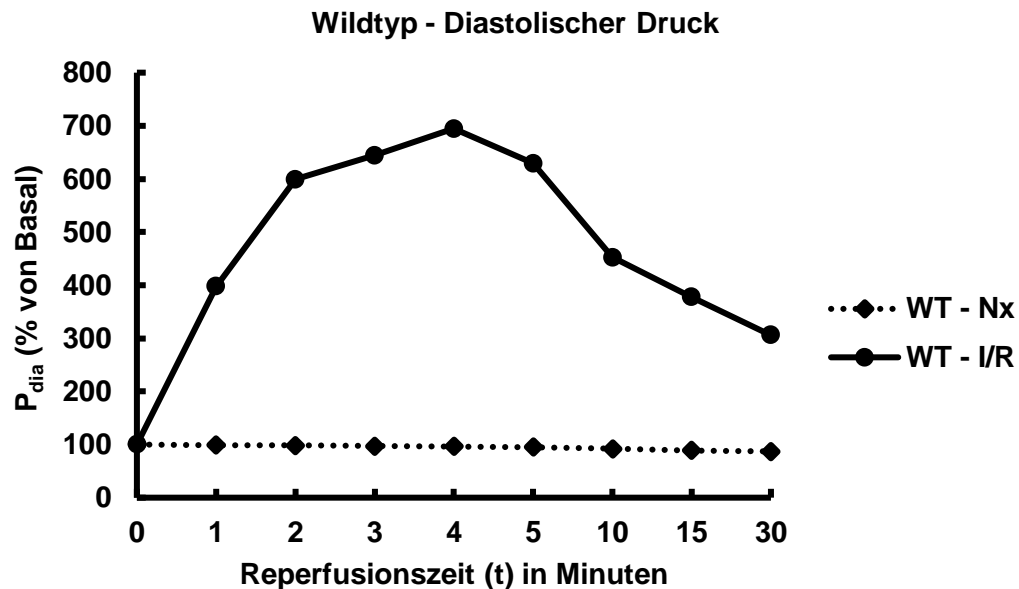


Abbildung 4.4.2-1: Darstellung der Mittelwerte des linksventrikulär diastolischen Drucks bei den Wildtyp-Mäusen während der 30-minütigen Reperfusion nach einer Ischämiedauer von 45 Minuten. Die Werte beziehen sich auf den normierten entwickelten Ausgangsdruck in Prozent.

In den letzten 26 Minuten der Reperfusion senkte sich der enddiastolische Druck der WT-Mäuse, mit der Tendenz, sich an das Druckniveau der Gruppe ohne Ischämie (Nx) anzugleichen. Bei Versuchsende war der diastolische Druck der I/R-Gruppe signifikant erhöht, $*=p < 0,05$.

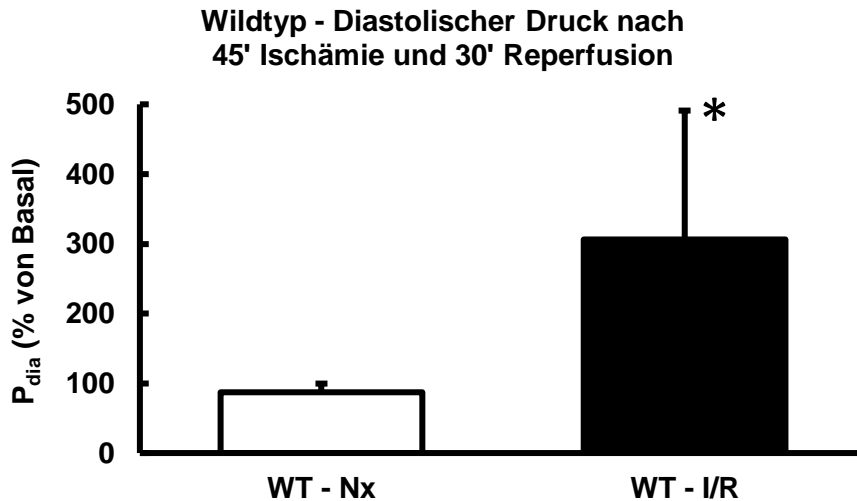


Abbildung 4.4.2-2: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen des diastolischen Drucks bei den Wildtyp-Mäusen nach einer Ischämiedauer von 45 Minuten und 30 Minuten Reperfusion. Die Werte beziehen sich auf den normierten entwickelten Ausgangsdruck in Prozent, *= $p < 0,05$.

Bei den Versuchsherzen der transgenen Mäuse war der enddiastolische Druck während der Reperfusion ebenfalls erhöht. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe zeigten sich jedoch nur in den ersten fünf Minuten. Der diastolische Druck der I/R-Gruppe glich sich dem der Nx-Gruppe an.

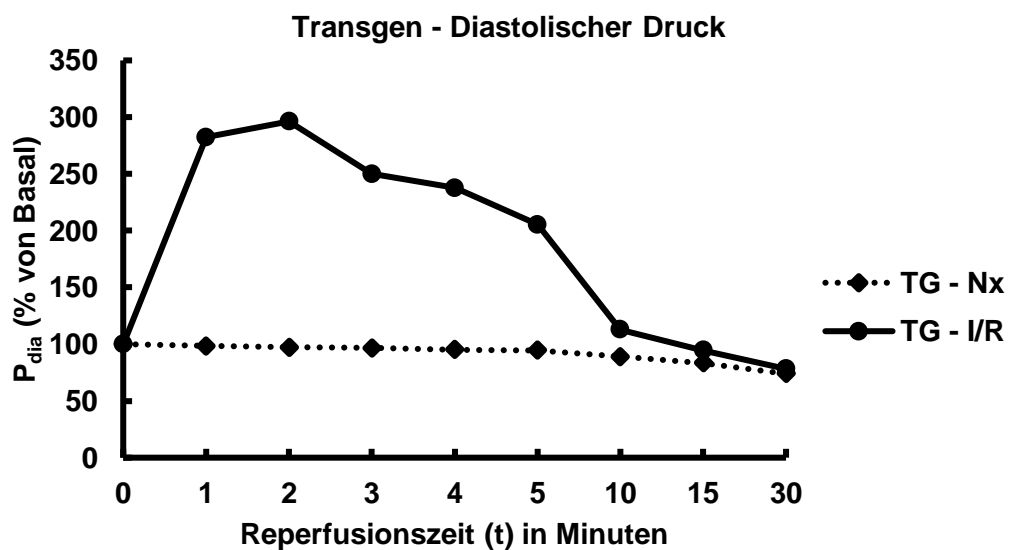


Abbildung 4.4.2-3: Darstellung der Mittelwerte des linksventrikulär diastolischen Drucks bei den transgenen Mäusen während der 30-

minütigen Reperfusion nach einer Ischämiedauer von 45 Minuten. Die Werte beziehen sich auf den normierten entwickelten Ausgangsdruck in Prozent.

Am Ende der Reperfusion war der diastolische Druck der I/R-Gruppe leicht erhöht, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant, $p > 0,05$.

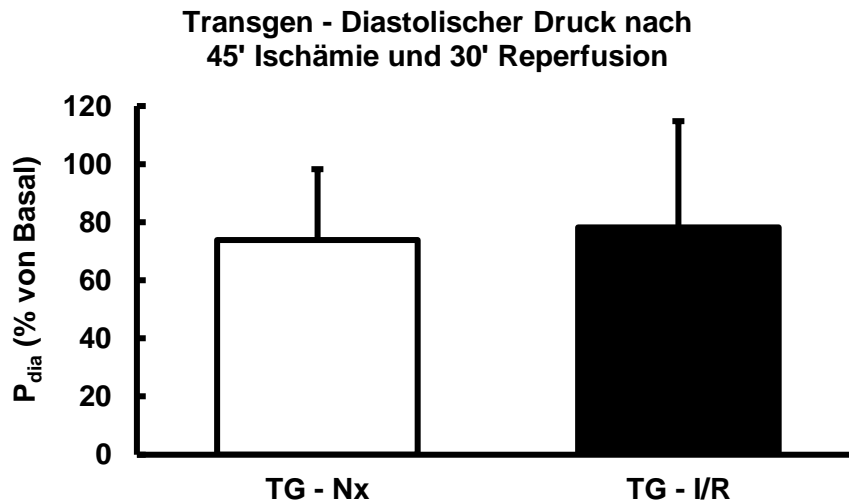


Abbildung 4.4.2-4: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen des diastolischen Drucks bei den transgenen Mäusen nach einer Ischämiedauer von 45 Minuten und 30 Minuten Reperfusion. Die Werte beziehen sich auf den normierten entwickelten Ausgangsdruck in Prozent, $p > 0,05$.

4.4.3 Untersuchung des ventrikulär entwickelten Druckanstiegs

Der linksventrikulär entwickelte Druck (LVDP) der I/R-Gruppe war während der gesamten 30 Minuten Reperfusion bei den nicht-transgenen Mäusen erniedrigt. Nach zehn Minuten Reperfusion zeigte sich dieser sogar signifikant erniedrigt, $p < 0,05$. Der LVDP wies bei den letzten beiden Messpunkten eine Erholung auf und war im Vergleich zu den Nx-Versuchsherzen nicht mehr signifikant erniedrigt.

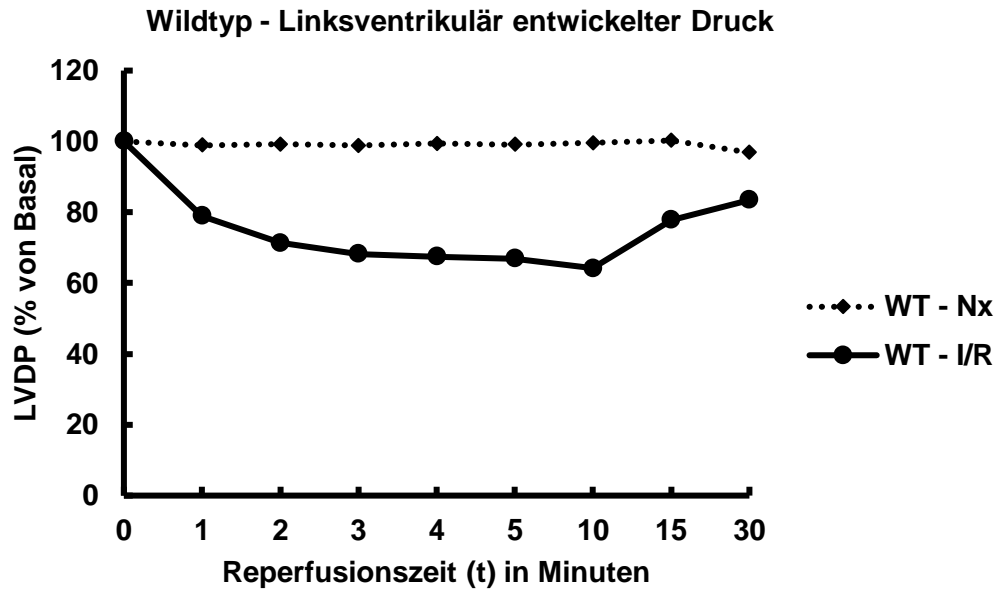


Abbildung 4.4.3-1: Darstellung der Mittelwerte des linksventrikulär entwickelten Druckanstiegs bei den Wildtyp-Mäusen während der 30-minütigen Reperfusion nach einer Ischämiedauer von 45 Minuten. Die Werte beziehen sich auf den normierten entwickelten Ausgangsdruck in Prozent.

Nach Beendigung der Reperfusion zeigte sich bei der Ischämie-Gruppe ein erniedrigter LVDP. Die Veränderung war im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant, $p > 0,05$.

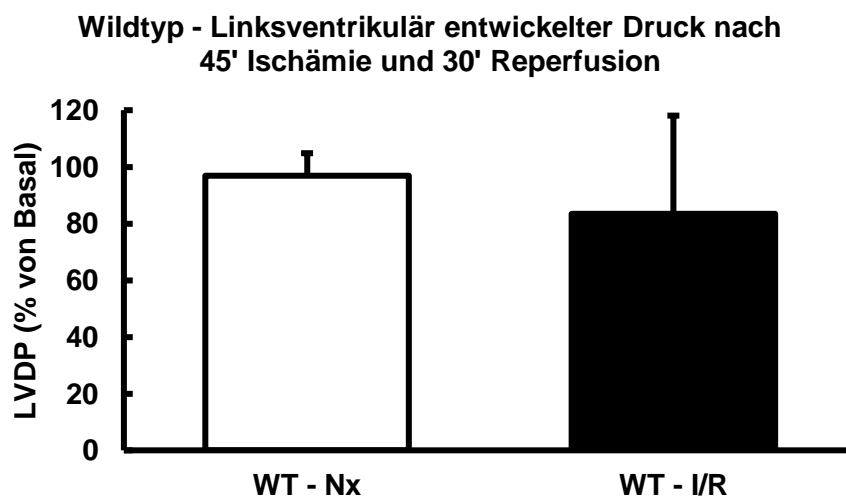


Abbildung 4.4.3-2: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen des entwickelten Druckanstiegs bei den Wildtyp-Mäusen nach einer Ischämiedauer von 45 Minuten und 30 Minuten Reperfusion. Die Werte

beziehen sich auf den normierten entwickelten Ausgangsdruck in Prozent, $p > 0,05$.

Bei den transgenen JDP2-Mäusen fiel der LVDP während der Reperfusion auf unter 15 %. Die Erholung setzte nach zwei Minuten ein und war in den ersten fünf Minuten signifikant erniedrigt, $p < 0,05$. Nach 15 Minuten Reperfusion überstieg der LVDP der I/R-Gruppe den der Nx-Gruppe, fiel nach 30 Minuten aber wieder unter den der Kontrollgruppe.

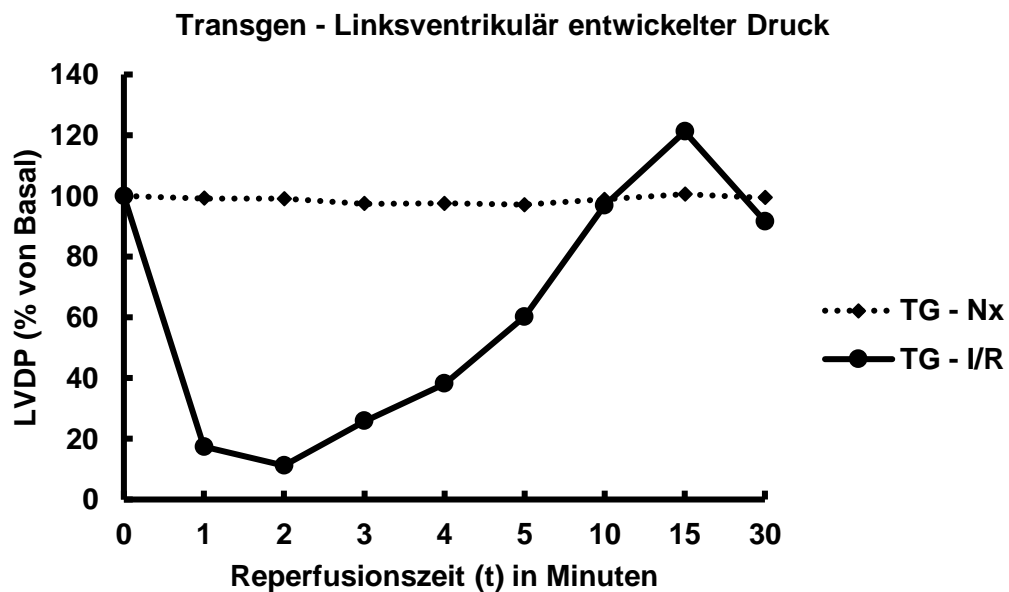


Abbildung 4.4.3-3: Darstellung der Mittelwerte des linksventrikulär entwickelten Druckanstiegs bei den transgenen Mäusen während der 30-minütigen Reperfusion nach einer Ischämiedauer von 45 Minuten. Die Werte beziehen sich auf den normierten entwickelten Ausgangsdruck in Prozent.

Nach Ende der 30 Minuten Reperfusion war bei den transgenen Versuchsherzen der LVDP der I/R-Gruppe leicht erniedrigt. Diese Veränderung war nicht signifikant, $p > 0,05$.

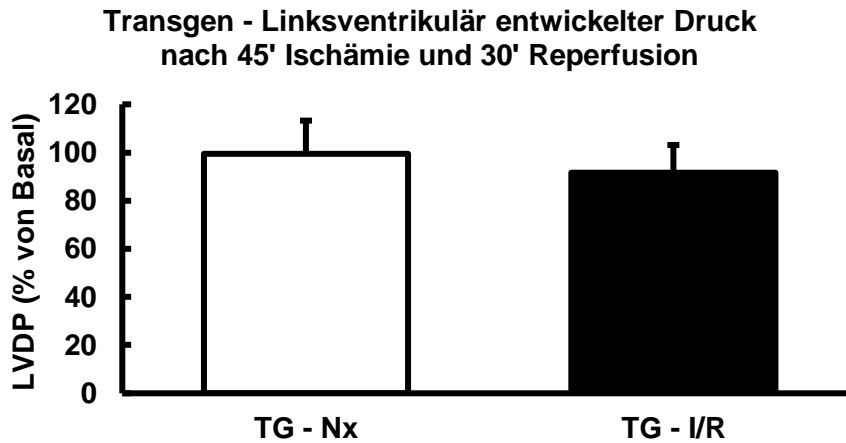


Abbildung 4.4.3-4: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen des entwickelten Druckanstiegs bei den transgenen Mäusen nach einer Ischämiedauer von 45 Minuten und 30 Minuten Reperfusion. Die Werte beziehen sich auf den normierten entwickelten Ausgangsdruck in Prozent, $p > 0,05$.

4.5 Veränderung des Transkriptionsmusters

Die Versuchsherzen der Mäuse aus dem Langendorff-Modell wurden anschließend mittels rt-PCR auf die Genexpression von Arginase 1, Gata4 und Mef2c untersucht. Die beiden Versuchsgruppen, nicht-transgene (WT) und transgene (TG) JDP2-Mäuse, wurden mit einer jeweiligen Kontrolle verglichen, die keiner Ischämie ausgesetzt war.

4.5.1 Expression von Arginase 1

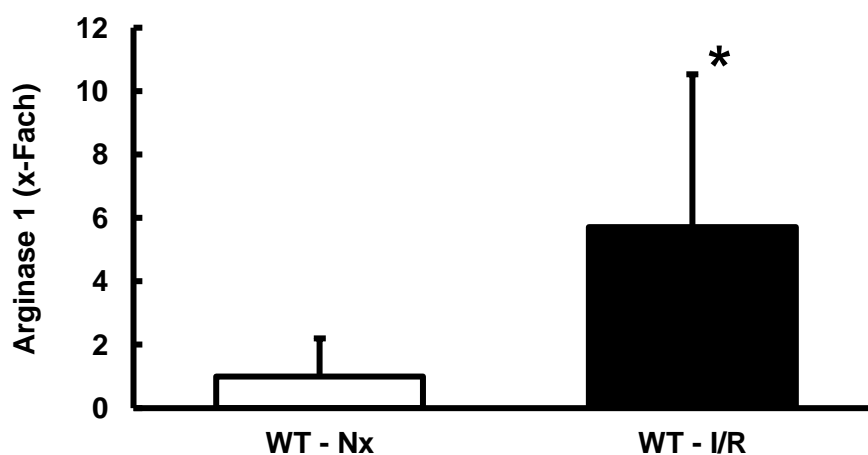


Abbildung 4.5.1-1: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Arginase 1-Expression bei den Wildtyp-Mäusen nach einer Ischämie-

dauer von 45 Minuten und 30 Minuten Reperfusion. Die Werte beziehen sich auf die normierte Expression der Kontrollgruppe in Prozent, $*=p<0,05$.

Bei den nicht-transgenen Mäusen (WT) zeigte sich eine signifikant ($p<0,05$) erhöhte Arginase 1-Expression der Ischämie-Gruppe (I/R) gegenüber der Kontrollgruppe (Nx). Im Vergleich dazu war bei den transgenen JDP2-Mäusen (TG) die Arginase 1-Expression leicht erniedrigt, $p>0,05$.

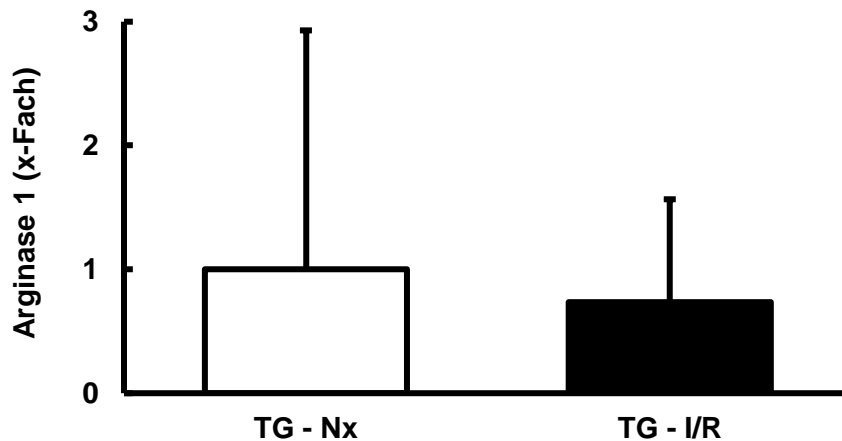


Abbildung 4.5.1-2: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Arginase 1-Expression bei den transgenen Mäusen nach einer Ischämiedauer von 45 Minuten und 30 Minuten Reperfusion. Die Werte beziehen sich auf die normierte Expression der Kontrollgruppe in Prozent, $p>0,05$.

4.5.2 Expression von Gata4

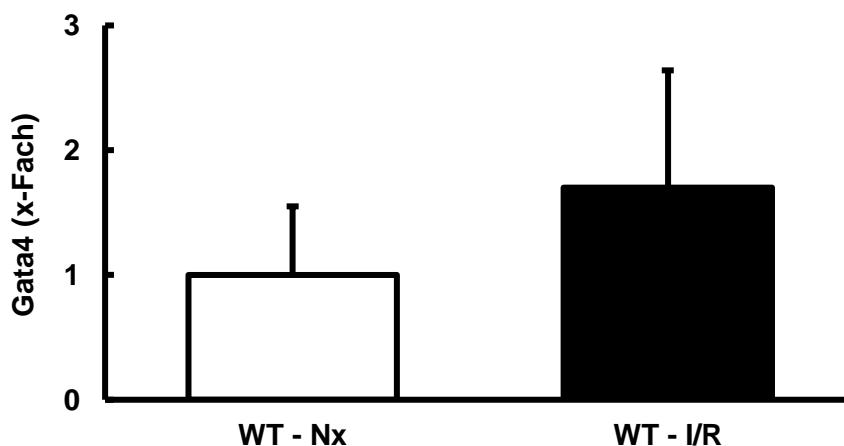


Abbildung 4.5.2-1: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Gata4-Expression bei den Wildtyp-Mäusen nach einer Ischämiedauer

von 45 Minuten und 30 Minuten Reperfusion. Die Werte beziehen sich auf die normierte Expression der Kontrollgruppe in Prozent, $p > 0,05$.

Bei der Betrachtung der Expression von Gata4 war bei den Wildtyp-Versuchsherzen mit Ischämiephase eine Erhöhung erkennbar. Im Gegensatz dazu war die Gata4-Expression bei den transgenen Mäusen signifikant erniedrigt.

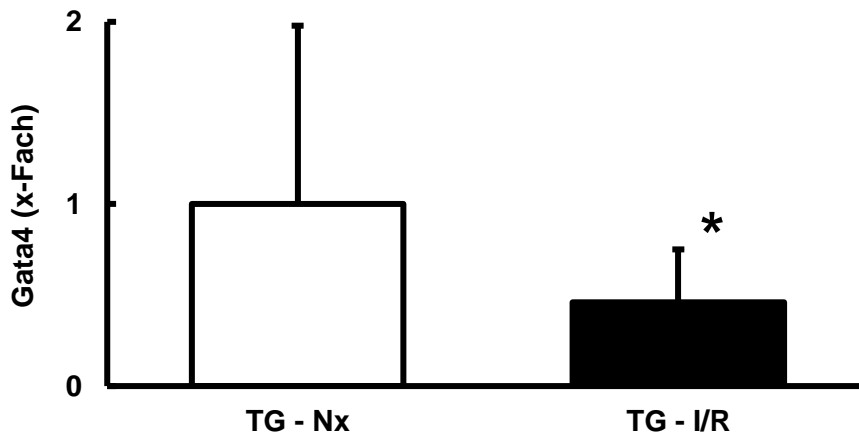


Abbildung 4.5.2-2: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Gata4-Expression bei den transgenen Mäusen nach einer Ischämiedauer von 45 Minuten und 30 Minuten Reperfusion. Die Werte beziehen sich auf die normierte Expression der Kontrollgruppe in Prozent, * $=p < 0,05$.

4.5.3 Expression von Mef2c

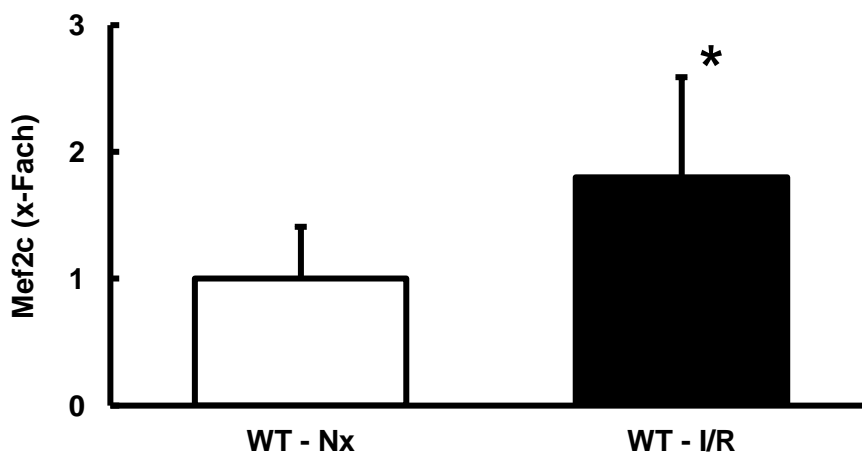


Abbildung 4.5.3-1: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Mef2c-Expression bei den Wildtyp-Mäusen nach einer Ischämiedauer

von 45 Minuten und 30 Minuten Reperfusion. Die Werte beziehen sich auf die normierte Expression der Kontrollgruppe in Prozent, *=p<0,05.

Bei den Wildtyp-Mäusen zeigte sich bei der I/R-Gruppe ein signifikant ($p<0,05$) erhöhter Unterschied der Mef2c-Expression gegenüber der Kontrollgruppe. Bei den transgenen JDP2-Mäusen war die Expression des gleichen Transkriptionsfaktors erniedrigt, $p>0,05$.

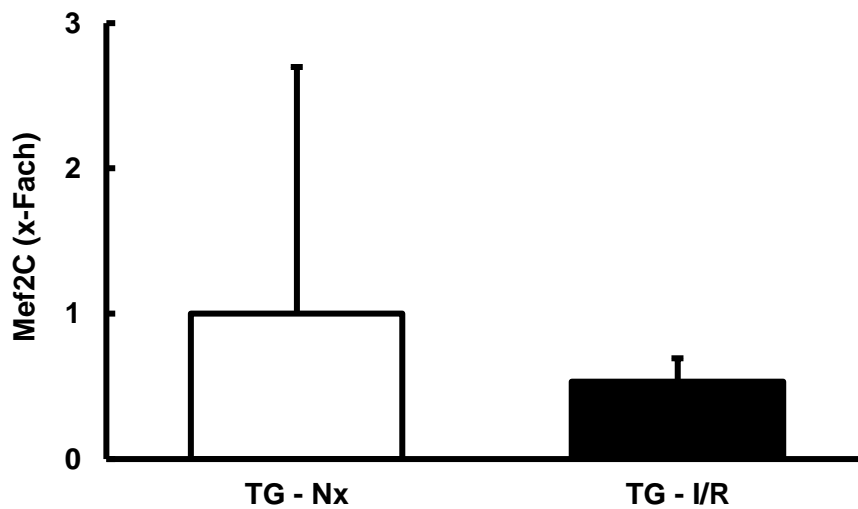


Abbildung 4.5.3-2: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Mef2c-Expression bei den transgenen Mäusen nach einer Ischämiedauer von 45 Minuten und 30 Minuten Reperfusion. Die Werte beziehen sich auf die normierte Expression der Kontrollgruppe in Prozent, $p>0,05$.

5 Diskussion

5.1 Hauptbefunde

Die Postkonditionierung stellt ein bekanntes und wirksames Manöver dar, um den Myokardschaden nach einem stattgefundenen Ischämieereignis positiv zu beeinflussen. Diese Arbeit verfolgt das Ziel, den Einfluss der Ischämiedauer auf die schützende Wirkung der Postkonditionierung zu untersuchen.

Die Beurteilung der Herzfunktionen basieren auf den Messungen im Langendorff-Modell. Verschiedene Herzparameter wurden bei der nicht-ischämischen Kontrollgruppe (Ktr), den Versuchsgruppen mit kurzer und langer Ischämiedauer (I/R) sowie Gruppen mit den jeweils gleichen Ischämiedauern und zusätzlicher Postkonditionierung (IPoC) ermittelt. Im Anschluss ließen sich Beeinflussungen des frühen Postinfarkt-Remodelings auf transkriptioneller Ebene in der real-time Polymerase-Kettenreaktion detektieren.

Hauptbefunde:

Es wird bewiesen, dass die Dauer der Ischämie Einfluss auf die protektive Wirkung der Postkonditionierung nimmt. Bei kurzen Ischämiedauern von 15 Minuten zeigen sich Erholungen der Herzfunktionen während der dreistündigen Reperfusionphase bei den konditionierten Versuchsherzen. Im Gegensatz dazu können keine positiven Effekte der Postkonditionierung bei den Gruppen mit einer langen Ischämiedauer von 60 Minuten nachgewiesen werden.

Der LVDP, welcher als Maß für die kardiale Erholung angesehen werden kann, war bei der Gruppe mit kurzer Ischämiedauer ohne Postkonditionierung signifikant erniedrigt, während die konditionierte Gruppe mit der gleichen Ischämiedauer einen nahezu unveränderten LVDP wie die Kontrollgruppe entwickeln konnte (Abbildung 4.1.3.1-2). Das Frequenz-Druck-Produkt (RPP), welches das kardiale Arbeitsvermögen und den Energiebedarf widerspiegelt, war bei den ischämischen Versuchsherzen ebenfalls signifikant erniedrigt. Die postkonditionierten Versuchsherzen zeigten dagegen einen nahezu unverändert gleichen RPP-Wert (Abbildung 4.1.4.1-2). Auch bei der Betrachtung des LVeDP, welcher als Maß für den irreversiblen Myokardschaden dient, war bei den Versuchsherzen mit kurzer Ischämiedauer ein Unterschied festzustellen. Die nicht-konditionierte Versuchsgruppe zeigte eine Erhöhung des LVeDP. Diese war zwar nicht signifikant, aber im Gegensatz dazu entwickelte die konditionierte Gruppe einen ähnlichen diastolischen Druck wie die nicht-ischämische Kontrollgruppe (Abbildung 4.1.2.1-3). All diese Ergebnisse bekräftigen die These der kardioprotektiven Wirkung der Postkonditionierung (Zhao et al., 2003).

Im Gegensatz dazu konnte sich der positive Einfluss der Postkonditionierung bei den Gruppen mit einer langen Ischämiephase von 60 Minuten in den Herzfunktionen nicht behaupten. Die Ergebnisse zeigen, dass der Myokardschaden nach 60 Minuten so ausgeprägt sein muss, dass positive Effekte auf die Erholung des Herzmuskels ausbleiben. Der LVDP (Abbildung 4.1.3.2-2) und das RPP (Abbildung 4.1.4.2-2) waren sowohl bei den konditionierten als auch nicht konditionierten Versuchsherzen signifikant erniedrigt. Passend dazu war der LVEDP jeweils signifikant erhöht (Abbildung 4.1.2.2-3). Die Herzrate veränderte sich unabhängig von der Ischämiedauer oder dem Einfluss der Postkonditionierung nicht (Abbildung 4.1.1.1-2 und Abbildung 4.1.1.2-2). Das Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht, als Zeichen der Ödembildung, zeigte indes signifikante Erhöhungen bei den Versuchsgruppen mit einer langen Ischämiedauer, im Gegensatz zu denen mit einer kurzen (Abbildung 4.1.5-1). Die Postkonditionierung hatte dabei keine Auswirkungen.

Im Anschluss an die Messungen im Langendorff-Modell wurden in dieser Arbeit Beeinflussungen des Expressionsverhalten von verschiedenen Transkriptionsfaktoren und Enzymen mit Hilfe der real-time Polymerase-Kettenreaktion detektiert.

5.2 Beeinflussung des Expressionsverhaltens von Mef2c

Mef2c ist ein Transkriptionsfaktor, der dafür bekannt ist, eine entscheidende Rolle bei der Kardiogenese einzunehmen. Er gehört zur Familie der MADS-Transkriptionsfaktoren, welche nach ihren erstentdeckten Komponenten *MCM1* (Hefe), *Agamous* und *Deficiens* (Pflanzen) und *Serum response-Gen* (Mensch) benannt wurden.

Säugetiere exprimieren vier Versionen Mef2a, Mef2b, Mef2c und Mef2d. Der N-Terminus der Mef2-Proteine ist mit der MADS-Domäne stark konserviert und besteht aus 57 Aminosäuren. Der C-terminale Bereich unterscheidet sich dagegen bei den vier Mef2-Mitgliedern und besteht aus 29 Aminosäuren (Black & Olson, 1998). Zusammen haben der MADS- und Mef2-Komplex eine große Bedeutung bei der Bindung an AT-reichen Zielsequenzen der DNA. Mef2 wird dabei sowohl in embryologischen als auch in erwachsenen Geweben exprimiert und kommt in verschiedenen Zelltypen vor. Mef2c als ein Mitglied der Mef2-Familie wird während der Kardiogenese bereits in den Vorläuferzellen des Herzschauchs exprimiert und nimmt dort eine wichtige Rolle ein.

Lin et al. konnten 1997 an Knockout-Mäusen zeigen, dass die Schleifendrehung des anterioren Aortenbereiches ohne Mef2c-Expression ausbleibt. Dieses „*looping*“ ist die Grundlage für die Entwicklung des rechten Ventrikels. Die Deletion von Mef2c aus dem

Erbgut der Mäuse führt somit zum Absterben des Embryos nach wenigen Tagen aufgrund der letalen Herzentwicklung (Lin, 1997). In der Literatur wird, neben der Rolle in der frühen Entwicklung, auch ein Einfluss von Mef2c in der Zellregulierung von adulten Geweben für möglich gehalten. Dies impliziert den Einfluss der Mef2-Proteine bei der Apoptose, der Proliferation, der Differenzierung und dem Zellüberleben. Der Transkriptionsfaktor ist bei Regulierungen der Expressionen einer Reihe von kardialen Struktur- und kontraktile Proteinen beteiligt (Potthoff & Olson, 2007).

In Rahmen der Versuche zu dieser Arbeit konnte ein verändertes Expressionsverhalten von Mef2c bei den verschiedenen Versuchsgruppen detektiert werden (Abbildung 4.2.1-1). Eine vermehrte Expression fand sich dabei bei den Gruppen, welche eine Postkonditionierung erhielten. Die Dauer der vorangegangenen Ischämie hatte dabei keine Auswirkungen auf das Expressionsverhalten. Die Mef2c-Expressionen waren sowohl nach einer kurzen als auch nach einer langen Ischämiedauer bei den Herzen mit Postkonditionierung jeweils signifikant erhöht. Eine Hochregulierung der Mef2c-Expression bei den nicht konditionierten Versuchsherzen blieb dagegen aus.

In der Literatur findet sich nur wenig über das Expressionsverhalten von Mef2. Cripps et al. beschrieben jedoch einen positiven Feedback-Mechanismus der Mef2-Expression an Tauffliegen. Demnach führt die Aktivität von Mef2 zu einer vermehrten Mef2-Expression (Cripps, Lovato, & Olson, 2004). Für diese Aktivierung sind zwei Signalwege bekannt. Die *extracellular-signal regulated kinase 5* (ERK5) ist eine *mitogen-activated protein-kinase* (MAP), die durch die Phosphorylierung der transkriptionsaktivierenden Domäne von Mef2 deren Aktivität steigert (Yang, Ornatsky, McDermott, Cruz, & Prody, 1998). ERK5 besitzt neben einer ähnlichen Struktur auch vergleichbare funktionelle Eigenschaften wie ERK1/2 (Nishimoto & Nishida, 2006). ERK1/2 gilt als ein Signalweg der Postkonditionierung (Vinten-Johansen et al., 2005) und könnte daher eine mögliche Erklärung für die vermehrte Aktivität und somit Expression von Mef2c darstellen. Darüber hinaus kann ERK5 als ein weiterer Signalweg der Postkonditionierung in Frage kommen. Neben dem ERK5-Signalweg zur Aktivierung von Mef2 ist zudem eine Calcium-abhängige Aktivierung von Mef2 beschrieben. Calcium-abhängige Kinasen, wie die Proteinkinase D und die Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase (CaMKs), phosphorylieren Histon-Deacetylasen der Klasse II (HDAC), wodurch deren Dissoziation von Mef2 gefördert wird, sodass der Transkriptionsfaktor wieder an seine Zielgene binden kann. Wenn Mef2 durch eine hohe Calciumkonzentration aktiviert und somit die Expression gefördert werden soll, stellt sich die Frage, warum das Expressionsverhalten nicht bei den ischämischen Versuchsgruppen ohne Postkonditionierung erhöht ist, da in diesen Zellen hohe Calciumkonzentrationen zu

erwarten sind. Über die Rolle von Mef2c während des Remodelings ist bisher wenig bekannt. Es ist aber durchaus möglich, dass Mef2c das frühe Postinfarkt-Remodeling beeinflussen kann.

5.3 Beeinflussung des Expressionsverhaltens von Gata4

Die Transkriptionsfaktoren der Gata-Familie zählen zu den Zinkfingerproteinen, welche charakteristisch ein Zinkion in der Polypeptidkette enthalten und sich so an DNA oder RNA spezifisch binden können. Die Gata-Familie erkennt die DNA-Sequenz „GATA“ und kann durch Bindung an die passenden Promoter diese aktivieren. Gata4, welches auf Chromosom 8p23.1-p22 lokalisiert ist, ist ein Mitglied der Gata-Familie und greift durch Aktivierung der Transkription von bestimmten Genbereichen regulatorisch in biologische Funktionen ein.

Erstmals entdeckt wurde es als ein wichtiger Regulator für die Kardiogenese (Kelley, Blumberg, Zon, & Evans, 1993). Es ist beteiligt an der Anlage des Herzschlauchs sowie der Reifung und Septierung des Herzens (Bruneau, 2002). Sowohl in den Vorhöfen als auch in den Kammern konnte die Expression von Gata4 bei der Herzentwicklung nachgewiesen werden. In adulten Kardiomyozyten wird Gata4 ebenfalls exprimiert und ist an der Aktivierung weiterer Promoter beteiligt. Dadurch kann der Transkriptionsfaktor auch bei Belastungen oder Stress regulatorisch in die Zellantwort eingreifen.

Ein beschriebener Effekt ist die Beteiligung an der Entwicklung der Herzhypertrophie. An Gata4-transgenen Mäusen konnte ein signifikantes Herzwachstum nachgewiesen werden, was eine Assoziation von Gata4 mit dem Prozess der Hypertrophie vermuten lässt (Liang et al., 2001). Gata4 ist zudem an der Regulierung von antiapoptotischen Signalwegen beteiligt. Kobayashi et al. zeigten, dass Gata4 die Genexpression des antiapoptotischen Regulatorproteins Bcl-2 positiv beeinflusst (Kobayashi, 2006). Des Weiteren ist der Transkriptionsfaktor ebenfalls an dem Calcineurin/Endothelin-1 vermittelten antiapoptotischen Signalweg beteiligt (Kakita et al., 2001).

Da Gata4 auf Belastungen mit einer veränderten Aktivität reagiert und zudem Einfluss auf das Zellüberleben nimmt, war auch ein verändertes Expressionsverhalten in dieser Arbeit zu erwarten. Die Ergebnisse zeigen, dass die postkonditionierten Versuchsherzen, unabhängig von der Dauer der Ischämie, signifikant verminderte Expressionen von Gata4 aufweisen (Abbildung 4.2.2-1). Die Gruppen, welche lediglich die Ischämie und Reperfusion durchliefen, zeigten kein erniedrigtes, sondern ein ähnliches Expressionsverhalten wie die Kontrollgruppe.

Die Gata4-Expression könnte dadurch erklärt werden, dass durch die Postkonditionierung eine verminderte Expression resultiert, die der Hypertrophie-Entwicklung und der Apoptose entgegenwirken könnte. Allerdings stehen diese Daten im Widerspruch zu einer Arbeit von Suzuki et al., die ein vermindertes Expressionsverhalten von Gata4 bei Rattenherzen zeigten, welche eine 30-minütige Ischämie und anschließend zwei Stunden Reperfusion durchliefen. Im gleichen Versuch erhielt eine weitere Versuchsgruppe eine Präkonditionierung. Vier Zyklen von wechselnder 5-minütiger Ischämie, gefolgt von 10-minütiger Reperfusion, führte zu einer vermehrten Expression von Gata4 (Suzuki, Nagase, Day, & Das, 2004). Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass der Signalweg zur Aktivierung von Gata4 bei der Präkonditionierung ein anderer ist als bei der Postkonditionierung. Bei einem weiteren Versuch von Suzuki et al. führte die Anwesenheit von NO zu einer verminderten Gata-Aktivität und Gata4-Expression (Suzuki et al., 2004). Dies könnte ein Hinweis sein, dass durch die Postkonditionierung NO entsteht, welches zu einer verminderten Gata4-Expression bei den postkonditionierten Herzen führen kann.

5.4 Beeinflussung des Expressionsverhaltens von BNP

Das B-Typ Natriuretische Peptid (BNP) wurde erstmals 1988 von Sudoh et al. im Gehirn von Schweinen entdeckt und trägt daher auch den Namen „*brian natriuretic peptid*“ (Sudoh, Kangawa, Minamino, & Matsuo, 1988). Es besitzt eine ähnliche Struktur wie das Atriale Natriuretische Peptid (ANP), auf welches de Bold bereits 1981 in einem Extrakt aus Herzvorhofgewebe von Ratten aufmerksam wurde und wenig später auch extrahieren konnte (de Bold, Borenstein, Veress, & Sonnenberg, 1981).

Während ANP vorrangig in den Herzvorhöfen gebildet wird, findet die Synthese von BNP hauptsächlich in den Kardiomyozyten des Ventrikelmuskels statt (Yasue et al., 1994). Der stärkste Stimulus für die BNP-Synthese ist die Dehnung des Myokards und dessen Kardiomyozyten. Daneben führt auch eine neurohumorale Aktivierung und Hypoxie zu einer Stimulation der Sekretion von BNP (Hall, 2005). Das Peptid führt zu einer Reihe von biologischen Effekten, die die Herzarbeit erleichtern. Neben der Förderung der Diurese durch Anregung der Natriurese, wirkt BNP durch Relaxation der Gefäßmuskulatur vasodilatierend. BNP bindet an den A-Rezeptor der membranständigen Guanylatzyklase und aktiviert so die Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP), was zu einer Abnahme der intrazellulären Calciumkonzentration führt (Kuhn, 2004). Konsekutiv führt dies zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur und somit zur Senkung der Herzvorlast und -nachlast.

In einer Arbeit von Burley und Baxter konnte gezeigt werden, dass BNP eine schützende Wirkung gegen den Reperfusionsschaden nach einer Ischämie induzieren kann. Durch die Beteiligung an der Öffnung des ATP-abhängigen Kaliumkanals und an der endogenen Aktivierung von NO-Synthasen ist BNP maßgeblich in die Kardioprotektion involviert (Burley & Baxter, 2007). Breivik et al. konnten bereits eine vermehrte BNP-Expression bei postkonditionierten Herzen gegenüber ischämischen Kontrollen feststellen (Breivik et al., 2015).

Den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass es auch in der hier vorliegenden Studie zu einer vermehrten BNP-Expression bei den konditionierten Versuchsherzen kam (Abbildung 4.2.3-1). Bei der IPoC-Gruppe mit den kurzen Ischämiedauern zeigte sich ein signifikant vermehrtes Expressionsverhalten. Dieses war zwar auch bei den konditionierten Herzen mit der langen Ischämiedauer erhöht, allerdings nicht signifikant. Im Langendorff-Modell erfuhr die IPoC-Gruppe mit kurzer Ischämiedauer als einzige eine signifikante Erholung nach der Ischämiebelastung. Somit korrelieren die positiven Effekte der Postkonditionierung mit der BNP-Expression und zeigen, dass die Dauer der Ischämie Einfluss auf die protektive Wirkung der Postkonditionierung nimmt.

5.5 Beeinflussung des Expressionsverhaltens von Serca2a

Die sarkoendoplasmatische Retikulum Ca_{2+} -ATPase (Serca) ist für den intakten Calciumhaushalt und somit für eine normale Zellfunktion der Kardiomyozyten unverzichtbar. Es sind drei Isoformen, Serca1 bis -3, bekannt, welche auf drei unterschiedlichen Genen codiert werden. Durch verschiedenartiges „*Splicing*“ entstehen insgesamt mehr als zehn Subtypen, deren Vorkommen gewebespezifisch ist.

In den Herzmuskelzellen wird primär die Isoform Serca2a exprimiert (Stammers et al., 2015). Serca2a befindet sich in der Membran des sarkoendoplasmatischen Retikulums (SR), welches in der Zelle wichtige Funktionen wie die Calcium-Freisetzung, -Wiederaufnahme und -Speicherung erfüllt. Für die Relaxation nach der Kontraktion ist das Absenken der intrazellulären Calciumkonzentration eine Grundvoraussetzung. Unter Energieverbrauch von ATP pumpt Serca2a die Ca_{2+} -Ionen aktiv gegen einen Konzentrationsgradienten zurück in das SR und ist so an der Regulierung der Calciumkonzentrationen sowie an dem Kontraktions- und Relaxations-Zyklus der Zelle beteiligt.

In der vorliegenden Studie konnte eine vermehrte Expression der kardioprotektiven Serca2a bei den postkonditionierten Versuchsherzen detektiert werden (Abbildung

4.2.4-1). Allerdings wiesen nur die konditionierten Herzen mit einer kurzen Ischämiedauer eine signifikant vermehrte Expression auf. Diese Gruppe zeigte auch als einzige im Langendorff-Modell eine Erholung des LVDP. Bei der gleichen Ischämiedauer ohne Postkonditionierung zeigte sich dagegen eine verminderte Serca2a-Expression und keine Erholung des LVDPs. Diese Ergebnisse sprechen, wie in der Literatur beschrieben, für eine verbesserte Kontraktilität der Kardiomyozyten bei erhöhter Serca2a-Expression.

In einer Studie am isolierten Herzen untersuchten Baker et al. die Effekte von Serca2a auf die Kontraktilität. An transgenen Mäusen mit einer Überexpression von Serca2a konnte eine erhöhte Kontraktionsleistung nachgewiesen werden. Dabei zeichneten sich die transgenen Mäuse durch einen erhöhten entwickelten Kontraktionsdruck und eine verbesserte Relaxation aufgrund eines erhöhten Calciumtransports aus (Baker et al., 1998). Ein verbesserter Calciumtransport durch eine Serca2a-Überexpression führte auch bei Del Monte et al. in einem Ischämie-/Reperfusion-Versuch zu einer verbesserten kontraktilen Funktion und reduzierte zudem das Auftreten von Arrhythmien (del Monte et al., 2004).

Der positive Effekt der Postkonditionierung in dieser Studie kann durch einen verbesserten Calciumtransport mit konsekutiv verbesserter Kontraktilität erklärt werden. Durch eine Angleichung an normale Calciumkonzentrationen im Zytosol könnte zudem der Reperfusionsschaden durch erhöhte Calciumkonzentrationen mit Folge einer Hyperkontraktur minimiert werden (Piper, Abdallah, & Schäfer, 2004). Nach langen Ischämiedauern blieb der schützende Effekt allerdings aus. Sowohl bei der IPoC- als auch bei der I/R-Versuchsgruppe trat nach 60 Minuten Ischämie keine Erholung des LVDPs auf. Zwar war auch hier bei der konditionierten Gruppe eine vermehrte Serca2a-Expression zu erkennen, diese war jedoch nicht signifikant. Zu der schützenden Wirkung der Postkonditionierung kann, den Ergebnissen nach, eine vermehrte Serca2a-Expression beitragen, welche allerdings von der Ischämiedauer abhängig und nur bei der kurzen Ischämiedauer wirksam ist.

5.6 Beeinflussung des Expressionsverhaltens von Arginase 1

Das Enzym Arginase 1 katalysiert im Harnstoffzyklus die Spaltung der Aminosäure L-Arginin zu Harnstoff und Ornithin. Dabei konkurriert es mit Stickstoffmonoxid (NO)-Synthasen um das proteinogene Substrat (Schlüter, Schulz, & Schreckenberger, 2015). NO-Synthasen kommen in verschiedenen Zellarten vor und bilden den vasodilatierenden Botenstoff NO (Durante, Johnson, & Johnson, 2007).

Bereits 1980 forschten Furchgott et al. an dem „endothelium derived relaxation factor“ (EDRF) (Furchgott & Zawadzki, 1980), welcher sieben Jahre später als NO identifiziert werden konnte (Ignarro, Buga, Wood, Byrns, & Chaudhuri, 1987). Die endotheliale NO-Synthase (eNOS) stellt eine von drei Isoformen dar. In den Endothelzellen der Gefäße bildet sie NO und bewirkt über den Signalweg von cGMP eine Relaxation der Gefäßmuskelzellen, wodurch es zur Vasodilatation kommt. NO greift so regulatorisch auf den Gefäßtonus und Blutdruck ein. Neben der herzentlastenden Senkung der Vorlast und Nachlast verbessert NO auch die Blutversorgung des Myokards durch Dilatation der Koronargefäße. NO besitzt zudem weitere kardioprotektive Eigenschaften. Zu diesen gehören die Inhibition der Thrombozytenaggregation und Leukozytenadhäsion sowie die Prävention von unkontrollierter Proliferation an glatten Gefäßmuskelzellen (Naseem, 2005). Aufgrund der Konkurrenzsituation um Arginin ist Arginase 1 an der Regulierung der NO-Produktion beteiligt. Eine vermehrte Arginase 1-Aktivität führt demnach zu einer verminderten Verfügbarkeit der Aminosäure für NO-Synthasen. Sowohl die schwächere Wirkung des NO/cGMP-Signalwegs als auch der induzierte Polyamin-Metabolismus führen zu einer schlechteren Erholung der Herzfunktionen (Schlüter et al., 2015).

In einer Studie an Mäusen suchten Harpster et al. nach transkriptionellen Anpassungen in einem Ischämieversuch. Dabei konnten sie eine Erhöhung der Arginase 1-Expression zu einem frühen Zeitpunkt beobachten (Harpster et al., 2006). Dieses Ergebnis ließ sich auch in der vorliegenden Studie nachweisen (Abbildung 4.2.5-1). Bei den Versuchsgruppen mit Ischämie kam es zu einem gesteigerten Expressionsverhalten gegenüber der Kontrollgruppe. Zwar waren die Ergebnisse nicht signifikant, dennoch zeigte sich eine Erhöhung, die sich mit zunehmender Ischämiedauer steigerte. Die Arginase 1-Expression der postkonditionierten Herzen zeigte dagegen nach der kurzen Ischämiedauer eine signifikante Erniedrigung.

Diese transkriptionellen Adaptionen passen auch, neben den Ergebnissen im Langendorff-Modell, bei der sich eine Erholung der Herzfunktionen durch Postkonditionierung nach kurzen Ischämiedauern einstellte, zu den bisherigen Erkenntnissen in der Literatur. Jung et al. zeigten an Ratten, welche 30 Minuten Ischämie und zwei Stunden Reperfusion ausgesetzt waren, dass eine Inhibition der Arginase kardioprotektiv wirkt. Sie begründeten dies durch die Verschiebung des Arginin-Verbrauchs zugunsten von NO-Synthasen (Jung, Gonon, Sjöquist, Lundberg, & Pernow, 2010). Des Weiteren passen diese Ergebnisse zu einer älteren Versuchsreihe mit Mäusen mit einer JDP2-Überexpression. Diese führt zu einer Inhibition des Transkriptionsfaktors Aktivator Protein-1 (AP1) (Hill et al., 2013), welcher an der Regulierung der Arginase-Expression beteiligt ist (Zhu et al., 2010). In der Versuchsreihe

durchliefen sowohl Wildtyp-Mäuse (WT) als auch transgene JDP2-Mäuse (TG) 45 Minuten Ischämie und anschließend 30 Minuten Reperfusion. Während es bei den Wildtypmäusen zu einer signifikant vermehrten Expression von Arginase 1 kam (Abbildung 4.5.1-1), zeigten die transgenen Mäuse kein verändertes Expressionsverhalten der Arginase 1 (Abbildung 4.5.1-2). Diese Anpassungen spiegeln sich auch im Langendorff-Modell wieder. Darin zeigten die WT-Mäuse nach der Reperfusion einen erhöhten P_{dia} (Abbildung 4.4.2-2), welcher als Maß für den irreversiblen Schaden am Myokard betrachtet werden kann. Bei den TG-Mäusen waren weder der P_{dia} (Abbildung 4.4.2-4) noch die Arginase 1-Expression erhöht. Bedingt durch die JDP2-Überexpression wurden die Kardiomyozyten vor Hypertrophie und Apoptose geschützt.

Eine neue Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass die Postkonditionierung zu einer verminderten Arginase 1-Expression führt, was die Produktivität der NO-Synthasen steigert. Allerdings zeigte sich dieser Effekt nur nach kurzen Ischämiedauern und blieb nach langen Ischämiedauern trotz Postkonditionierung aus.

6 Zusammenfassung

Ziel bei ischämischen Herzereignissen ist es, den Myokardschaden gering zu halten, um die Leistungsfähigkeit des Herzens und somit die Lebensqualität der Patienten zu erhalten. Ein wirksames Verfahren ist die ischämische Postkonditionierung des Herzens. In der vorgelegten Arbeit wurde untersucht, ob die Dauer der Ischämie Einfluss auf die protektive Wirkung der Postkonditionierung hat. Im Langendorff-Modell konnte an Rattenherzen gezeigt werden, dass bei Ischämiedauern von 15 Minuten und anschließender Reperfusion von drei Stunden die Postkonditionierung eine schützende Wirkung auf die Kardiomyozyten besitzt. Gezeigt werden konnte dies durch Untersuchungen der Herzfunktionen wie dem LVDP, dem RPP und dem LVEDP. Die positiven Effekte der Konditionierung konnten bei Ischämiedauern von 60 Minuten nicht mehr nachgewiesen werden.

Neben den Herzfunktionen wurde auch das Expressionsverhalten untersucht. Bei den Versuchsherzen mit 15-minütiger Ischämiedauer und Postkonditionierung, bei denen sich eine Erholung zeigte, kam es zu einem erhöhten Expressionsverhalten von BNP und Serca2a sowie einem verminderten von Arginase 1. Diese Veränderungen der Genexpression konnten bei den Versuchsherzen mit 60-minütiger Ischämiedauer und Postkonditionierung nicht gezeigt werden. Diese Herzen wiesen auch keine Erholung der Herzfunktionen auf. Unabhängig von der Ischämiedauer zeigte sich bei den Versuchsherzen mit Postkonditionierung ein erhöhtes Expressionsverhalten von Mef2c und ein vermindertes bei Gata4, jeweils gegenüber den Herzen ohne Konditionierung.

7 Summary

The aim of ischemic cardiac events is to keep the myocardial damage low in order to preserve the capability of the heart and with that the patient's quality of life. An effective method for that is the ischemic post conditioning of the heart. With the presented work it was investigated whether the period of the ischemia has an influence on the protective effect of the post conditioning. In the Langendorff model with hearts of rats it could be demonstrated that the period of ischemia of 15 minutes duration plus following reperfusion of three hours, post conditioning provides a saving effect for the cardiomyocytes. This could be demonstrated through investigations of the heart functions as LVDP, the RPP and the LVEDP. These positive effects of the conditioning could not be proved on ischemia of 60 minutes duration.

In addition to the heart functions also the expression behaviour was investigated. At the heart experiments with 15 minute ischemic duration and post conditioning – in which a recovery could be noticed – we could see an increased expression behaviour of BNP and Serca2a as well as a decreased one of Arginase 1. These changes of gene expression could not be shown at heart experiments with 60 minutes duration ischemia and post conditioning. These hearts did not show any recovery of the heart functions. Regardless of the duration of the ischemia, an increased expression behaviour of Mef2c and a reduced one at Gata4 could be shown on those heart functions with post conditioning compared to hearts without conditioning.

8 Verzeichnis der Abkürzungen

°C	Grad Celcius
% (vol/vol)	Volumenprozent
α -MHC	α -Myosin heavy chain
ACS	Akutes Koronarsyndrom
AKT	Proteinkinase B
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
ATP	Adenosintriphosphat
B2M	β 2-Mikroglobulin
BNP	B-Typ Natriuretisches Peptid
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CK-MB	Kreatinkinase-Myokardtyp
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphate
Dox	Doxycyclin
DTT	Dithiothreitol
EKG	Elektrokardiogramm
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
g	Gramm
H ₂ O ₂	Hydrogen-Peroxid
HDL	High-density lipoprotein
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl- Transferase
HKG	Housekeeping Gen

HR	Herzrate
HRP	Horseradish peroxidase
JDP2	Jun Dimerization Protein 2
kDA	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
l	Liter
LDL	Low-density lipoprotein
LVDP	Linksventrikulär entwickelter Druck
LVeDP	Linksventrikulär enddiastolischer Druck
Mef2c	Myocyte-specific enhancer factor 2c
MEK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
min	Minute
ml	Milliliter
mm ²	Quadratmillimeter
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mmol	Millimol
mPTP	mitochondriale Permeabilitäts - Transitions - Pore
mRNA	messenger RNA
ng	Nanogramm
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
NSTEMI	Non-ST-elevation myocardial infarction
O ₂ ⁻	Superoxid-Anion
OH ⁻	Hydroxyl-Radikal
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
P70S6K	P70-ribosomale-S6-Proteinkinase
P dias	Diastolischer Druck

P sys	Systolischer Druck
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	Negativ dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Perfusionsdruck
PTCA	Perkutane transluminale Koronarangioplastie
RISK	Reperfusion Injury Salvage Kinase
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RPP	Frequenz-Druck-Produkt
Serca	Sarko-/Endoplasmatische Retikulum Ca ²⁺ -ATPase
SDS-Page	Natrium-Dodecyl-Sulfat
STEMI	ST-elevation myocardial infarction
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
V	Volt
x g	x-fache Erdbeschleunigung

9 Literatur

- Achenbach, S., Szardien, S., Zeymer, U., Gielen, S., & Hamm, C. W. (2012). Kommentar zu den Leitlinien der europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) zur Diagnostik und Therapie des Akuten Koronarsyndroms ohne persistierende St-Streckenhebung. *Kardiologe*, 6(4), 283–301.
- Albrecht, S., Brandl, H., & Adam, W. (1990). Chemilumineszenz-Reaktionen. Anwendungen in der klinischen Chemie, *Biochemie* und Medizin. *Chemie in Unserer Zeit*, 24(5), 227–238.
- Babior, B. M. (2000). The NADPH oxidase of endothelial cells. *IUBMB Life*. John Wiley & Sons, Ltd., 267-269.
- Baker, D. L., Hashimoto, K., Grupp, I. L., Ji, Y., Reed, T., Loukianov, E., ... Periasamy, M. (1998). Targeted overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase increases cardiac contractility in transgenic mouse hearts. *Circulation Research*, 83(12), 1205–14.
- Black, B. L., & Olson, E. N. (1998). Transcription control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*, 14, 167–96.
- Bonzel, T., Erbel, R., Hamm, C. W., Levenson, B., Neumann, F. J., Rupprecht, H. J., & Zahn, R. (2008). Perkutane koronarinterventionen (PCI). *Clinical Research in Cardiology*.
- Breivik, L., Jensen, A., Guvåg, S., Aarnes, E. K., Aspevik, A., Helgeland, E., ... Jonassen, A. K. (2015). B-type natriuretic peptide expression and cardioprotection is regulated by Akt dependent signaling at early reperfusion. *Peptides*, 66, 43–50.
- Bruneau, B. G. (2002). Transcriptional regulation of vertebrate cardiac morphogenesis. *Circulation Research*.
- Burley, D. S., & Baxter, G. F. (2007). B-type natriuretic peptide at early reperfusion limits infarct size in the rat isolated heart. *Basic Research in Cardiology*, 102(6), 529–41.
- Cripps, R. M., Lovato, T. A. L., & Olson, E. N. (2004). Positive autoregulation of the Myocyte enhancer factor-2 myogenic control gene during somatic muscle development in *Drosophila*. *Developmental Biology*, 267(2), 536–547.

- Darling, C. E., Jiang, R., Maynard, M., Whittaker, P., Vinten-Johansen, J., & Przyklenk, K. (2005). Postconditioning via stuttering reperfusion limits myocardial infarct size in rabbit hearts: role of ERK1/2. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 289(4), H1618–H1626.
- de Bold, A. J., Borenstein, H. B., Veress, A. T., & Sonnenberg, H. (1981). A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sciences*, 28(1), 89–94.
- del Monte, F., Lebeche, D., Guerrero, J. L., Tsuji, T., Doye, A. A., Gwathmey, J. K., & Hajjar, R. J. (2004). Abrogation of ventricular arrhythmias in a model of ischemia and reperfusion by targeting myocardial calcium cycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(15), 5622–5627.
- Döring, H. J. (1990). The isolated perfused heart according to Langendorff technique--function--application. *Physiologia Bohemoslovaca*, 39(6), 481–504.
- Durante, W., Johnson, F. K., & Johnson, R. A. (2007). Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol*, 34(9), 906–911.
- Fang, L., Moore, X.-L., Dart, A. M., & Wang, L.-M. (2015). Systemic inflammatory response following acute myocardial infarction. *Journal of Geriatric Cardiology: JGC*, 12(3), 305–12.
- Furchgott, R. F., & Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288(5789), 373–376.
- Hall, C. (2005). NT-ProBNP: The Mechanism Behind the Marker. *Journal of Cardiac Failure*, 11(5), S81–S83.
- Hamm, C. W., Arntz, H.-R., Bode, C., Giannitsis, E., Katus, H., Levenson, B., ... Zahn, R. (2005). Pocket-Leitlinien Akutes Koronarsyndrom (ACS).
- Harpster, M. H., Bandyopadhyay, S., Thomas, D. P., Ivanov, P. S., Keele, J. A., Pineguina, N., ... Stayton, M. M. (2006). Earliest changes in the left ventricular transcriptome postmyocardial infarction. *Mammalian Genome*, 17(7), 701–715.

- Hausenloy, D. J., Duchon, M. R., & Yellon, D. M. (2003). Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovascular Research*, 60(3), 617–25.
- Herold, G. (2013). *Innere Medizin - Eine vorlesungsorientierte Darstellung* (2013th ed.). Köln.
- Heusch, G., Boengler, K., & Schulz, R. (2008, November 4). Cardioprotection: Nitric oxide, protein kinases, and mitochondria. *Circulation*, 118(19), 1915–1919.
- Hill, C., Würfel, A., Heger, J., Meyering, B., Schlüter, K. D., Weber, M., ... Euler, G. (2013). Inhibition of AP-1 signaling by JDP2 overexpression protects cardiomyocytes against hypertrophy and apoptosis induction. *Cardiovascular Research*, 99(1), 121–128.
- Holmes, J. W., Borg, T. K., & Covell, J. W. (2005). Structure and Mechanics of Healing Myocardial Infarcts. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 7(1), 223–253.
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., & Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(24), 9265–9269.
- Jennings, R. B. (1969). Early phase of myocardial ischemic injury and infarction. *The American Journal of Cardiology*, 24(6), 753–765.
- Jung, C., Gonon, A. T., Sjöquist, P. O., Lundberg, J. O., & Pernow, J. (2010). Arginase inhibition mediates cardioprotection during ischaemia-reperfusion. *Cardiovascular Research*, 85(1), 147–154.
- Kakita, T., Hasegawa, K., Iwai-Kanai, E., Adachi, S., Morimoto, T., Wada, H., ... Sasayama, S. (2001). Calcineurin Pathway Is Required for Endothelin-1-Mediated Protection Against Oxidant Stress-Induced Apoptosis in Cardiac Myocytes. *Circulation Research*, 88(12), 1239–1246.
- Kelley, C., Blumberg, H., Zon, L. I., & Evans, T. (1993). GATA-4 is a novel transcription factor expressed in endocardium of the developing heart. *Development (Cambridge, England)*, 118(3), 817–827.
- Kobayashi, S. (2006). Transcription factor GATA4 regulates cardiac BCL2 gene expression in vitro and in vivo. *The FASEB Journal*, 20(6), 800–2.

- Kuhn, M. (2004). Molecular physiology of natriuretic peptide signalling. *Basic Research in Cardiology*, 99(2), 76–82.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Liang, Q., De Windt, L. J., Witt, S. A., Kimball, T. R., Markham, B. E., & Molkentin, J. D. (2001). The Transcription Factors GATA4 and GATA6 Regulate Cardiomyocyte Hypertrophy in Vitro and in Vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 276(32), 30245–30253.
- Lin, Q. (1997). Control of Mouse Cardiac Morphogenesis and Myogenesis by Transcription Factor MEF2C. *Science*, 276(5317), 1404–1407.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method, 25, 402–408.
- Meinertz, T. (2016). Deutscher Herzbericht. *Deutsche Herzstiftung*.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*.
- Murphy, E., & Steenbergen, C. (2008). Mechanisms Underlying Acute Protection From Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury. *Physiological Reviews*, 88(2), 581–609.
- Murry, C. E., Jennings, R. B., & Reimer, K. A. (1986). Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74(5), 1124–1136.
- Naseem, K. M. (2005, April). The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Molecular Aspects of Medicine*.
- Nishimoto, S., & Nishida, E. (2006, August). MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2. *EMBO Reports*. European Molecular Biology Organization.
- Piper, H. M., Abdallah, Y., & Schäfer, C. (2004, February 15). The first minutes of reperfusion: A window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovascular Research*. Oxford University Press.
- Potthoff, M. J., & Olson, E. N. (2007). MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Development*, 134(23), 4131–4140.

- Przyklenk, K., Darling, C. E., Dickson, E. W., & Whittaker, P. (2003). Cardioprotection 'outside the box'--the evolving paradigm of remote preconditioning. *Basic Research in Cardiology*, 98(3), 149–57.
- Renz-Polster, H., & Krautzig, S. (2013). *Basislehrbuch Innere Medizin - kompakt - greifbar - verständlich* (5. Auflage). München: Elsevier Urban & Fischer.
- Roessner, A., Pfeifer, U., & Müller-Hermelink, H. K. (2008). *Grundmann - Allgemeine Pathologie und Grundlagen der speziellen Pathologie* (11. Auflag). München: Elsevier Urban & Fischer.
- Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014, May 19). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*. NIH Public Access.
- Schlüter, K. D., Schulz, R., & Schreckenber, R. (2015). Arginase induction and activation during ischemia and reperfusion and functional consequences for the heart. *Frontiers in Physiology*, 6(MAR).
- Schofer, N., Hamm, · C, Katus, · H A, Kelm, · M, & Blankenberg, · S. (2014). Kommentar zur dritten allgemeinen Definition des Myokardinfarktes der gemeinschaftlichen ESC/ ACCF/AHA/WHF Task Force Einleitung. *Kardiologe*, 8, 65–71.
- Stammers, A. N., Susser, S. E., Hamm, N. C., Hlynsky, M. W., Kimber, D. E., Kehler, D. S., & Duhamel, T. A. (2015). The regulation of sarco(endo)plasmic reticulum calcium-ATPases (SERCA). *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 12(January), 1–12.
- Destatis, Staatistisches Bundesamt, D. (2015) Todesursachen in Deutschland destatis Fachserie 12 Reihe 4
- Sudoh, T., Kangawa, K., Minamino, N., & Matsuo, H. (1988). A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature*, 332(6159), 78–81.
- Suzuki, Y. J., Nagase, H., Day, R. M., & Das, D. K. (2004). GATA-4 regulation of myocardial survival in the preconditioned heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 37(6), 1195–1203.
- Takemura, G., Ohno, M., Hayakawa, Y., Misao, J., Kanoh, M., Ohno, A., ... Fujiwara, H. (1998). Role of apoptosis in the disappearance of infiltrated and proliferated interstitial cells after myocardial infarction. *Circulation Research*, 82(11), 1130–8.

- Thygesen, K., Alpert, J. S., White, H. D., Jaffe, A. S., Apple, F. S., Galvani, M., ... Al-Attar, N. (2007). Universal definition of myocardial infarction: Kristian Thygesen, Joseph S. Alpert and Harvey D. White on behalf of the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction. *European Heart Journal*, 28(20), 2525–2538.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), 4350–4.
- Tsang, A., Hausenloy, D. J., Mocanu, M. M., & Yellon, D. M. (2004). Postconditioning: A form of “modified reperfusion” protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circulation Research*, 95(3), 230–232.
- Vinten-Johansen, J. (2004). Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovascular Research*, 61(3), 481–497.
- Vinten-Johansen, J., Zhao, Z.-Q., Zatta, A. J., Kin, H., Halkos, M. E., & Kerendi, F. (2005). Postconditioning--A new link in nature’s armor against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Basic Research in Cardiology*, 100(4), 295–310.
- Weihrauch, D., Arras, M., Zimmermann, R., & Schaper, J. (1995). Importance of monocytes/macrophages and fibroblasts for healing of micronecroses in porcine myocardium. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 147(1–2), 13–19.
- Yang, C. C., Ornatsky, O. I., McDermott, J. C., Cruz, T. F., & Prody, C. A. (1998). Interaction of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) with a mitogen-activated protein kinase, ERK5/BMK1. *Nucleic Acids Research*, 26(20), 4771–4777.
- Yasue, H., Yoshimura, M., Sumida, H., Kikuta, K., Kugiyama, K., Jougasaki, M., ... Nakao, K. (1994). Localization and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure. *Circulation*, 90(1), 195–203.
- Zhao, Z.-Q., Corvera, J. S., Halkos, M. E., Kerendi, F., Wang, N.-P., Guyton, R. A., & Vinten-Johansen, J. (2003). Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 285(2), H579–H588.

Zhu, W., Chandrasekharan, U. M., Bandyopadhyay, S., Morris, S. M., Dicorleto, P. E., & Kashyap, V. S. (2010). Thrombin induces endothelial arginase through AP-1 activation.

10 Publikationen

Citrulline Improves Early Post-Ischemic Recovery of Rat Hearts In Vitro by Shifting Arginine Metabolism From Polyamine to Nitric Oxide Formation

Clinical Medicine Insights: Cardiology; Volume 12: 1-5; 2018

Marc Heidorn¹, Tim Frodermann¹, Andreas Böning², Rolf Schreckenber¹ and Klaus-Dieter Schlüter¹

¹Physiologisches Institut, Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen, Germany.

²Justus-Liebig- Universität Gießen and Herz-, Kinderherz- und Gefäßchirurgie, Gießen, Germany.

11 Danksagung

Mein außerordentlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. K.-D. Schlüter aus dem physiologischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen für die Bereitstellung des Themas, seine Geduld und seine ausgezeichnete Betreuung. Er stand mir stets mit weitreichender Unterstützung zur Seite und trug wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Für die tatkräftige und hilfreiche Unterstützung im Labor danke ich den technischen Assistentinnen Frau Karin Westermann und Frau Nadine Weitastky sowie dem technischen Assistenten Herrn Peter Volk an der Langendorff-Apparatur. „Es war stets unterhaltsam und lehrreich mit Euch.“

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. R. Schreckenberg für seine Unterstützung und meinen MitdoktorandenInnen für ein tolles Arbeitsklima im Labor sowie für die moralische Unterstützung.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei meiner Freundin Tina Lauer, die mir stets den Rücken gestärkt hat und in allen Lebenslagen sehr geduldig und nachsichtig mit mir ist. Zudem danke ich meiner Familie für die Unterstützung in jeglicher Weise in all den Jahren, besonders meiner Mutter.

12 Erklärung

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

Tim Frodermann