

**Mechanismus der Proteinkinase A-vermittelten Protektion
gegen den myokardialen Reperfusionsschaden in isolierten
Herzmuskelzellen**

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

vorgelegt von Mustafa Micoogullari
geboren in Samandag / Hatay, Türkei

Gießen (2013)

Aus dem Physiologischen Institut
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Rainer Schulz

Gutachter: PD Dr. Yaser Abdallah

Gutachter: Prof. Dr. Ritva Tikkanen

Tag der Disputation: 07.04.2014

*Gewidmet meinen Eltern Bedia & Atullah,
meiner Frau Nergis und Emina Heyfa, unserer Tochter*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Der myokardiale Reperfusionsschaden	1
1.1.1	Mechanismen des akuten myokardialen Reperfusionsschadens auf zellulärer Ebene	2
1.1.2	Pathomechanismen der akuten myokardialen Reperfusionsschäden	3
1.1.3	Post-ischämische Strategien zur Protektion des reperfundierten Myokards	4
1.2	Die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) und myokardiale Reperfusionsschäden	6
1.3	Ziele der Arbeit.....	9
2	Material	10
2.1	Chemikalien.....	10
2.2	Häufig verwendete Medien und Puffer	14
2.2.1	Zellkulturmedien	14
2.2.2	Perfusionsmedien	15
2.3	Geräte und Laborbedarf.....	16
3	Methoden	20
3.1	Isolierung und Kultivierung der Herzmuskelzellen.....	20
3.1.1	Versuchstiere	20
3.1.2	Isolierung der ventrikulären Herzmuskelzellen	20
3.1.3	Zellkultur	22
3.2	Ischämie-Reperfusion-Experimente	22
3.2.1	Versuchsaufbau	22

3.2.2	Ermittlung der Ionenkonzentration von Ca^{2+} durch Fluoreszenz-mikroskopische Messungen	23
3.2.3	Ermittlung der Rate des nekrotischen Zelltods	24
3.3	SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese) und Western-Blot	25
3.3.1	Proteinisolation von den Kardiomyozyten und Proteinmengenbestimmung	27
3.4	PKA Aktivität-Assay	28
3.4.1	Proteinisolation von den Kardiomyozyten und Proteinmengenbestimmung	29
3.5	Statistik	30
4	Ergebnisse	31
4.1	Veränderung der Zellmorphologie und Kalziumhomöostase isolierter Kardiomyozyten während der Ischämie und Reperfusion	31
4.1.1	Exemplarischer Verlauf der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration isolierter Kardiomyozyten unter Kontrollbedingungen	31
4.1.2	Exemplarischer Verlauf der Zellmorphologie isolierter Kardiomyozyten unter Kontrollbedingungen	32
4.2	Einfluss β -adrenerger Rezeptor-Aktivierung auf reperfundierte Kardiomyozyten ...	33
4.2.1	Auswirkung β -adrenerger Rezeptor-Aktivierung auf den Anteil der hyperkontrahierten Zellen	33
4.2.2	Effekt β -adrenerger Rezeptor-Aktivierung auf den Anteil der stäbchenartigen Zellen	34
4.2.3	Einfluss β -adrenerger Rezeptor-Aktivierung auf die Entwicklung der Nekrose	34
4.2.4	Einfluss β -adrenerger Rezeptor-Aktivierung auf die Reperfusion-induzierte Ca^{2+} -Oszillationen während der Reperfusion	36
4.3	Aktivitätszustand der Protein Kinase A in Ischämie und Reperfusion	38
4.3.1	Aktivitätszustand der Protein Kinase A in Ischämie und Reperfusion unter Kontrollbedingung	38

4.3.2	Auswirkung β -adrenerger Rezeptor-Aktivierung auf die PKA Aktivität während der kritischen Phase der Reperfusion.....	40
4.4	Der Einfluss β -adrenerger Rezeptor-Aktivierung auf die Ca^{2+} -Freisetzungskanäle am sarkoplasmatischen Retikulum.....	41
4.4.1	Die Beeinflussung der Frequenz der Ca^{2+} -Oszillationen.....	41
4.4.2	Die Beeinflussung der Amplitude der Ca^{2+} -Oszillationen.....	42
4.5	Die Beeinflussung der Hyperkontraktur.....	43
4.6	Der Einfluss β -adrenerger Rezeptor-Aktivierung auf die Funktion des sarkoplasmatischen Retikulums.....	44
4.7	Phosphorylierungsstatus des Phospholambans an Ser16 während der Ischämie und der Reperfusion in Anwesenheit β -adrenerger Rezeptor-Aktivierung.....	46
4.7.1	Phospholamban Phosphorylierung in Anwesenheit β -adrenerger Rezeptor-Aktivierung oder von spezifischen PKA Aktivators.....	48
4.8	Phosphorylierung des Ryanodin Rezeptors an Ser2808 während der Ischämie und Reperfusion und bei Anwesenheit von Isoproterenol.....	50
5	Diskussion.....	51
6	Zusammenfassung.....	57
7	Summary.....	58
8	Abkürzungsverzeichnis.....	59
9	Literaturverzeichnis.....	63
10	Publikationsverzeichnis.....	81
11	Eidesstattliche Erklärung.....	82
12	Danksagung.....	83

1 Einleitung

1.1 Der myokardiale Reperfusionsschaden

Die häufigste Todesursache in Deutschland und in den industrialisierten Ländern sind Herz-Kreislaufkrankungen. Wie das Statistische Bundesamt in Wiesbaden ermittelte, wurden im Jahr 2011 rund 41% der Todesfälle durch einen Herzinfarkt oder andere Herz-Kreislaufkrankungen verursacht. Mit 8,3% aller Sterbefälle liegt die chronische ischämische Herzkrankheit an oberster Stelle der Todesursachen, gefolgt von dem akuten Myokardinfarkt mit 6,1% der Todesfälle. Eine starke Einschränkung oder Unterbrechung der koronaren Myokardperfusion durch Verengung oder Verschluss der Koronararterien führt zu einer Unterversorgung des myokardialen Gewebes. Als Folge des hierbei entstehenden Sauerstoffmangels kommt es zur Störung des Gleichgewichts zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot. Dies wird als Ischämie bezeichnet. Unter Ischämie kann die aerobe Energiegewinnung nicht mehr gewährleistet werden. Der akute Myokardinfarkt wird durch die Ischämie-bedingte Dysfunktion des kontraktile Gewebes und den darauffolgenden Verlust der Pumpfunktion des Herzens definiert.

Das Überleben des Patienten nach einem Myokardinfarkt ist im Wesentlichen von der Größe der Myokardnarbe und vom postischämischen *Remodelling* des nicht-ischämischen Myokards abhängig. Die aktuelle Therapie der Wahl gegen Myokardinfarkt ist das schnelle Wiedereröffnen des verschlossenen Koronargefäßes, die sogenannte Reperfusion. Bei der Reperfusion des ischämisch-geschädigten Myokards entstehen paradoxerweise irreversible Schäden, die auch als „**Reperfusionsschäden**“ bezeichnet werden (Theroux et al. 2000; Garcia-Dorado 2004; Piper et al. 1998, 2004, 2008). Trotz des Reperfusionsschadens stellt die Reperfusion die wirksamste Therapie des Myokardinfarkts dar, denn die Reperfusion grenzt die voranschreitenden Ischämie-Schäden im Myokard ein. Unbehandelt können diese myokardialen Schäden voranschreiten und schließlich zu einem vollständigen Funktionsverlust führen.

Bereits in tierexperimentellen Studien wurde gezeigt, dass die Reperfusionsschäden in der Frühphase der Reperfusion durch Interventionen reduziert werden können (Zhao ZQ et al. 2003; Sebbag L et al. 2003; Piper et al. 2004; Garcia-Dorado et al. 2006). Nachdem tierexperimentell protektive Mechanismen aufgezeigt wurden, konnte nun auch eine interventionell bedingte Reduktion der Reperfusionsschäden am menschlichen Myokard zu

Beginn der Reperfusion gezeigt werden (Staat et al. 2005; Ramzy D et al. 2006; Kitakaze et al. 2007; Piot et al. 2008). Um therapeutische Maßnahmen auf pharmakologischer Ebene gegen Reperfusionsschäden entwickeln zu können, müssen zunächst die für deren Entstehung verantwortlichen Mechanismen analysiert werden.

1.1.1 Mechanismen des akuten myokardialen Reperfusionsschadens auf zellulärer Ebene

Unter ischämischen Bedingungen wird die aerobe Energiegewinnung in Kardiomyozyten durch die Abwesenheit von Sauerstoff unterbrochen, da die oxidative Phosphorylierung nicht mehr stattfindet. Die Myokardzellen gehen in die anaerobe Energiegewinnung über, indem der glykolytische Abbau von Glukose stattfindet, wobei die anaerobe Gewinnung von ATP den Bedarf nicht deckt. Durch die Nettohydrolyse von ATP (Dennis et al. 1991) und durch die Vermehrung des anaeroben Glukose-Abbauproduktes Laktat (Milchsäure) kommt es zu einer Azidifizierung des ischämischen Myokards (Owens et al. 1996). Diese Azidifizierung führt nun dazu, dass auch die anaerobe Energiegewinnung unterbrochen wird, denn mit der pH Änderung wird die Aktivität des Schlüsselenzyms der Glykolyse, der Phosphofruktokinase, inhibiert, sodass ein ATP-Mangel entsteht. Durch den ATP-Mangel werden alle ATP-abhängigen Vorgänge in der Zelle, unter anderem die Aktivität der ATP-abhängigen Kanäle in der Zellmembran, gehemmt.

Während der Ischämie führt der ATP-Mangel zur Inhibierung der sarkolemmalen Na^+/K^+ -ATPase, die in Anwesenheit von ATP aktiv durch die Na^+ -Kanäle und den Na^+/H^+ Austauscher einströmendes Na^+ aus der Zelle hinaus und K^+ in die Zelle hinein pumpt. Die Inhibierung der Na^+/K^+ -ATPase hat zur Folge, dass die intrazelluläre Na^+ -Konzentration ansteigt (Anderson et al. 1990; Pike et al. 1993). Dies führt zur Aktivierung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauschers. Hierbei strömt Na^+ aus der Zelle hinaus und Ca^{2+} in die Zelle hinein, sodass die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ansteigt (Ca^{2+} -Überladung) (Haigney et al. 1992; Ladilov et al. 1999; Schäfer et al. 2001; Piper et al. 2008). Diese pathologische intrazelluläre Ca^{2+} -Überladung führt zu Ca^{2+} -abhängigen schädlichen Prozessen, die jedoch während der Ischämie nicht in Gang gesetzt werden können, denn die Azidose während der Ischämie verlangsamt die Aktivierung dieser Ca^{2+} -abhängigen Vorgänge, unter anderem die Aktivierung des Aktin-Myosin Kontraktilen-Apparates (Ladilov et al. 1995; Piper et al. 1998). Parallel zur Ca^{2+} -Überladung der Kardiomyozyten während der Ischämie entsteht eine pathologische Zellverkürzung, die nicht durch die hohe intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, sondern durch die sehr niedrigen ATP-Konzentration ($\text{ATP} < 100 \mu\text{M}$) initiiert wird. Diese

Ca²⁺-unabhängige Kontraktur wird auch als Rigor-Typ Kontraktur bezeichnet, bei der sich die myokardialen Zellen um etwa 30% ihrer Ausgangszelllänge verkürzen. Bei der sehr niedrigen ATP-Konzentration werden einzelne Querbrücken zwischen Aktin- und Myosinfilamenten gebildet (Rigorbrücken), die Ca²⁺-unabhängig sind (Nichols und Lederer 1990; Veksler und Ventura-Clapier 1994; Ladilov et al. 2003; Piper et al. 2008).

1.1.2 Pathomechanismen der akuten myokardialen Reperfusionsschäden

Im Rahmen der Reperfusion wird die aerobe Energiegewinnung in den Mitochondrien nach langer Ischämie durch Anwesenheit von Sauerstoff wieder aktiviert. Durch die erhöhte zytosolische ATP-Konzentration und die Ischämie-bedingte zytosolische Ca²⁺-Überladung wird die Ca²⁺-ATPase des Sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA) aktiviert, die das im Zytosol akkumulierte Ca²⁺ aus dem Zytosol in das Sarkoplasmatische Retikulum (SR) aktiv aufnimmt. Da das SR eine begrenzte Speicherkapazität aufweist, wird Ca²⁺ aus dem SR wieder durch die Ryanodin-Rezeptoren (RynR) in das Zytosol freigesetzt (Piper et al. 2006; 2008). Durch die repetitive Ca²⁺-Aufnahme über SERCA und Ca²⁺-Freisetzung über RynR entstehen die zytosolischen Ca²⁺-Oszillationen. Diese Ca²⁺-Oszillationen aktivieren den kontraktilem Apparat beim Vorhandensein von ATP und verursachen eine massive Zellverkürzung der Kardiomyozyten. Diese irreversible Zellverkürzung wird auch als Hyperkontraktur bezeichnet (Siegmund et al. 1992, 1994, 1997; Schäfer et al. 2001; Abdallah et al. 2006) und charakterisiert den zellulären Reperfusionsschaden (Siegmund et al. 1992). Die Hyperkontraktur entsteht zu Beginn der Reperfusion und ihr Ausmaß ist von der Ischämiedauer bestimmt. Anders als *in vitro* bleiben Reperfusionsinduzierte Schäden *in vivo* nicht nur auf primär betroffene einzelne Zellen beschränkt, sondern breiten sich unter benachbarten Zellen als Rupturen der Zellmembranen aus. Somit entsteht das typische histologische Bild der sogenannten „Kontraktionsbandennekrose“ (Ganote et al. 1983; Barrabes et al. 1996). Die Ausbreitung der Hyperkontraktur im Gewebe wird einerseits durch mechanische Kräfte, andererseits durch spezifische Signale, die durch *Gap Junctions* benachbarter Zellen weitergeleitet werden, begünstigt (Ruiz-Meana et al. 1999, 2001; Garcia-Dorado et al. 2002; Piper et al. 2008). In einer Studie von Garcia-Dorado et al. 1997 wurde gezeigt, dass die Inhibierung der *Gap Junctions* in der Frühphase der Reperfusion die Hyperkontraktur beziehungsweise die Nekrose der Kardiomyozyten reduziert.

Die Ca²⁺-Oszillationen verursachen nicht nur eine Hyperkontraktur, sondern führen auch zur Schädigung der Mitochondrien, indem die Ca²⁺-Aufnahme in Mitochondrien über MCU-Kanäle (Mitochondrialen Kalzium Uniporter) herbeigeführt wird (Halestrap et al. 2004; Piper

et al. 2008; Abdallah et al. 2011; Kaori Shintani et al. 2012). Die Ca^{2+} -Überladung in Mitochondrien verursacht die Öffnung der MPTP-Kanäle (Mitochondrialen-Permeabilitäts-Transitions-Poren) (Garcia-Rivas et al. 2006; Piper et al. 2008; Abdallah et al. 2011; Kaori Shintani et al. 2012), die die mitochondriale Matrix und das Zytosol miteinander verbinden und durch welche Moleküle bis 1,5 kDa Größe permeieren können. Die Öffnung der MPTPs wird durch die unter anderem durch Ca^{2+} -Überladung verursachte Depolarisation des Innenmembran-Potentials des Mitochondriums hervorgerufen. Dies führt zum Anstieg des osmotischen Drucks, sodass H_2O in die Mitochondrien diffundiert und eine Schwellung der äußeren Membran verursacht, sodass die äußere Membran letztendlich einreißt (Halestrap et al. 2004). Dadurch bricht die mitochondriale Energieproduktion zusammen, wodurch das Überleben der Kardiomyozyten nicht mehr gewährleistet ist (Piper et al. 2008). In einer *in vivo* Studie von Garcia-Rivas et al. 2006 und in einer *in vitro* Studie von Abdallah et al. 2011 wurde gezeigt, dass eine Inhibierung der MCU-Kanäle mit dem Ru360-Inhibitor die myokardialen Zellen gegen MPTP-Öffnung schützt und die Reperfusionsschäden reduziert. Dabei reduziert auch eine direkte Inhibierung des MPTPs mit Cyclosporin A den Reperfusionsschaden *in vivo* (Gomez et al. 2007; Bhamra et al. 2008) und *in vitro* (Bhamra et al. 2007; Abdallah et al. 2011).

1.1.3 Post-ischämische Strategien zur Protektion des reperfundierten Myokards

In zahlreichen tierexperimentellen Studien sind protektive Interventionen in der frühen Phase der Reperfusion belegt, welche die Kardiomyozyten gegen die Reperfusionsschäden schützen. Folgende Beispiele für die Reperfusionstherapie sind bereits als protektive Mechanismen etabliert:

Die Hemmung des kontraktile Apparates wirkt protektiv, indem der kontraktile Apparat mit BDM (2,3 Butanodionmonoxim) inhibiert wird (Siegmond et al. 1991; Garcia-Dorado et al. 1992).

Reduktion der Ca^{2+} -Sensitivität des kontraktile Apparates durch Verzögerung der pH-Erhholung in der Reperfusion vermindert auch die Reperfusionsschäden (Ladilov et al. 1995; Schäfer et al. 2000; Piper et al. 2004).

Durch Inhibierung des Na^+/H^+ -Kanals (Rupprecht et al. 2000) und die Inhibierung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers (Inserte et al. 2002) strömt weniger Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum in

die Kardiomyozyten ein, sodass die myokardiale Zellen gegen eine Hyperkontraktur geschützt werden (Schäfer et al. 2001).

In klinischen Studien wurde belegt, dass die Postkonditionierung, also Unterbrechungen der Reperfusion durch kurze Ischämieperioden, die Reperfusionsschäden und die Infarktgröße reduziert (Staat et al. 2005; Ma X et al. 2006). Einige der unter der kardioprotektiven Postkonditionierung liegenden Mechanismen wurden bislang aufgeklärt (Tsang et al. 2004; Bopassa et al. 2006; Piper et al. 2008; Abdallah et al. 2013).

Viele Studien legen auch dar, dass eine Aktivierung zellulärer Signalkaskaden in der Reperfusion durch die Aktivität bestimmter Proteinkinasen, die als RISK „Reperfusion Injury Salvage Kinases“ bezeichnet werden (Hausenloy und Yellon 2004, 2005; Bopassa et al. 2006), die Kardiomyozyten gegen die Hyperkontraktur schützen. Zu den RISK-Kinasen gehören unter anderem die Protein Kinase G (PKG), die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und die Glykogensynthase Kinase (GSK-3 β). Anders als bei Aktivierung der PKG und PI3K wirkt die Inhibierung der GSK-3 β kardioprotektiv (Bell et al. 2003; Hausenloy und Yellon 2004, 2005). Die Aktivierung der PKG-Signalkaskade erfolgt durch Applikation von NO-Donoren (Schlüter et al. 1994; Padilla et al. 2000) oder von natriuretischen Peptiden, die zur Aktivierung der partikulären Guanylatzyklase (pGC) führen (Padilla et al. 2001; Abdallah et al. 2005; Kitakaze et al. 2007). Die PKG-Signalkaskade wird auch durch die durch Insulin-Behandlung aktivierte PI3K vermittelte Signalkaskade über die lösliche Guanylatzyklase (sGC) aktiviert (Abdallah et al. 2006). Das Endziel der PKG vermittelten Signalkaskade ist das Regulatorprotein von SERCA (Ca²⁺-ATPase des Sarkoplasmatischen Retikulums), das Phospholamban (PLB) (Maclennan und Kranias 2003), welches durch PKG-Aktivität phosphoryliert wird (Abdallah et al. 2005, 2006; Gorbe et al. 2010). Im nicht phosphorylierten Zustand ist PLB an SERCA gebunden und die SERCA ist inaktiv. Wenn PLB durch zum Beispiel PKG-Aktivität phosphoryliert wird, dissoziiert PLB vom SERCA, sodass SERCA aktiviert wird. Im aktiven Zustand nimmt SERCA verstärkt Ca²⁺ aus dem Zytosol in das SR (sarkoplasmatische Retikulum) auf, sodass die zytosolische Ca²⁺-Überladung reduziert wird und die Reperfusion-induzierte Ca²⁺-Oszillationen gemindert werden. Dies schützt die Kardiomyozyten gegen Ca²⁺-Typ Kontraktur (Hyperkontraktur) (Abdallah et al. 2006).

Neben der Förderung der Ca²⁺-Aufnahme ins SR via SERCA wirkt auch die Inhibierung der Ca²⁺-Freisetzung aus dem SR ins Zytosol via Ryanodin Rezeptor (RynR) protektiv gegen den Reperfusionsschaden (Siegmond et al. 1997; Ruiz-Meana et al. 2009).

1.2 Die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) und myokardiale Reperfusionsschäden

Die Proteinkinase A wurde erstmals im Jahr 1968 von Walsh et al. aufgereinigt und als regulierende Kinase des Glykogenstoffwechsels bezeichnet, denn die PKA aktiviert die Phosphorylasekinase durch Phosphorylierung. Die PKA hat zahlreiche regulatorische Funktionen, die Beteiligung an einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie die Entwicklung, Immunantwort, Differenzierung etc. aufweisen (Tasken und Aandahl 2004; Skalhegg und Tasken 2000). Die PKA ist ein tetrameres Holoenzym, das aus zwei katalytischen (C-) und zwei regulatorischen (R-) Untereinheiten besteht. Nachdem die 3-dimensionale Struktur der C-Untereinheit aufgeklärt wurde, gilt diese Struktur als Prototyp für die ganze Proteinkinase-Familie (Taylor et al. 1990; Kornev und Taylor 2010). Die C-Untereinheit der PKA ist eine Serin/Threonin Kinase. Die R-Untereinheiten lassen sich in zwei Formen sowie Typ-I und Typ-II aufgrund ihres unterschiedlichen Verhaltens im Elutionsschritt der Anionenaustausch-Chromatographie unterteilen (Reimann et al. 1971a, 1971b; Corbin et al. 1975; Ruehr et al. 2004).

Im inaktiven Zustand weist die PKA eine Struktur als Heterotetramer auf, indem die C-Untereinheiten an einem Dimer von R-Untereinheiten gebunden und somit blockiert sind. Die PKA wird durch den sekundären Botenstoff, dem zyklischen 3',5'-Adenosinmonophosphat (cAMP), aktiviert, indem vier Moleküle von cAMP an den Substratbindungsstellen der R-Untereinheiten binden. Dies führt zu einer Konformationsänderung des Enzymkomplexes und schließlich zur Dissoziation der C-Untereinheiten. Die freien C-Untereinheiten sind nun in der Lage, Substrate mit bestimmten Erkennungssequenzen an Serin- oder Threoninresten zu phosphorylieren (Manni et al. 2008).

Die Signalkaskade der PKA-Aktivierung wird durch Bindung bestimmter Stimuli wie zum Beispiel Hormone, Neurotransmitter etc. an die G-Protein gekoppelten 7-Transmembranrezeptoren initiiert (Lefkowitz 2004; Dalrymple et al. 2008). Diese Stimulation führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, sodass die gebundenen heterotrimeren G-Proteine ($\alpha\beta\gamma$) durch GTP Bildung von GDP aktiviert werden (Yeagle und Albert 2003). Danach dissoziiert die $G\alpha$ -Untereinheit vom G-Proteinkomplex und aktiviert die Adenylylzyklasen, welche ATP in cAMP spalten und zur Erhöhung der Konzentration von cAMP führen (Zaccolo und Pozzan 2002; Robidoux et al. 2004; Zaccolo et al. 2006). Um die Konzentration endogener cAMP zu begrenzen, wird die cAMP durch Phosphodiesterasen (PDEs) zu AMP hydrolysiert (Houslay und Adams 2003; Mongillo et al. 2004; Conti und

Beavo 2007). Die durch die erhöhte cAMP-Konzentration aktivierte PKA hat in der Zelle mehrere Targets, und ist an verschiedenen Signalkaskaden beteiligt. Der Verlauf der Signalkaskade wird durch die Interaktion der PKA mit den sogenannten A-Kinase Ankerproteinen (AKAPs) spezifiziert. Die AKAPs verankern die PKA in spezifischen subzellulären Kompartimenten und werden auch als lokale Koordinatoren der cAMP-abhängigen Proteinkinasen bezeichnet (Edwards und Scott 2000; Dodge-Kafka et al. 2001; Wong und Scott 2004; Langeberg und Scott 2005). Die intrazelluläre Lokalisation der AKAPs wird durch die Interaktionen mit anderen Proteinen, durch posttranslationale Modifikationen oder durch spezielle Zielsequenzen gewährleistet.

Die AKAPs sind in viele Subtypen zu unterteilen. Die folgenden Beispiele von AKAPs beziehen sich auf die Aktivität von PKA auf die Ca^{2+} -Homöostase der Zelle:

Das AKAP18 α ist an der Zellmembran lokalisiert und stellt die Interaktion der PKA mit dem L-Typ Ca^{2+} -Kanal, der spannungsabhängig ist und die Ca^{2+} -Aufnahme in die Zelle gewährleistet, sicher (Hulme et al. 2002, 2003). Die durch die Ca^{2+} -Aufnahme erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration verstärkt die Muskelkontraktion, indem Ca^{2+} an Troponin C bindet (Gergely 1976; Strang et al. 1994).

Das AKAP18 δ ist im Zytosol lokalisiert und gewährleistet die Interaktion der PKA mit der an dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) lokalisierten Ca^{2+} -ATPase (SERCA) und Phospholamban (PLB), indem PLB an Ser16 durch PKA phosphoryliert wird. PLB ist der Inhibitor von SERCA (Tada und Toyofuku 1996; Colyer 1998; MacLennan und Kranias 2003). Wenn PLB durch PKA phosphoryliert wird, dissoziiert PLB von SERCA und die Ca^{2+} -Aufnahme aus dem Zytosol in das SR wird verstärkt (Lygren et al. 2007). Dadurch kommt es zu einer schnellen Relaxation des kontrahierten Herzmuskels (Zhang et al. 1995; Wier et al. 1997; Szentesi et al. 2004; Masterson et al. 2011; Cerra und Imbrogno 2012).

Die durch den β -adrenergen Stimulus aktivierte PKA ist auch in der Lage, die Kontraktion der Zelle zu modulieren, indem PKA direkt Troponin I (in Mäusen an Ser22/23 und im Menschen an Ser23/24) und C-Protein phosphoryliert (Cazorla et al. 2006; Hamdani et al. 2008; Pfeleiderer et al. 2009). Troponin I ist das Regulatorprotein der Muskel-Kontraktion und Relaxation, denn es ist der Inhibitor des mit Thin-Filamenten assoziierten Troponin-Komplexes (Layland und Solaro und Shah 2005). PKA vermittelte Phosphorylierung des kardialen Troponin I (cTnI) reduziert die Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamenten und erhöht die

Rate der Ca^{2+} -Dissoziation von Troponin C. Dies führt zu einer Beschleunigung der Relaxation (Kentish et al. 2001; Herron und Korte und McDonald 2001).

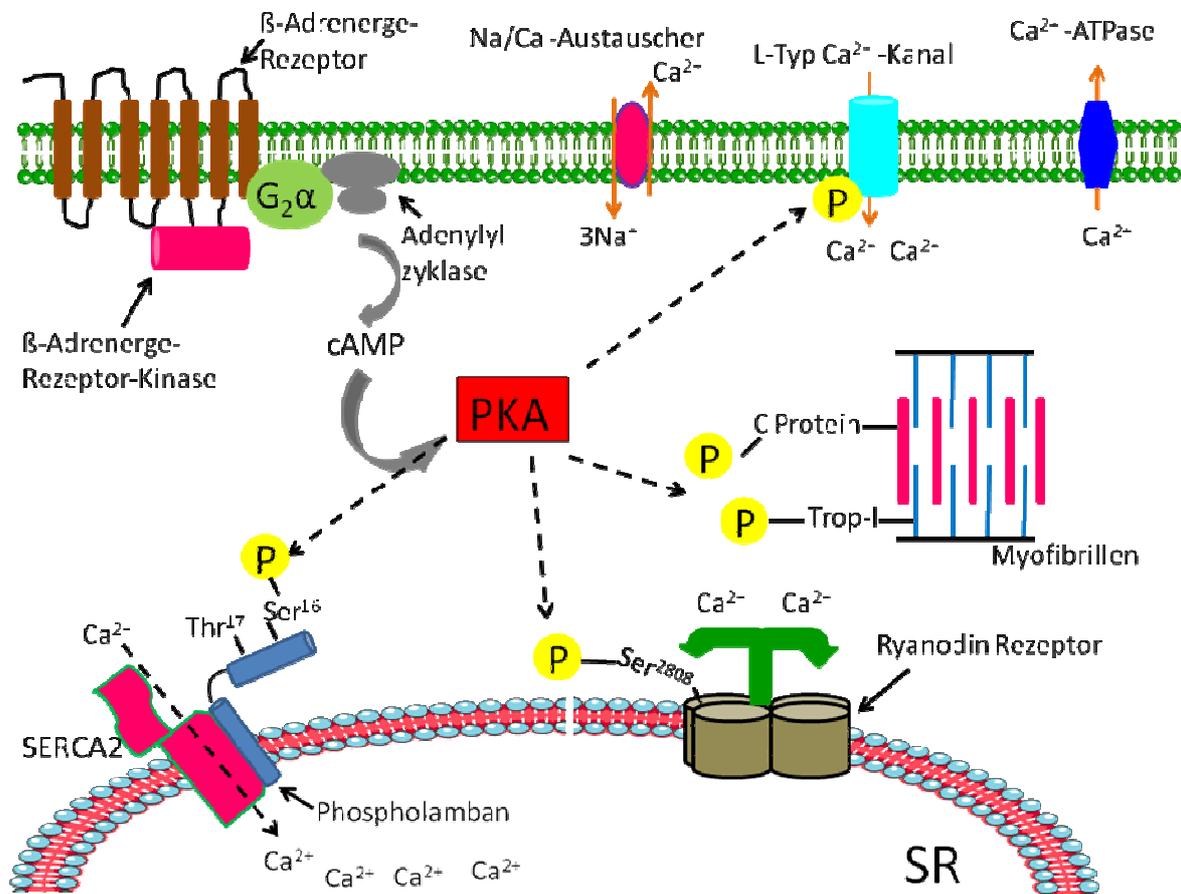


Abb. 1.2.1 Modifizierte schematische Darstellung der PKA-Targete in Kalziumhandlung nach β -adrenergen-Rezeptor Aktivierung nach den Arbeiten von Frau Dr. Kranias Evangelia (University of Cincinnati).

Arbeiten von Takasago et al. 1991, Xiao B et al. 2004, Danila und Hamilton 2004 und Shan J et al. 2010 zeigten, dass auch der an der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) lokalisierten Ca^{2+} -Freisetzung Kanal „Ryanodin Rezeptor“ (RynR) durch PKA Aktivität phosphoryliert wird, sodass Ca^{2+} aus dem SR in das Zytosol freigesetzt wird.

Obwohl es bereits bekannt ist, dass die Lokalisation der PKA durch die AKAPs gewährleistet wird und die Kompartimentierung der PKA für die Aktivität von PKA essentiell ist, ist die Rolle der PKA in der Kalziumhomöostase auf zellulärer Ebene in Ischämie-Reperfusion-Modell nicht ganz geklärt.

1.3 Ziele der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin zu untersuchen, ob eine Aktivierung der β -adrenergen Rezeptoren während der Reperfusion den myokardialen Reperfusionsschaden reduzieren kann. Am Modell isolierter Kardiomyozyten wurde analysiert, ob die Applikation des PKA Aktivators Isoproterenol während der Reperfusion einen Einfluss auf das Ausmaß der Hyperkontraktur hat und ob die kardialen Zellen dadurch gegen die Entwicklung der Nekrose geschützt werden. Des Weiteren wurde die Auswirkung der PKA Aktivierung auf die zytosolische Ca^{2+} -Homöostase determiniert. Zunächst wurde die Aktivität der Protein Kinase A unter Ischämie und Reperfusion determiniert. Abschließend wurde die Rolle der PKA Aktivierung auf die Funktion des sarkoplasmatischen Retikulums untersucht.

2 Material

2.1 Chemikalien

Vielfach verwendete Reagenzien

Albumin(aus Rinderserum)	Roche Applied Science, Mannheim
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
2-Deoxy-D-Glukose	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Riedel de Haën, Seelze
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
FBS	PAA Laboratories, Pasching (Austria)
Glukose	Merck, Darmstadt
Glycerol	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumcyanid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka, Schweiz
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt
Koffein	Sigma, Taufkirchen
Kollagenase, Typ CLS II,(322U/mg)	Biochrom KG, Berlin
Laminin	Roche Applied Science, Mannheim
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Medium 199	Biochrom, Berlin

Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Isotone Natriumchloridlösung	B Braun Melsungen AG, Melsungen
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Biochrom KG, Berlin
2-Propanol	Fluka Chemie, Buchs (CH)
SDS ultrapur	Roth, Karlsruhe

Perfusionsexperimente

Fura-2-AM, (1-(2-(5-Carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy)-2-(-2'-amino-5' methylphenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraacetat	Invitrogen, Karlsruhe
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
N ₂	Linde, München

Aktivatoren

Isoproterenol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Adenosine 3',5'-cyclic Monophosphate, 8-Bromo-, Sodium Salt	Calbiochem, Darmstadt

Inhibitoren

8-(4-Chlorophenylthio)adenosine-3'-5'-Cyclic monophosphorothioate, Rp-8-CPT-cAMPs	BIOLOG Life Science, Bremen
---	-----------------------------

Gelelektrophorese

Acrylamid / Bisacrylamid Lösung	Serva Elektrophoresis, Heidelberg
Benzonase®	Merck, Darmstadt
Ammonium Persulfat (APS)	Merck, Darmstadt

BSA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chloroform Minimum 99%	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
p-Coumarsäure	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
ECL-Entwicklerlösung (=SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate)	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
EDTA-Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EGTA	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Luminol	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Magnesiumchlorid	Fluka, Schweiz
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt
Natriummonovanadat	Merck, Darmstadt
PBS Tablets	GIBCO™ Invitrogen Corporation, UK
Ponceau S solution	Merck, Darmstadt
Proteasehemmer Tablette	Roche Applied Science, Mannheim
TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris	Roth, Karlsruhe
Trockenmilch	Milbona, Neckarsulm
Trypan-Blau	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Trypsin-EDTA-Lösung	Biochrom AG, Berlin
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim

Antikörper

Anti-Kaninchen-IgG (HRP-gekoppelt)	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Kaninchen-IgG (HRP-gekoppelt)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
Anti-PLB~P ser-16, Kaninchen IgG	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-PLB Ser16 Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology, Frankfurt
Anti-GAPDH, pAk, Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology, Frankfurt
Anti-RynR Ser2808, Kaninchen IgG	Assay biotech, Herford
Anti-RynR~P Ser2808, Kaninchen IgG	Assay biotech, Herford

2.2 Häufig verwendete Medien und Puffer

2.2.1 Zellkulturmedien

CCT-Medium:

Medium 199 +	
HEPES	3,6 g/l
Kreatin	5 mM
Karnitin	2 mM
Taurin	2 mM

Die Lösung wurde bei 37 °C mit NaOH auf pH 7,4 titriert.

Bestandteile des Vorplattierungsmediums:

CCT-Medium +	
Laminin	0,5 µg/ml
Penicillin	100 IU/ml
Streptomycin	10 µg/ml

Bestandteile des Ausplattierungsmediums:

CCT-Medium +	
Penicillin	100 IU/ml
Streptomycin	10 µg/ml

Alle Medien wurden sterilisiert und bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.2 Perfusionsmedien

Die Zusammensetzung der in Anoxie-Reperfusion Experimenten verwendeten Perfusionsmedien werden im Folgenden beschrieben.

Normoxische HEPES–gepufferte Tyrode Lösung (Normoxiemedium):

Bestandteile in mM: NaCl (125); KCl (2,6); KH₂PO₄ (1,2); MgSO₄ (1,2); CaCl₂ (1); HEPES (25); Glukose (2,5)

Die Lösung wird bei 37 °C mit NaOH auf pH 7,4 titriert.

Anoxische HEPES –gepufferte Tyrode Lösung (Anoxiemedium):

Bestandteile in mM: NaCl (125); KCl (2,6); KH₂PO₄ (1,2); MgSO₄ (1,2); CaCl₂ (1); HEPES (25)

Die Lösung wird bei 37 °C mit NaOH auf pH 6,4 titriert. Nach der Titration wird Cystein (5 mM) der Lösung zugesetzt. Anschließend wird das Anoxiemedium nach der von Allshire et al. (1987) beschriebener Methode in dampfdrucktauglichen Gefäßen in einem Dampfdruckkochtopf für 60 Minuten bei 2 Bar und 120 °C autoklaviert.

Lösungen zur Präparation der Herzmuskelzellen:

Ca²⁺ Stammlösung: CaCl₂ (100 mM)

Powell Medium: NaCl (110 mM); NaHCO₃ (25 mM); KCl (2,6 mM); KH₂PO₄ (1,2 mM); MgSO₄ (1,2 mM); Glukose (11mM)

Kollagenasepuffer: Powell Medium (50 ml); Kollagenase (20 mg); Ca²⁺ Stammlösung (12,5 µl)

2.3 Geräte und Laborbedarf

Zellkultur und Herzmuskelzellisolierung

Brutschrank	Kendro, Hanau
Deckgläser	Menzel, Braunschweig
Gewebehacker	Harvard Apparatus über Hugos Sachs Elektronik, March Hugstetten
Langendorf Apparatur	Eigenbau, Physiologisches Institut, JLU Gießen
Mikroskop	TMS-F, Nikon, Japan
Nylonnetz	NeoLab, Heidelberg
Präparationsbesteck	Eickenmeyer, Tuttlingen
Sterilbank	Kendro, Hanau

Fluoreszenzmessungen

Inverses Mikroskop	Olympus, Hamburg
Xenon-Lampe	TILL Photonics, Gräfelfing
Monochromator	TILL Photonics, Gräfelfing
Dichroid-Spiegel	Olympus, Hamburg
Emissionsfilter	Olympus, Hamburg
CCD Camera	TILL Photonics, Gräfelfing
Computer-Software "Tillvision"	TILL Photonics, Gräfelfing

Anoxie -Reoxygenation –Experimente

Dampfdruckkochtopf	All American, Canada
Druckstabile Glasgefäße mit verschließbarem Deckel	Bormioli Rocco, Italien
Edelstahlkapillare	Alltech, Unterhaching
Gasdichte Schläuche	Kahlensee, Gießen
Gasventile	Kahlensee, Gießen
Peristaltikpumpe	Gilson-Abimed, Langenfeld
Perfusionskammer	Eigenbau, Physiologisches Institut, JLU Gießen

Gelelektrophorese

CCD Kamera für Westernblot Analysen	Bio Rad, Hercules, USA
Elektroblotkammern	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Elektrophoresekammern	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Netzgeräte, Typ: High Voltage Power Pack P30 Typ: EPS 3501 XL	Biometra, Göttingen Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Weitere Geräte

Glasgeräte	Schott, Mainz
Hamiltonspritze (100 µl)	Hamilton, Bonaduz, Schweiz

Heizblock	Techne, Burkhardtsdorf
Heizrührer	Jahnke & Kunkel, Staufen
Inkubator	Kendro, Hanau
Perfusionsheizung	Eigenbau, Physiologisches Institut, JLU Gießen
Pestler	Kontes, Vineland, USA
Pipetten	Eppendorf-Nethler-Hinz, Hamburg
pH –Meter	WTW Weinheim
Schüttler, Typ: WT 12	Biometra, Göttingen
Vortexer	IKA -Werke, Staufen
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Wasserdemineralisierungsanlage	Millipore, Eschborn
Zentrifugen	Heraeus, Hanau

Verbrauchsmaterialien

Kulturschalen, Typ Falcon 3001	Becton Dickinson, Heidelberg
Nitrozellulosemembran	Schleicher und Schuell, Dassel
Parafilm®	PECHINEY Plastic Packaging, Menasha, USA
Pellet Pestle®	Kontes, Vineland, USA
Pipettenspitzen	Eppendorf-Nethler-Hinz, Hamburg
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht

Reaktionsgefäße (0,5; 2 ml)

Eppendorf-Nethler-Hinz,

Hamburg

Röhrchen, 10 ml

Greiner Labortechnik GmbH

Frickenhausen

Röhrchen, 50 ml, Typ Falcon 352070

Becton Dickinson, Heidelberg

Trockenpapier

Biotec-Fischer, Reiskirschen

Zellkulturschalen

Becton Dickinson, Heidelberg

Zellschaber, Typ: Falcon 353087

Becton Dickinson, Heidelberg

3 Methoden

3.1 Isolierung und Kultivierung der Herzmuskelzellen

3.1.1 Versuchstiere

In unserem Zellmodell wurden ventrikuläre Herzmuskelzellen von 200-300 g schweren adulten männlichen Wistar-Ratten verwendet. Die Züchtung der Tiere erfolgte im Tierstall des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig Universität und die Tiere hatten einen freien Zugang zu Futter (Altromin) und Wasser.

3.1.2 Isolierung der ventrikulären Herzmuskelzellen

Die ventrikulären Herzmuskelzellen wurden nach der von Piper et al. (1982) entwickelten Methode präpariert.

Für die Präparation verwendete Lösungen:

Kalzium Stammlösung:

CaCl₂ 100 mM

Powell-Medium:

NaCl	110,0 mM
KCl	2,6 mM
KH ₂ PO ₄	1,2 mM
NaHCO ₃	25 mM
Glukose	11 mM

Das Powell-Medium wurde kontinuierlich mit Carbogen begast, damit ein konstanter pH-Wert von 7,4 bei 37 °C gewährleistet wird.

Kollagenasepuffer:

Powell-Medium	50 ml
Kollagenase	20 mg
Ca ²⁺ -Stammlösung	12,5 µl

Bevor mit der Präparation begonnen wurde, wurde die Langendorff-Perfusionsanlage mit dem Perfusionspuffer luftblasenfrei gespült und auf 37 °C aufgewärmt. Die Ratten wurden unter Isofluran narkotisiert und durch Genickbruch getötet. Nach der Öffnung des Thorax wurde das Perikard entfernt. Mithilfe einer Schere wurde das Herz aus dem Organismus getrennt und sofort in die eiskalte isotonische NaCl-Lösung überführt. In der Lösung verbleibend wurde das Herz von den Geweberesten freipräpariert und anschließend mit der Aorta an die Langendorff-Perfusionsanlage eingebunden.

Um die Blutreste in den Koronarien auszuwaschen, wurde das Herz mit Powell-Medium (ungefähr mit 30 ml) perfundiert. Nach dem Entfernen der Blutreste wurde das Herz mit 50 ml Kollagenasepuffer rezirkulierend für 30 Minuten mit einer 2-3 ml/min Perfusionsgeschwindigkeit perfundiert. Während der Perfusion wurde der Kollagenasepuffer stets mit Carbogen begast und die Temperatur von 37 °C wurde sichergestellt.

Nach dem Ende der Perfusion wurde das Herz unterhalb der Vorhöfe von der Langendorff-Apparatur abgeschnitten und anschließend wurden die Ventrikel erst mechanisch mit einem Gewebehacker bei einer Schnittbreite von 0,7 mm zerkleinert und zunächst manuell mit zwei Skalpellern zerkleinert. Danach wurde das zerkleinerte Gewebe in Kollagenasepuffer bei 37 °C 5 Minuten lang inkubiert. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurde die Vereinzelung der Kardiomyozyten gefördert.

Zunächst wurde die Zellsuspension mit einem Nylonnetz mit einer Porengröße von 200 µm filtriert, um die restlichen Zellaggregate abzutrennen. Danach wurde die Zellsuspension bei 400 rpm 3 Minuten lang zentrifugiert, sodass die Kardiomyozyten von den anderen Zellen (Fibroblasten; Endothelzellen) getrennt wurden. Das Pellet besteht aus den Kardiomyozyten und der Überstand aus den anderen Zellen. Jetzt wurde das Zellpellet in das 200 µM CaCl₂ enthaltende Powell-Medium aufgenommen und erneut bei 400 rpm für 2 Minuten zentrifugiert. Daraufhin wurde das Pellet nun in das 400 µM CaCl₂ enthaltende Powell-Medium (10 ml) resuspendiert und in ein 10 ml Reagenzglas überführt. Nach dem dritten Zentrifugationsschritt (bei 400 rpm; 1 Minute lang) wurde das Pellet vorsichtig in 24 ml Ausplattierungsmedium pro jeweiliges Herz resuspendiert. Die Zellpopulation bestand nun zu ca. 70% aus vitalen stäbchenförmigen Kardiomyozyten.

3.1.3 Zellkultur

Am Vortag der Kardiomyozyten-Präparation wurde in die 33 mm Kulturschalen, die 30 mm Deckgläschen beinhalten, 1 ml Vorplattierungsmedium (Laminin enthaltend) hinzu pipettiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank aufbewahrt. Dadurch wurde den kardialen Zellen bessere Anheftung ermöglicht, denn die Kardiomyozyten sind nicht adhären. Am Folgetag wurde das Vorplattierungsmedium kurz vor dem Ausplattieren der isolierten Zellen abgesaugt und in 24 ml Ausplattierungsmedium resuspendiertes Kardiomyozytenpellet in 24 Kulturschalen verteilt (1 ml/Schale).

Nach zweistündiger Inkubation für die Anheftung der Zellen bei 37 °C wurde das Ausplattierungsmedium schließlich ausgewechselt. Somit wurden die abgerundeten toten Zellen entfernt, sodass die letztendliche Zellkultur zu ca. 90% aus stäbchenförmigen Zellen bestand. Für die Ischämie-Reperfusion-Versuche wurden die Deckgläschen mit anheftenden Kardiomyozyten verwendet.

Für die Experimente auf Proteinisolationsebene wurden die 33 mm Kulturschalen ohne Deckgläschen mit 1 ml Vorplattierungsmedium beschichtet, wobei das Vorplattierungsmedium anstatt Laminin 4% FCS (v/v) enthielt. Danach erfolgte die Inkubation über Nacht bei 37 °C im Brutschrank. Die Ausplattierung der Zellen fand auf oben beschriebenen Wege statt.

3.2 Ischämie-Reperfusion-Experimente

3.2.1 Versuchsaufbau

Für die Anoxie-Reoxygenationsversuche wurden die mit Kardiomyozyten behafteten Deckgläschen in eine 1 ml Perfusionskammer eingebaut, welche gasdicht verschlossen wurde. Hierbei betrug die Temperatur stetig 37 °C. Diese Kammer war über gasdichte Edelstahlkapillare mit zwei Reservoirs, wo Anoxie- beziehungsweise Reoxygenationsmedium vorhanden war, verbunden. Die an die Kammer angeschlossene Peristaltikpumpe gewährleistete dabei kontinuierlich eine Perfusionsgeschwindigkeit von 0,5 ml/Minute. Das Anoxiemedium wurde währenddessen stets mit 100% N₂ begast.

3.2.2 Ermittlung der Ionenkonzentration von Ca^{2+} durch Fluoreszenz-mikroskopische Messungen

Intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration wurde mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops, an das ein Video-Imaging-System angeschlossen war, determiniert. Die Wellenlänge, die dem Anregungsspektrum des Fluoreszenzfarbstoffes entsprach, wurde mittels Monochromator aus dem Licht, das von einer Xenon-Lampe generiert wurde, selektiert und ausgewählt. Dieses Licht wurde mithilfe eines Dichroidspiegels auf die mit Fluoreszenzfarbstoff beladenen Kardiomyozyten in der Perfusionskammer gelenkt. Dadurch wurde der Fluoreszenzfarbstoff angeregt und das von den Zellen emittierte Licht erreichte durch denselben Dichroidspiegel und einen Emissionsfilter, die an den Computer angeschlossene Kamera. Diese zeichnete das eintreffende Signal auf. Die Messungen wurden schließlich durch die Till-Photonics-Software (TillVision) ausgewertet. Das System der Fluoreszenzmikroskopie ist in Abb. 3.2.2.1 schematisch dargestellt.

Zur Bestimmung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff FURA-2 AM (2,5 μM) 20 Minuten lang bei 37 °C beladen. Dazu wurde FURA-2 AM in DMSO gelöst und in CCT-Medium verdünnt. Anschließend wurde das nicht gebundene FURA-2 AM durch einen Waschschrift mit CCT-Medium von 10 Minuten Dauer entfernt.

Fura-2 AM ist ein Acetoxymethylester, das für die Zellmembran durchlässig ist. Wenn es in die Zelle gelangt, wird es von den Esterasen gespalten und als geladenes Molekül kann die Zellmembran dann nicht mehr permeieren.

Die ausgewählten Exzitationswellenlängen für die Messung von FURA-2 AM betragen 340 nm und 380 nm und das Emissionsmaximum lag bei einer Wellenlänge von ca. 510 nm. Die Messungen wurden als FURA-2 Ratio (340 nm/380 nm) in relativen Einheiten wiedergegeben.

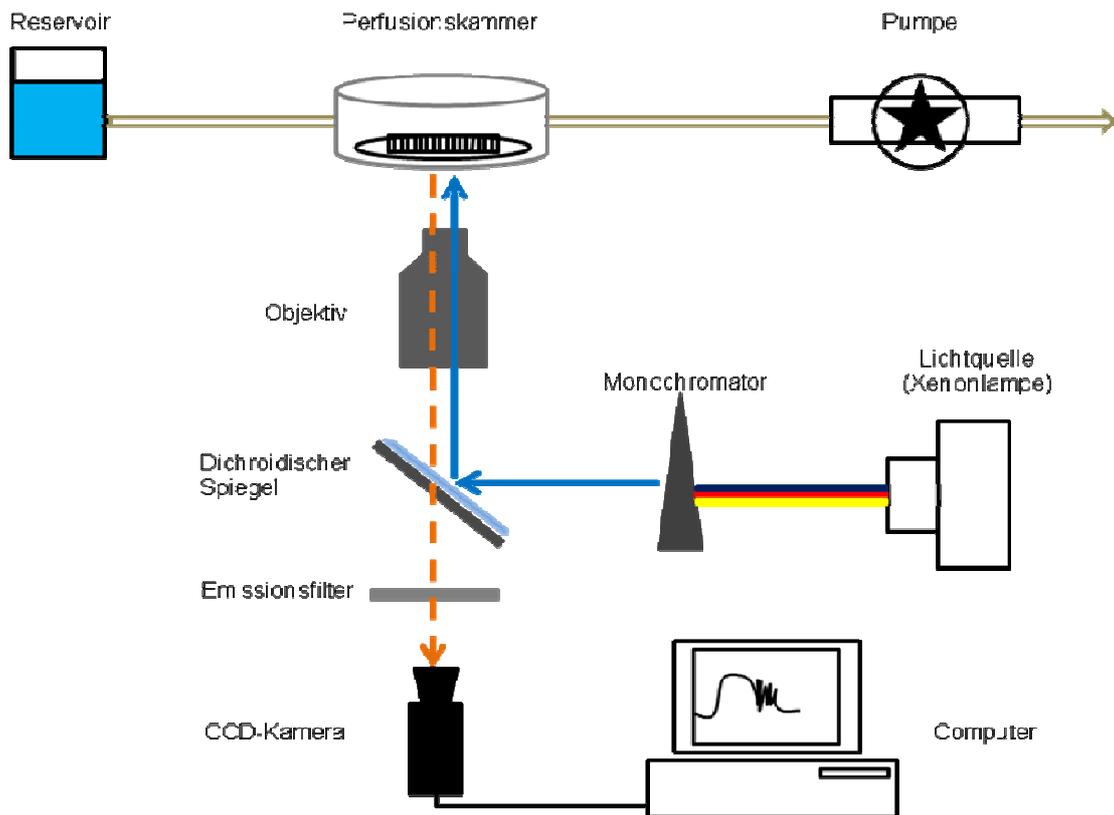


Abb. 3.2.2.1 Vereinfachte schematische Darstellung des Fluoreszenzmikroskopie-Systems. Der blaue durchgezogene Pfeil zeigt den Strahlengang des Anregungslichtes. Der orangefarbige gestrichelte Pfeil stellt den Strahlengang des von den Kardiomyozyten emittierten Lichtes dar.

Zur Bestimmung des Ca^{2+} -Speichers im Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) wurden die Zellen am Ende der Reperfusion mit 10 mM Koffein behandelt. Koffein lässt die Membran des SRs nicht mehr intakt und führt zu einer maximalen Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR, welches als transienter Koffein-Anstieg (Koffein-Peak) bezeichnet wird. Dieser wird als prozentualer Anstieg gegen die basale FURA-2 Ratio (100%) wiedergegeben.

3.2.3 Ermittlung der Rate des nekrotischen Zelltods

In einer Reihe von Ischämie-Reperfusion-Experimenten wurden die Zellen am Ende der Reperfusion von 5 Minuten Dauer mit den Fluoreszenzfarbstoffen Propidiumiodid und HOE behandelt. Anschließend wurden pro Schale zufällig ausgewählte 5 Gesichtsfelder ausgezählt. Die erhaltenen Werte werden als Nekroserate analysiert. Propidiumiodid ist ein DNA-Farbstoff, welcher nicht durch die intakte Zellmembran permeieren kann. HOE ist ebenso ein

DNA-Farbstoff und für die Zellmembran permeabel. Die mit HOE angefärbten intakten Kerne weisen auf die vitalen Zellen hin und die mit HOE gefärbten und gerundeten Zellkerne zeigen die apoptotischen beziehungsweise pro-apoptotischen Zellen. Nur die Zellkerne der Zellen mit beschädigter Zellmembran, ausschließlich nekrotischer Zellen, werden durch PI gefärbt. Die nekrotischen Zellen zeichnen sich bei einer Anregung von 360 nm Wellenlänge durch einen intensiv leuchtenden dunkelroten Zellkern aus.

3.3 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese) und Western-Blot

Um den Phosphorylierungszustand des Phospholambans und des Ryanodinrezeptors zu bestimmen, wurde diese Methode angewendet. SDS-PAGE basiert auf dem Auftrennen der Proteine im denaturierten Polyacrylamidgel unabhängig von ihrer Eigenladung proportional nach Molekulargewicht. Das Auftrennen geschieht durch die Beladung der Proteine mit dem doppelt negativ geladenen Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat). Hierfür verwendetes SDS (6X) enthielt 350 mM Tris, pH 6,8, 30% Glycerin, 3 mM SDS, 60 mM DTT, welches in Verdünnung 1:6 dem Proteingemisch hinzugegeben wurde. Das SDS bewirkt eine weitgehende Linearisierung der Proteine, indem die Proteine nach der Zugabe von SDS gekocht werden und die nicht kovalenten Bindungen dadurch unterbrochen werden. Um die Tertiärstrukturen der Proteine durch Thiolbindungen (Disulfidbrücken) unterbinden zu können, wurden die Proteinproben mit dem Auftragspuffer β -Mercaptoethanol und DTT behandelt (reduzierte Proben).

Für die Bestimmung der Größe der im Gel separierten Proteine kann ein Standard (Marker) verwendet werden, der Proteine bekannter Größe enthält. Durch den Marker kann des Weiteren auch festgestellt werden, ob die Proteine im Gel richtig aufgetrennt sind.

Um die nach der Elektrophorese im Gel aufgetrennten Proteine zu visualisieren, kann das SDS-PAGE Gel mit Coomassieblau oder mit Silber gefärbt werden, wobei es noch weitere empfindlichere Färbungsmethoden wie z.B. die Färbung mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen gibt. Alternativ zur Färbemethode können die Proteine aus dem Gel auf eine Membran (Nitrozellulose Membran) transferiert werden und dort entsprechend mit Hilfe von spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht werden (WESTERN BLOTTING).

Für die Detektion der Proteine hat Western Blot mit weitem Abstand die höchste Empfindlichkeit, der den Transfer der Proteine aus einem SDS-Gel auf eine Trägermembran

(Nitrozellulose Membran) ermöglicht. Dies geschieht in einem elektrischen Feld, in dem die mit SDS beladenen Proteine zur Anode wandern.

Bevor die Proteine auf Nitrozellulose Membran übertragen wurden, wurde die Membran in Blotpuffer equilibriert. Nach dem Transfer der Proteine auf Nitrozellulose Membran wurde der Blot mit 5%igem Milchpulver in TBS-T (wt/vol) abgeblockt. Nach der Inkubation mit primärem Antikörper über Nacht bei 4 °C und zunächst mit HRPO (Horseradisch Peroxidase) gekoppeltem sekundären Antikörper 1 Stunde lang bei Raumtemperatur erfolgte die Detektion der Peroxidase-Aktivität mit lumineszierendem Substrat ECL-Lösung (100 mM Tris-HCl (pH=8,5), 0,225 mM p-Coumarsäure, 1,25 mM Luminol, 0,009% (v/v) H₂O₂), indem die Spaltung des ECL-Substrates durch Peroxidase (Chemilumineszenz) mit CCD-Kamera und Computersoftware „Fusion CAPT™“ (Peqlab, Erlangen Deutschland) eingescannt wurde. Für die Quantifizierung der entstandenen Chemilumineszenz (Proteinbande) wurde das Softwareprogramm „Quantity One“ (Biorad, München Deutschland) angewendet.

Puffer- und Lösungszusammensetzungen

10 X Laufpuffer:	250 mM Tris, 2 M Glycin, 35 mM SDS, Dest. H ₂ O
Blotpuffer:	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, Dest. H ₂ O
TBS-T:	100 mM NaCl, 10 mM Tris, 0,2% (v/v) Tween 20, Dest. H ₂ O
Ponceau-Farbelösung:	0,5 g Ponceau S, 1% (v/v) Essigsäure, Dest. H ₂ O

Zusammensetzung der Western Blot Reagenzien

10%iges Trenngel:	4,30 ml Dest. H ₂ O, 3 ml 40% Acrylamid, 4,50 ml Puffer (1,5 M Tris, pH 8,8), 120 µl 10%iges SDS, 100 µl 10 X APS, 10 µl TEMED
-------------------	---

5%iges Trenngel: 5,80 ml Dest. H₂O, 1,5 ml 40% Acrylamid, 4,50 ml Puffer (1,5 M Tris, pH 8,8), 120 µl 10%iges SDS, 100 µl 10 X APS, 10 µl TEMED

Sammelgel: 2,95 ml Dest. H₂O, 0,50 ml 40% Acrylamid, 0,50 ml Puffer (1 M Tris, pH 6,8), 40 µl 10%iges SDS, 25 µl 10 X APS, 5 µl TEMED

Verwendete Primär Antikörper:

Anti-PLB Ser16 1:1000 in 2,5%igem Milchpulver in TBS-T (wt/vol)

Anti-PLB~P Ser16 1:500 in 2,5%igem Milchpulver in TBS-T (wt/vol)

Anti-RynR Ser2808 1:1000 in 2,5%igem Milchpulver in TBS-T (wt/vol)

Anti-RynR~P Ser2808 1:1000 in 2,5%igem Milchpulver in TBS-T (wt/vol)

10%iges Natriumazid wurde den verdünnten Primär Antikörper in 1:500 Verdünnung (vol/vol) dazugegeben.

Verwendeter Sekundär Antikörper:

Anti-Kaninchen IgG 1:5000 in 2,5%igem Milchpulver in TBS-T (wt/vol)

3.3.1 Proteinisolation von den Kardiomyozyten und Proteinmengenbestimmung

Die isolierten und nach 2 stündiger Anheftungsphase gewaschenen Kardiomyozyten wurden mit den entsprechenden Medien bei 37 °C wie folgt behandelt:

1. Normoxie

Inkubation mit dem normoxischen Medium (60 Min.)

2. Ischämie

Inkubation mit dem anoxischen Medium (30 Min.)

3.Reperfusion 5 Minuten

Inkubation mit dem anoxischen Medium (30 Min.) + Normoxie (5 Min.)

4.Reperfusion 10 Minuten

Inkubation mit dem anoxischen Medium (30 Min.) + Normoxie (10 Min.)

5. Reperfusion 5 Minuten mit Isoproterenol (100 nM)

Inkubation mit dem anoxischen Medium (30 Min.) + Normoxie mit 100 nM Isop (5 Min.)

6.Reperfusion 5 Minuten mit Isoproterenol (10 nM)

Inkubation mit dem anoxischen Medium (30 Min.) + Normoxie mit 10 nM Isop (5 Min.)

Abschließend zu den oben aufgezählten Versuchsschritten wurde das Inkubationsmedium abgesaugt und mit 1ml von auf 37 °C aufgewärmten PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen auf Eis gelegt und mit 100 µl SDS-Lysispuffer (1% SDS; 10 mM EDTA; 50 mM Tris; pH 8,1; Protease Inhibitor 1:500; Phosphatase Inhibitor Cocktail 1:200) lysiert. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen von den Kulturschalen vollständig abgeschabt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gestellt. Die Proben wurden anschließend mittels Ultraschall für 5 Sekunden je Probe aufgebrochen und 10 Minuten lang auf Eis inkubiert. Nach dem Inkubationsschritt erfolgte die Zentrifugation der Proben für 10 Minuten bei 14.000 rpm und 4 °C. Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und die Proteinmenge wurde nach BCATM Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Bonn) bestimmt. Dafür wurde eine Standardreihe von Rinderserumalbumin mit der Konzentration 0; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,32; 0,64; 1,28 und 2 mg/ml hergestellt. Die Proben wurden im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt (5µl Proteinlysate + 45µl dH₂O). Zur Messung wurden jeweils 10 µl von der Standardreihe und von den Proben in eine 96er Wellplatte pipettiert. Dazu wurde 200 µl Reagenzgemisch von dem Kit zugegeben und bei 37 °C für 20 Minuten inkubiert. Schließlich wurde das Proteingehalt am Mikroplatten-Reader in ng/ml vermessen.

3.4 PKA Aktivität-Assay

PKA Aktivität-Assay basiert auf der ELISA-Technik (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest), indem ein spezifisches synthetisches Peptid, welches in Wells einer 96er Mikrotiterplatte beschichtet ist, von PKA phosphoryliert wird und dieses wird im

phosphorylierten Zustand von einem polyklonalen primären Antikörper erkannt. Der polyklonale Primär Antikörper wird von einem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper gebunden. Gemäß der Farbentwicklung nach TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin) Zugabe wird die Reaktion mit Zugabe von Azid gestoppt und die Absorption mittels Mikrotiterplatte-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die Farbentwicklung ist proportional zu der PKA Phosphotransferase-Aktivität. Die genauere Durchführung des Versuches erfolgte nach Anleitung des PKA Kinase Aktivität Kits von der Firma Enzo Life Sciences.

Die Berechnung der relativen PKA Aktivität erfolgt nach der folgenden Formel:

$$\text{Relative PKA Aktivität} = \frac{(\text{Absorption}_{(\text{Probe})} - \text{Absorption}_{(\text{Blank})})}{\text{Proteinmenge in } \mu\text{g}}$$

Die relative Aktivität von PKA ist als $\text{Absorption}_{(450 \text{ nm})}/\mu\text{l}$ Einheit angegeben.

3.4.1 Proteinisolation von den Kardiomyozyten und Proteinmengenbestimmung

Die Kardiomyozyten, die zwei Stunden nach dem Ausplattieren mit CCT Medium gewaschen wurden, wurden mit den entsprechenden Medien wie folgt behandelt:

1. Normoxie

Inkubation mit dem normoxischen Medium (60 Min.)

2. Ischämie 30 Minuten

Inkubation mit dem anoxischen Medium (30 Min.)

3. Ischämie 45 Minuten

Inkubation mit dem anoxischen Medium (45 Min.)

4. Reperfusion 5 Minuten

Inkubation mit dem anoxischen Medium (30 Min.) + Normoxie (5 Min.)

5. Reperfusion 10 Minuten

Inkubation mit dem anoxischen Medium (30 Min.) + Normoxie (10 Min.)

6. Reperfusion 5 Minuten mit Isoproterenol (100 nM)

Inkubation mit dem anoxischen Medium (30 Min.) + Normoxie mit 100 nM Isop (5 Min.)

7. Reperfusion 10 Minuten mit Isoproterenol (100 nM)

Inkubation mit dem anoxischen Medium (30 Min.) + Normoxie mit 100 nM Isop (10 Min.)

8. Reperfusion 5 Minuten mit Isoproterenol (10 nM)

Inkubation mit dem anoxischen Medium (30 Min.) + Normoxie mit 10 nM Isop (5 Min.)

7. Reperfusion 10 Minuten mit Isoproterenol (10 nM)

Inkubation mit dem anoxischen Medium (30 Min.) + Normoxie mit 10 nM Isop (10 Min.)

Nach dem Absaugen des Inkubationsmediums wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen auf Eis gestellt und mit 100 µl Lysispuffer (20 mM MOPS; 50 mM β-glycerolphosphat; 50 mM Natriumfluorid; 1 mM Natriumvanadat; 5 mM EGTA; 2 mM EDTA; 1% NP40; 1 mM DTT; 1 mM Benzamidin; 1 mM PMSF und 10 µg/ml Leupeptin und Aprotinin) + 10 µl Bensonase (250 Units/ml) 10 Minuten lang lysiert. Nach der 10-minütigen Inkubationsperiode wurden die Zellen mittels Zellschaber von den Kulturschalen abgeschabt und in die 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Zelllysate wurden dann bei 13.000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und die Proteinkonzentrationen wurden nach dem BCATM Protein-Assay-Kit (Thermo Scientific, Bonn) determiniert. Für den Aktivitätstest der PKA wurden 4 µg Proteinlysate verwendet.

3.5 Statistik

Die Ergebnisse der Daten sind als Mittelwerte ± SEM von n verschiedenen Versuchen wiedergegeben. Statistische Vergleiche sind durch einfache Varianzanalyse (One Way Anova) unter Nutzung des Student-Newman-Keuls-Tests für post-hoc Analysen durchgeführt worden. Unterschiede mit $p < 0,05$ (*), $p < 0,005$ (**) und $p < 0,001$ (***) wurden als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Veränderung der Zellmorphologie und Kalziumhomöostase isolierter Kardiomyozyten während der Ischämie und Reperfusion

4.1.1 Exemplarischer Verlauf der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration isolierter Kardiomyozyten unter Kontrollbedingungen

Während der simulierten Ischämie wird die zytosolische Ca^{2+} -Überladung in den Kardiomyozyten beobachtet. Die Abb. 4.1.1.1 (links) zeigt einen exemplarischen Ca^{2+} -Verlauf in der 60-minütigen Ischämie als FURA-2-Ratio in relativen Einheiten dargestellt. Die Abb.4.1.1.1 (rechts) stellt die zytosolische Ca^{2+} -Erholung während der Reperfusion unter Kontrollbedingung dar. Diese Erholung lässt sich in drei Phasen einteilen. In der ersten Phase kommt es zu einer schnellen Reduktion der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration. Dies wird durch die Ca^{2+} -Aufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum (SR) über den SERCA-Rezeptor aus dem Zytosol gewährleistet. In der zweiten Phase entwickeln die Zellen die sogenannten Ca^{2+} -Oszillationen, die durch repetitive Ca^{2+} -Aufnahme ins SR aus dem Zytosol und Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR über Ryanodin Rezeptor bedingt sind.

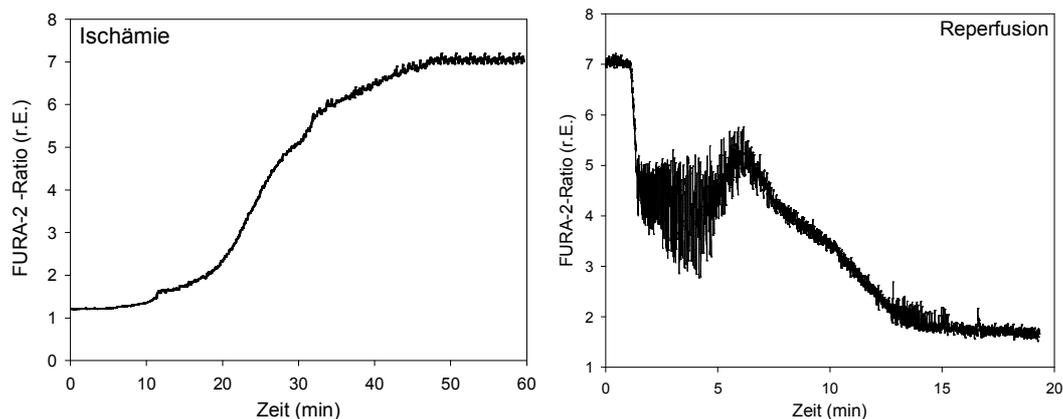


Abb. 4.1.1.1 Exemplarischer Verlauf der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration als FURA-2-Ratio (in relativen Einheiten) während der Ischämie (Abb. links) und der Reperfusion (Abb. rechts) unter Kontrollbedingung.

In der dritten Phase sinken die Frequenz und die Amplitude dieser Ca^{2+} -Oszillationen.

4.1.2 Exemplarischer Verlauf der Zellmorphologie isolierter Kardiomyozyten unter Kontrollbedingungen

Der Zeitverlauf der Veränderung der Zelllänge ist in Abb.4.1.2.1 während der Ischämie (links) und während der Reperfusion (rechts) unter Kontrollbedingungen exemplarisch dargestellt. Die Kardiomyozyten verkürzen sich nach 20 min Ischämie um etwa 30 % ihrer Ausgangslänge, was als Rigorkontraktur der Zelle bezeichnet wird.

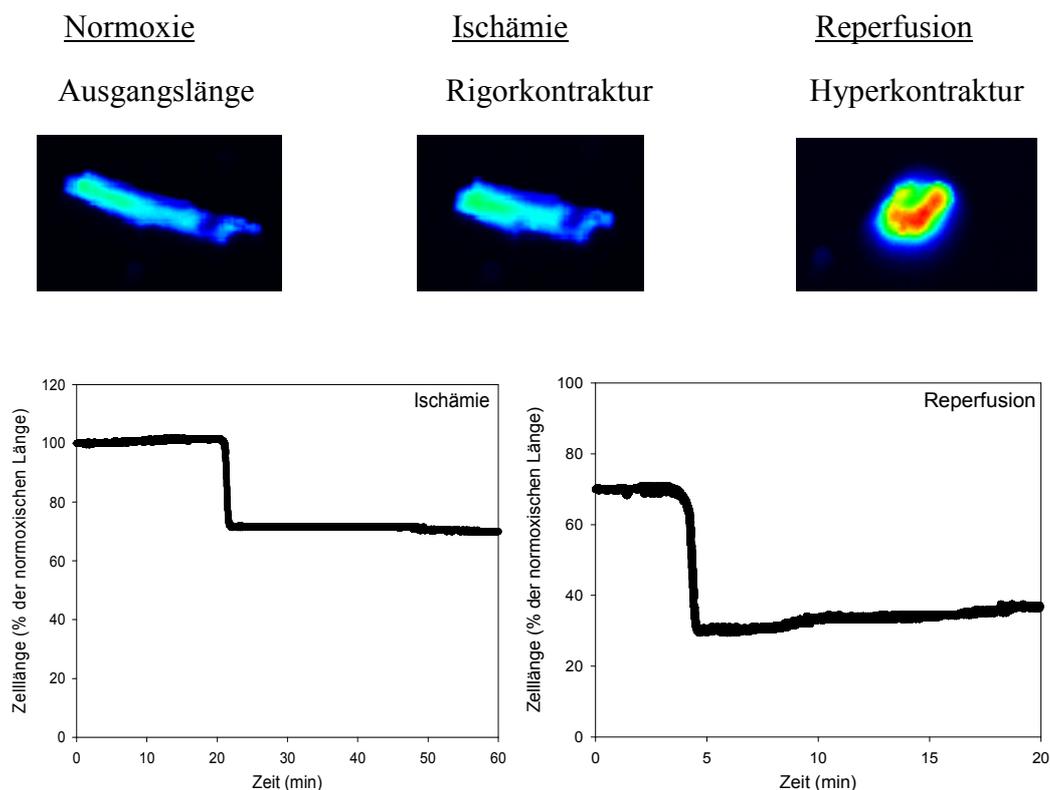


Abb. 4.1.2.1 Repräsentative Bilder kardialer Zellen (oben) und exemplarischer Verlauf der Zelllänge in % zur Ausgangslänge (unten) während der Ischämie (Abb. links) und der Reperfusion (Abb. rechts) unter Kontrollbedingung.

Während der Reperfusion zeigen die Zellen noch weitere Verkürzung um ca. 40% ihrer endanoxischen Zelllänge, was als Hyperkontraktur bezeichnet wird. Die Hyperkontraktur entsteht durch die Ca^{2+} -Oszillationen während der zweiten Phase der Reperfusion.

4.2 Einfluss β -adrenerger Rezeptor-Aktivierung auf reperfundierte Kardiomyozyten

4.2.1 Auswirkung β -adrenerger Rezeptor-Aktivierung auf den Anteil der hyperkontrahierten Zellen

Um eine quantitative Aussage darüber zu treffen, wie groß der durch Reperfusion verursachte Schaden auf Kardiomyozyten ist, wurde am Ende der Reperfusion die Analyse der Anzahl der hyperkontrahierten beziehungsweise stäbchenartigen Zellen (in %) durchgeführt. Abb. 4.2.1.1 zeigt den prozentualen Anteil der hyperkontrahierten Zellen. Die Reperfusion nach 60-minütiger Ischämie führte zu einer etwa 25%igen Erhöhung der Hyperkontraktur im Vergleich zur normoxischen Bedingung, welche wiederum durch Applikation von Isoproterenol signifikant abgesenkt wird. Die Anzahl der hyperkontrahierten Zellen durch die β -adrenerge Rezeptor-Aktivierung mit Isoproterenol ist nahezu wie die unter der normoxischen Bedingung.

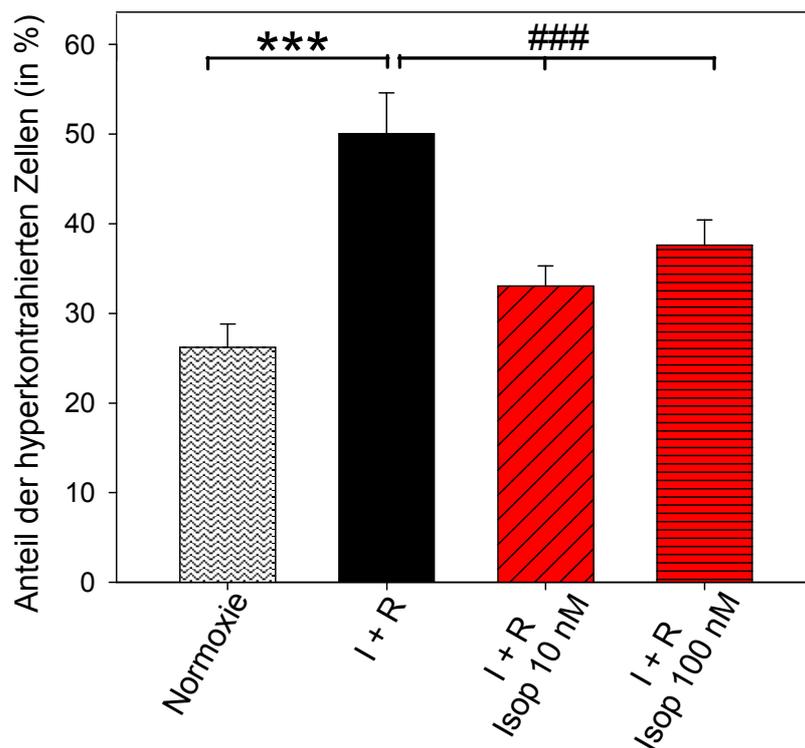


Abb. 4.2.1.1 Anteil der hyperkontrahierten Zellen (in %) am Ende der Reperfusion unter Kontrollbedingung und in Anwesenheit von Isoproterenol. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 350$ Zellen pro Bedingung aus verschiedenen Präparationen; *** $p < 0,001$ vs. Normoxie; ### $p < 0,001$ vs. Ischämie + Reperfusion).

4.2.2 Effekt β -adrenerger Rezeptor-Aktivierung auf den Anteil der stäbchenartigen Zellen

Die folgende Abbildung stellt die Anzahl der stäbchenartigen Zellen (in %) am Ende der Reperfusion dar. Die Applikation von Isoproterenol führte zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl stäbchenartiger Zellen. Durch die Addition von hyperkontrahierten und stäbchenartigen Zellen ergibt sich die Summe 100% als gesamte Ausgangs-Zellzahl.

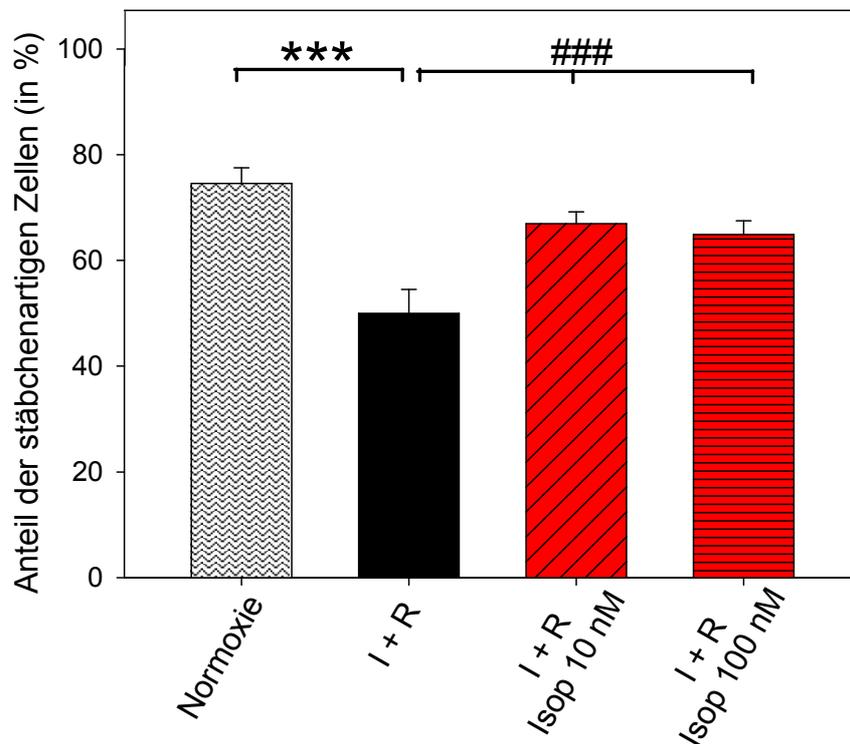


Abb. 4.2.2.1 Anteil der stäbchenartigen Zellen (in %) am Ende der Reperfusion unter Kontrollbedingung und in Anwesenheit von Isoproterenol. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 350$ Zellen pro Bedingung aus verschiedenen Präparationen; *** $p < 0,001$ vs. Normoxie; ### $p < 0,001$ vs. Ischämie + Reperfusion).

4.2.3 Einfluss β -adrenerger Rezeptor-Aktivierung auf die Entwicklung der Nekrose

Die folgende Abbildung zeigt, dass die Reperfusion nach einer 60-minütigen Ischämie unter Kontrollbedingung den Anteil an nekrotischen Zellen signifikant erhöhte. Die Behandlung der

Kardiomyozyten mit Isoproterenol während der Reperfusion reduzierte die Entwicklung des reperfusionsbedingten nekrotischen Zelltodes signifikant.

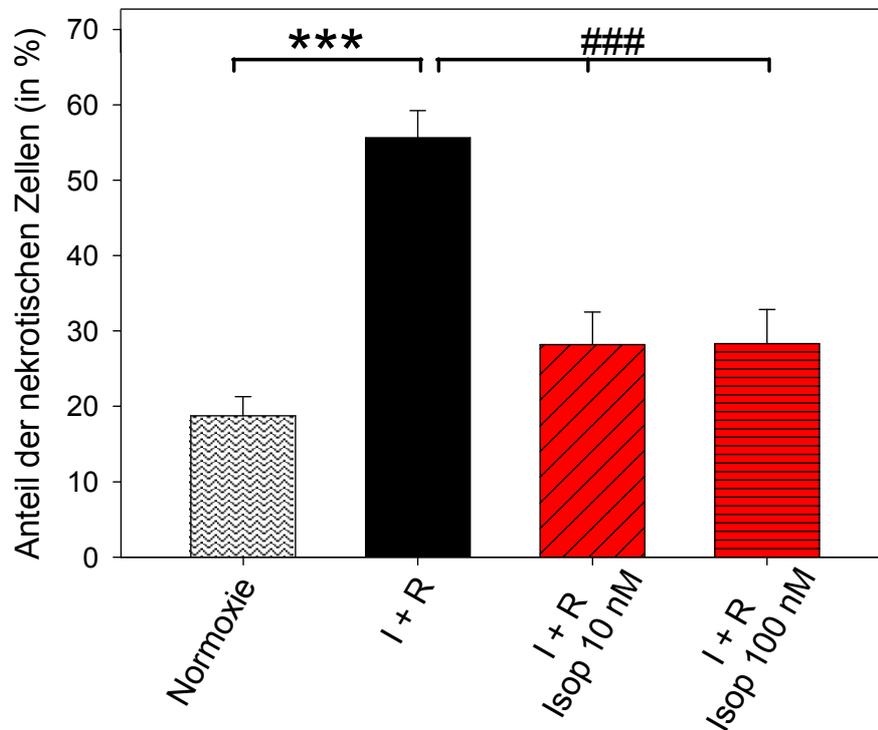


Abb. 4.2.3.1 Anteil der nekrotischen Zellen (in %) am Ende der Reperfusion unter Kontrollbedingung und bei Anwesenheit des Isoproterenol. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 350$ Zellen pro Bedingung aus verschiedenen Präparationen; *** $p < 0,001$ vs. Normoxie; ### $p < 0,01$ vs. Ischämie + Reperfusion).

4.2.4 Einfluss β -adrenerger Rezeptor-Aktivierung auf die Reperfusion-induzierte Ca^{2+} -Oszillationen während der Reperfusion

In einer Reihe von Experimenten wurde das Ausmaß der Frequenz und der Amplitude der Ca^{2+} -Oszillationen untersucht, welche für die Entwicklung der Hyperkontraktur verantwortlich sind. Abb. 4.2.4.1 zeigt einen exemplarischen zeitlichen Verlauf der Ca^{2+} -Konzentration während der Reperfusion als FURA-2-Ratio unter Kontrollbedingung und bei Applikation von Isoproterenol (10 nM) (oben) und des Weiteren die repräsentativen Kardiomyozytenbilder (unten). In Anwesenheit des β -adrenergen Rezeptor-Aktivators in der Reperfusion wurden Frequenz und Amplitude der Ca^{2+} -Oszillationen reduziert, wie in Abb. 4.2.4.1 im Hinblick auf Einzelzellmessungen exemplarisch dargestellt ist.

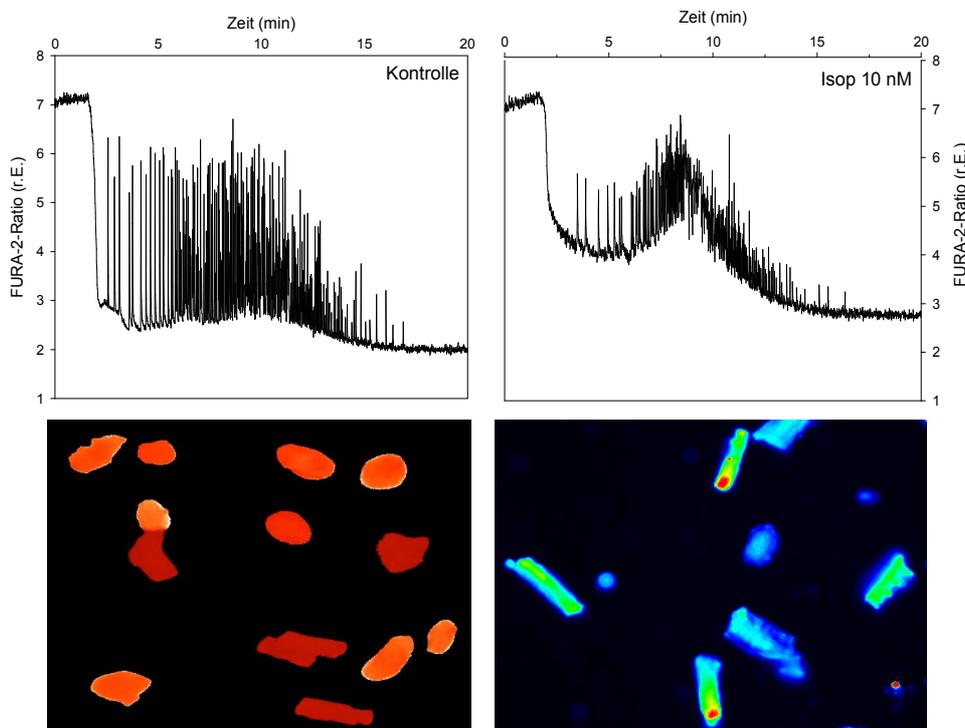


Abb. 4.2.4.1 Exemplarischer Verlauf der Ca^{2+} -Oszillationen während der Reperfusion unter Kontrollbedingung und in Anwesenheit von Isoproterenol (10 nM) (oben); repräsentative Bilder der Kardiomyozyten am Ende der Reperfusion (unten).

4.2.4.1 Einfluss β -adrenerger Rezeptor-Aktivierung auf die Frequenz der Ca^{2+} -Oszillationen

Die folgende Abbildung stellt die Frequenz der Ca^{2+} -Oszillationen während der Reperfusion unter Kontrollbedingung und in Anwesenheit von Isoproterenol dar. Nach der quantitativen Analyse der Messungen zeigte die Aktivierung des β -adrenergen Rezeptors mit 10 nM Isoproterenol während der Reperfusion eine signifikante Reduktion der Ca^{2+} -Oszillationen (Abb. 4.2.4.1.1).

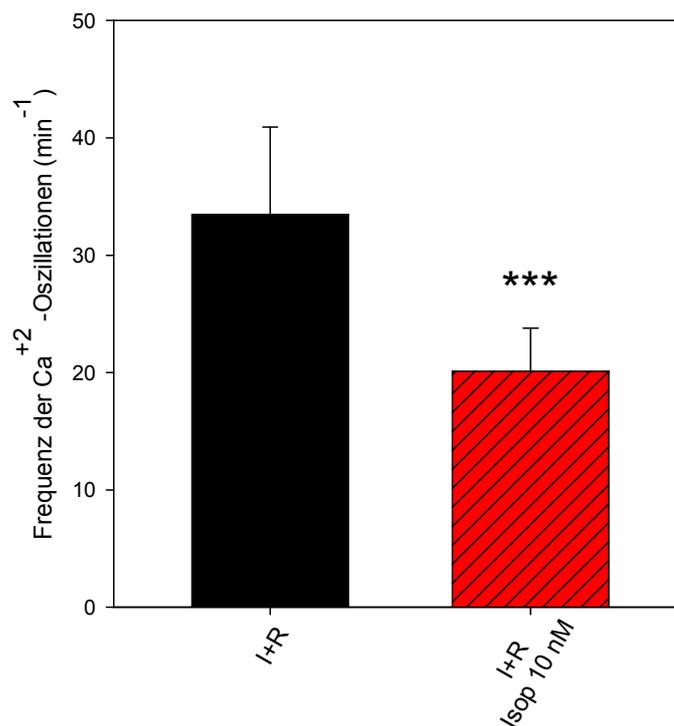


Abb. 4.2.4.1.1 Frequenz der Ca^{2+} -Oszillationen (min^{-1}) in der 5. bis 8. Minute der Reperfusion unter Kontrollbedingung und in Anwesenheit von Isoproterenol (10 nM). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 25$ Zellen pro Bedingung aus verschiedenen Präparationen; *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle: Ischämie + Reperfusion).

4.2.4.2 Einfluss β -adrenerger Rezeptor-Aktivierung auf die Amplitude der Ca^{2+} -Oszillationen

Simultan zur Frequenzanalyse der Ca^{2+} -Oszillationen wurde die Wirkung von Isoproterenol auf die Amplitude der Ca^{2+} -Oszillationen untersucht. Wie in Abb. 4.2.4.2.1 dargestellt, reduziert die β -adrenerge Rezeptor-Aktivierung die Amplitude der Oszillationen signifikant.

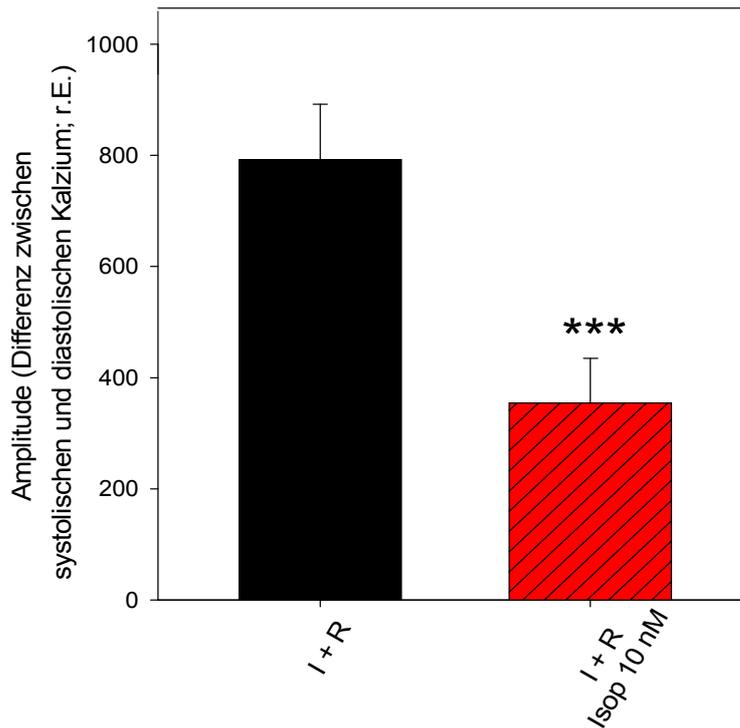


Abb. 4.2.4.2.1 Amplitude der Ca^{2+} -Oszillationen in der 5. bis 8. Minute der Reperfusion unter Kontrollbedingung und in Anwesenheit von Isoproterenol (10 nM). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 25$ Zellen pro Bedingung aus verschiedenen Präparationen; *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle: Ischämie + Reperfusion)

4.3 Aktivitätszustand der Protein Kinase A in Ischämie und Reperfusion

4.3.1 Aktivitätszustand der Protein Kinase A in Ischämie und Reperfusion unter Kontrollbedingung

Um die Aktivität der PKA zu definieren, wurde das PKA-Aktivitäts-Assay-Kit angewendet. In Abb. 4.3.1.1 ist die PKA-Aktivität unter Normoxie, Ischämie und Reperfusion unter der Kontrollbedingung dargestellt. Die Ischämie führte zu einer signifikanten Verminderung der PKA Aktivität. In der kritischen Phase der Reperfusion (5. Minute) ist die PKA Aktivität auf dem basalen Niveau. Allerdings ist ab der 10. Minute der Reperfusion eine Tendenz in Richtung normoxische Aktivität von PKA zu sehen, wobei diese Aktivität dennoch signifikant zur normoxischen Bedingung vermindert ist.

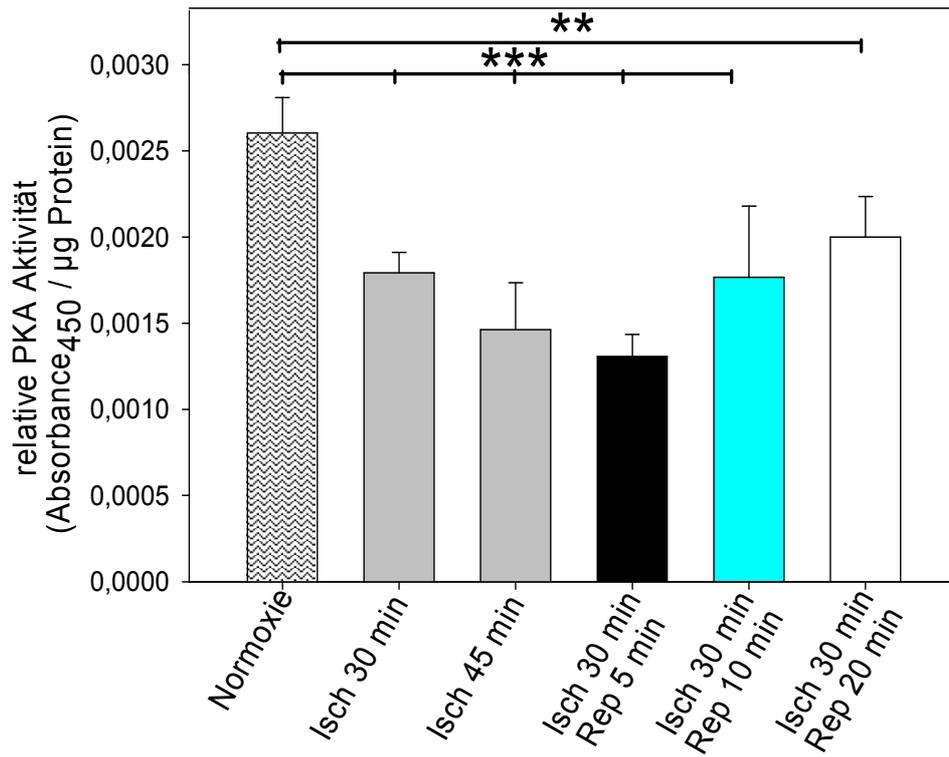


Abb. 4.3.1.1 Relative PKA Aktivität während der Ischämie und Reperfusion als Absorbtion₄₅₀ / µg Protein unter Kontrollbedingung. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM (n≥3 aus verschiedenen Präparationen; ** p < 0,005 vs. Normoxie; * p < 0,001 vs. Normoxie).**

4.3.2 Auswirkung β -adrenerger Rezeptor-Aktivierung auf die PKA Aktivität während der kritischen Phase der Reperfusion

Die folgenden Abbildungen (Abb. 4.3.2.1 und Abb. 4.3.2.2) zeigen den Aktivitätszustand der PKA unter normoxischen Bedingungen und der Reperfusion in Abwesenheit oder Anwesenheit von Isoproterenol. Die verminderte Aktivität der PKA in der 5. Minute der Reperfusion konnte durch Zugabe von Isoproterenol signifikant gesteigert werden. Dieser Effekt ist auch in der 10. Minute der Reperfusion zu beobachten.

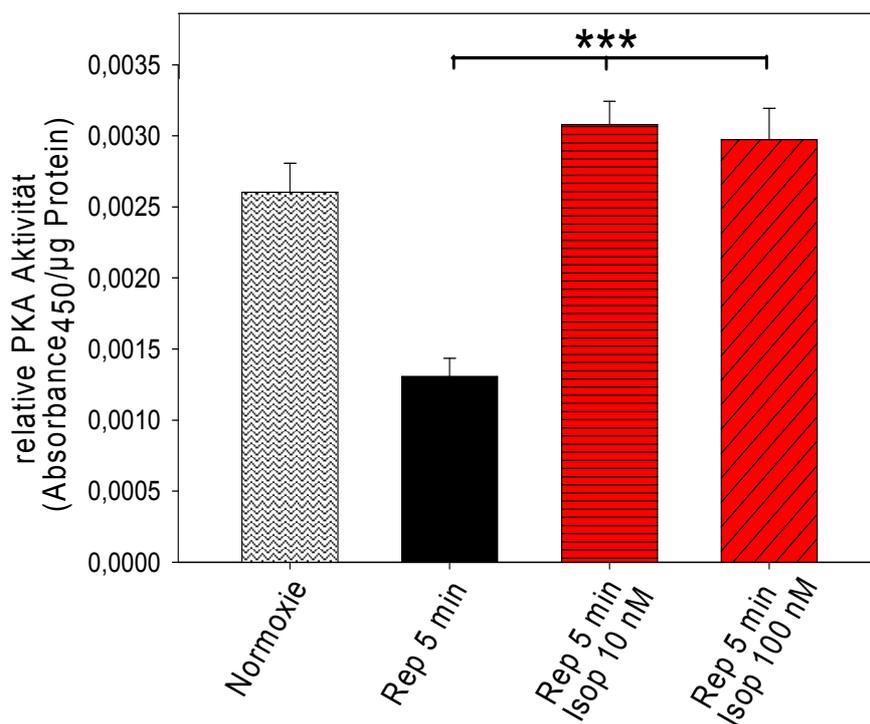


Abb. 4.3.2.1 Relative PKA Aktivität in der 5. Minute der Reperfusion als Absorbtion₄₅₀ / μ g Protein in Anwesenheit von Isoproterenol und unter Kontrollbedingung. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 3$ aus verschiedenen Präparationen; *** $p < 0,001$ vs. Reperfusion 5 min).

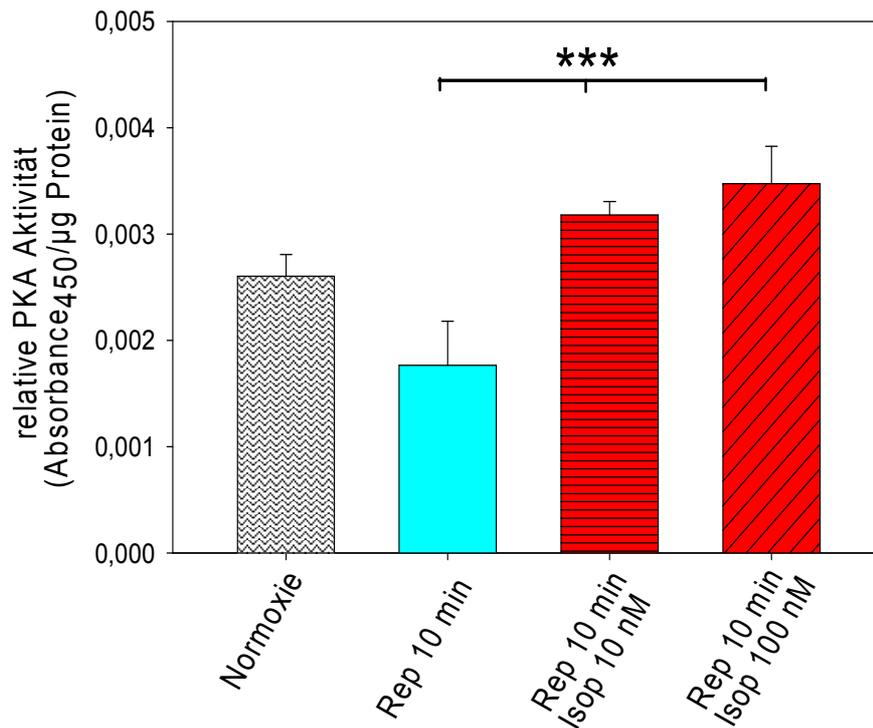


Abb. 4.3.2.2 Relative PKA Aktivität in der 10. Minute der Reperfusion als Absorbtion₄₅₀ / µg Protein in Anwesenheit von Isoproterenol und unter Kontrollbedingung. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM (n≥3 aus verschiedenen Präparationen; * p < 0,001 vs. Reperfusion 10 min).**

4.4 Der Einfluss β-adrenerger Rezeptor-Aktivierung auf die Ca²⁺-Freisetzungskanäle am sarkoplasmatischen Retikulum

4.4.1 Die Beeinflussung der Frequenz der Ca²⁺-Oszillationen

Die quantitative Analyse der Einzelzellmessungen zeigten, dass die Aktivierung der PKA mit Isoproterenol, Ryanodin Rezeptor Inhibierung mit Ryanodin die Frequenz der Ca²⁺-Oszillationen signifikant reduzieren. Die gleichzeitige Applikation von Isoproterenol mit Ryanodin verminderte auch die Frequenz dieser Oszillationen signifikant. Wie in Abb. 4.4.1.1 dargestellt ist, verstärkte die gleichzeitige Applikation von Ryanodin den Effekt des Isoproterenols.

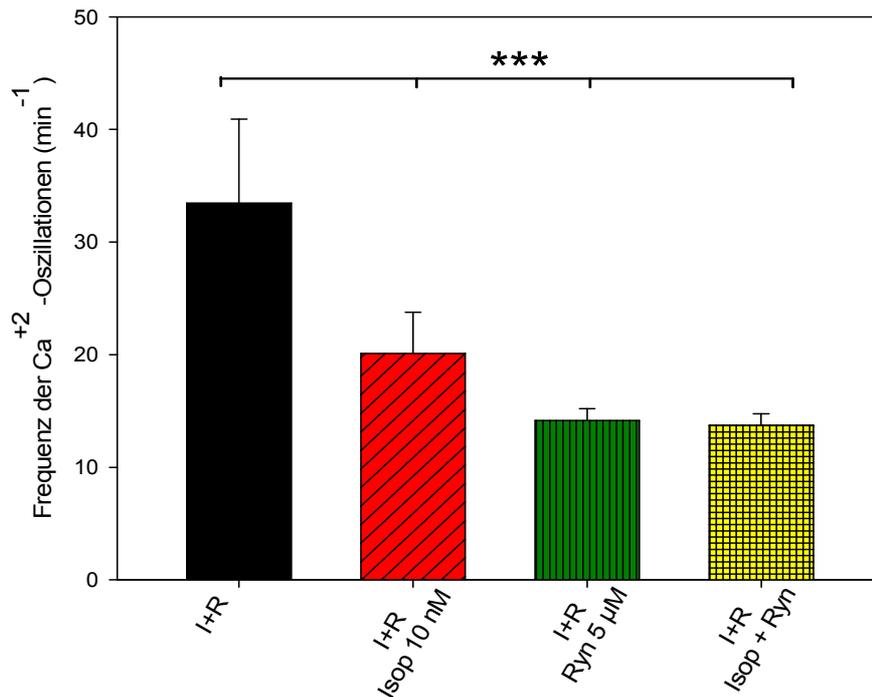


Abb. 4.4.1.1 Frequenz der Ca²⁺-Oszillationen (min⁻¹) in der 5. bis 8. Minute der Reperfusion unter Kontrollbedingung, in Anwesenheit von Isoproterenol (10 nM), in Anwesenheit von Ryanodin (5 μM) und Isoproterenol (10 nM) + Ryanodin (5 μM). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM (n ≥ 25 Zellen pro Bedingung aus verschiedenen Präparationen; *** p < 0,001 vs. Kontrolle: Ischämie + Reperfusion).

4.4.2 Die Beeinflussung der Amplitude der Ca²⁺-Oszillationen

Es wurde gezeigt, dass die Kardiomyozyten durch Hemmung der Reperfusion-induzierten Ca²⁺-Oszillationen gegen die Hyperkontraktur geschützt werden können (Abdallah et al. 2005, 2006, 2011). Die folgende Abbildung zeigt die statistische Auswertung der Amplitude der Ca²⁺-Oszillationen in der 5. bis 8. Minute der Reperfusion. Das Ausmaß der Amplitude nimmt durch die Applikation von Isoproterenol, Ryanodin und durch die gleichzeitige Gabe von Isoproterenol mit Ryanodin parallel zur Verminderung der Frequenz dieser Oszillationen signifikant ab.

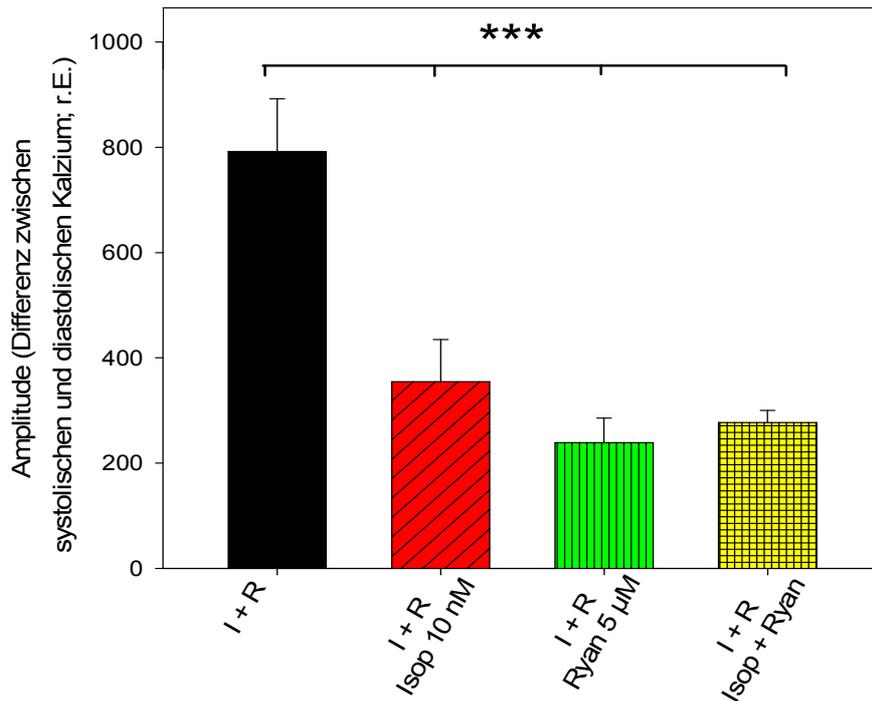


Abb. 4.4.2.1 Amplitude der Ca^{2+} -Oszillationen in der 5. bis 8. Minute der Reperfusion unter Kontrollbedingung, in Anwesenheit von Isoproterenol (10 nM), in Anwesenheit von Ryanodin (5 μM) und Isoproterenol (10 nM) + Ryanodin (5 μM). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 25$ Zellen pro Bedingung aus verschiedenen Präparationen; *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle: Ischämie + Reperfusion).

4.5 Die Beeinflussung der Hyperkontraktur

Um die Wirkung des PKA Aktivators Isoproterenol auf das Ausmaß der Hyperkontraktur zu untersuchen, wurde in einer Reihe von Experimenten die Zelllänge während der Ischämie und der Reperfusion gemessen. Die Ischämie selbst verursachte eine Zellverkürzung (Rigorkontraktur) und die Reperfusion führte zu einer pathophysiologischen Zellverkürzung (Hyperkontraktur) mit dem Beginn eintretender Ca^{2+} -Oszillationen. Abb. 4.5.1 zeigt die Zelllänge am Ende der 20-minütigen Reperfusion in % der end-ischämischen Zelllänge. Die Aktivierung der PKA schützt die Zellen gegen Reperfusion-induzierte Hyperkontraktur. Die Anwesenheit von Ryanodin und die gleichzeitige Applikation von Isoproterenol und Ryanodin führten zu einer signifikanten Reduktion des Ausmaßes der Hyperkontraktur.

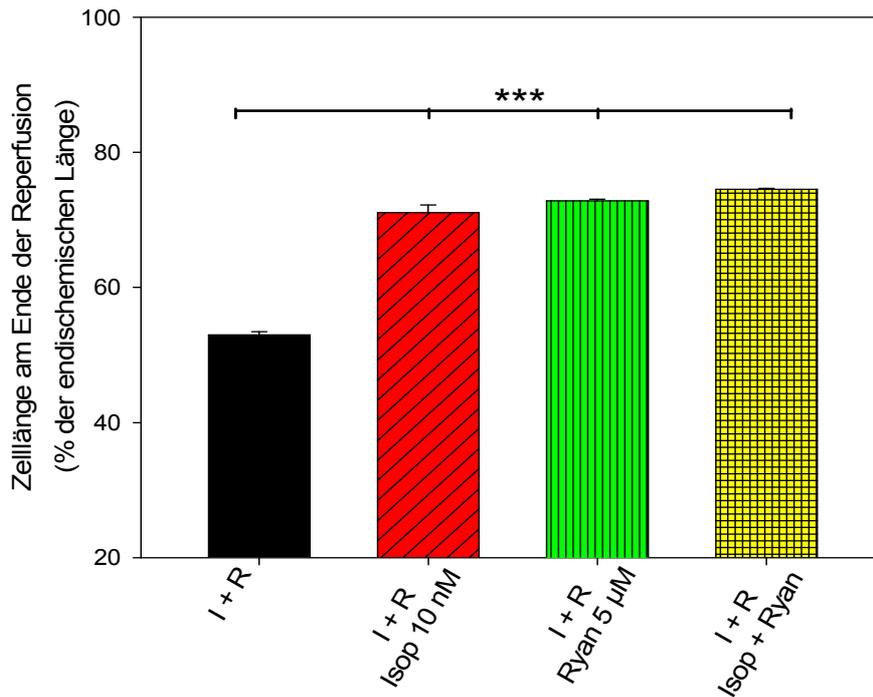


Abb. 4.5.1 Zelllänge am Ende der Reperfusion in % der endanoxischen Länge unter Kontrollbedingung, in Anwesenheit von Isoproterenol (10 nM), in Anwesenheit von Ryanodin (5 µM) und Isoproterenol (10 nM) + Ryanodin (5 µM). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM (n ≥ 25 Zellen pro Bedingung aus verschiedenen Präparationen; * p < 0,001 vs. Kontrolle: Ischämie + Reperfusion).**

4.6 Der Einfluss β-adrenerger Rezeptor-Aktivierung auf die Funktion des sarkoplasmatischen Retikulums

Die bisher aufgeführten Abbildungen bezüglich Kalzium zeigen eine Reduktion der Reperfusion-induzierten pathophysiologischen Ca²⁺-Oszillationen. Dies lässt die Hypothese aufstellen, dass diese Reduktion auf die Speicherkapazität des sarkoplasmatischen Retikulums zurückzuführen ist. Um den Ca²⁺-Speicher im SR zu untersuchen, wurden die Zellen am Ende der Reperfusion mit 10 mM Koffein behandelt. Denn zurückzuführen auf Arbeiten von Joung et al. 2009, Gergs et al. 2011 und Lukyanenko et al. 2001, führt Koffein zu einer maximalen Freisetzung von Kalzium aus dem SR.

Abb. 4.6.1 zeigt die exemplarische Darstellung des Ca²⁺-Peaks nach Zugabe von 10 mM Koffein am Ende der Reperfusion, was auch als Koffein-Peak bezeichnet wird. Dieser Anstieg lässt eine Aussage über den Status des Kalziumspeichers zu. Die durchgezogene

Linie bezieht sich auf die Kontrollbedingung und die gestrichelte Linie verweist auf den Anstieg in Folge der Behandlung mit Isoproterenol.

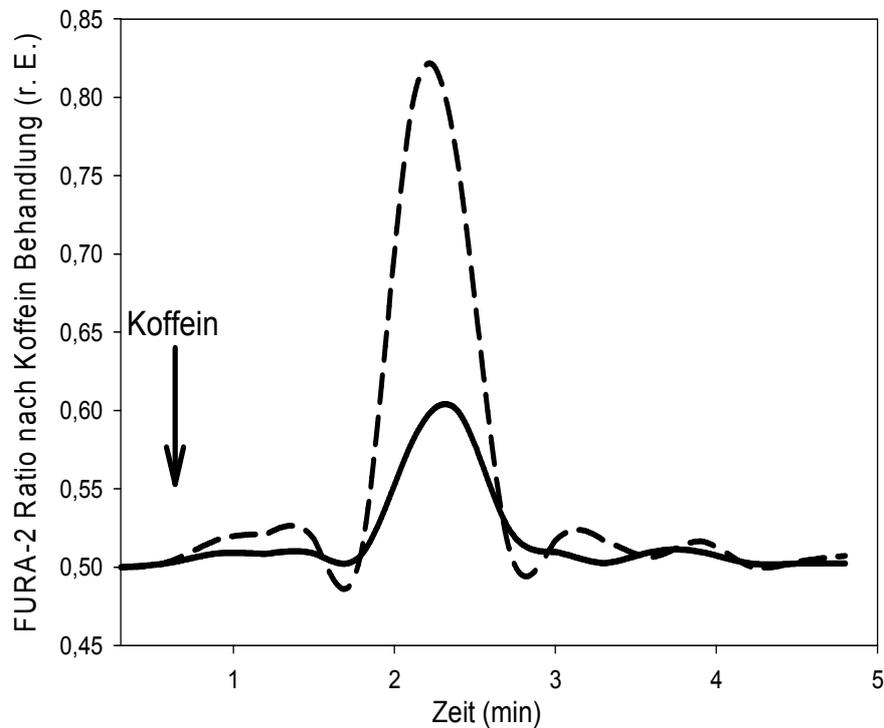


Abb. 4.6.1 Exemplarischer Verlauf des Anstiegs des zytosolischen Kalziums nach der Koffein Behandlung am Ende der Reperfusion unter Kontrollbedingung (durchgezogene Linie) und bei Anwesenheit von Isoproterenol (gestrichelte Linie).

Die folgende Abbildung (Abb. 4.6.2) stellt den prozentualen Anstieg des zytosolischen Kalziums nach Zugabe von Koffein dar. Dieser Anstieg bezieht sich auf die basale Kalziumkonzentration von 100%. Sowohl die Aktivierung von PKA als auch die Inhibierung des Ryanodin Rezeptors erhöht die Konzentration des gespeicherten Kalziums im SR signifikant. Die Zusammensetzung von Isoproterenol und Ryanodin zeigte zudem eine additive Steigerung des Kalziumspeichers im SR, was auch im Vergleich zur Kontrollbedingung signifikant ist. Allerdings ist dieser Anstieg nicht signifikant zur jeweiligen Behandlung.

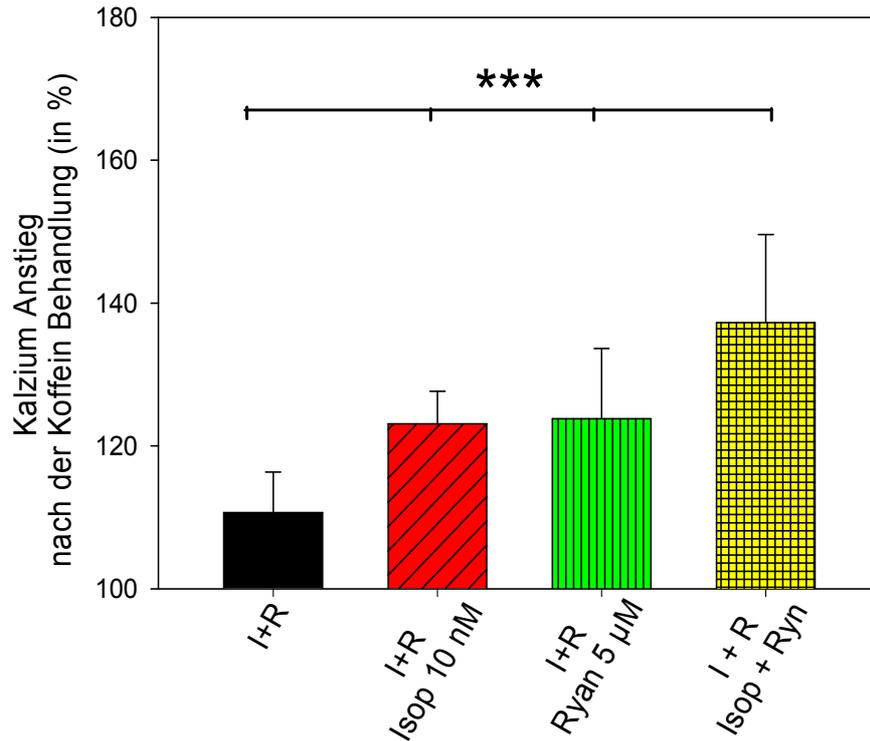


Abb. 4.6.2 Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration durch die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR nach Koffein Behandlung unter Kontrollbedingung, in Anwesenheit von Isoproterenol (10 nM), von Ryanodin (5 μM) oder Isoproterenol (10 nM) + Ryanodin (5 μM). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 25$ Zellen pro Bedingung aus verschiedenen Präparationen; *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle: Ischämie + Reperfusion)

4.7 Phosphorylierungsstatus des Phospholambans an Ser16 während der Ischämie und der Reperfusion in Anwesenheit β -adrenerger Rezeptor-Aktivierung

Der Phosphorylierungszustand des Phospholambans (PLB) wurde mittels Western Blot Analyse untersucht. In Abb. 4.7.1 sind die repräsentativen Western-Blots von P-PLB und gesamt-PLB (A) und die quantitative

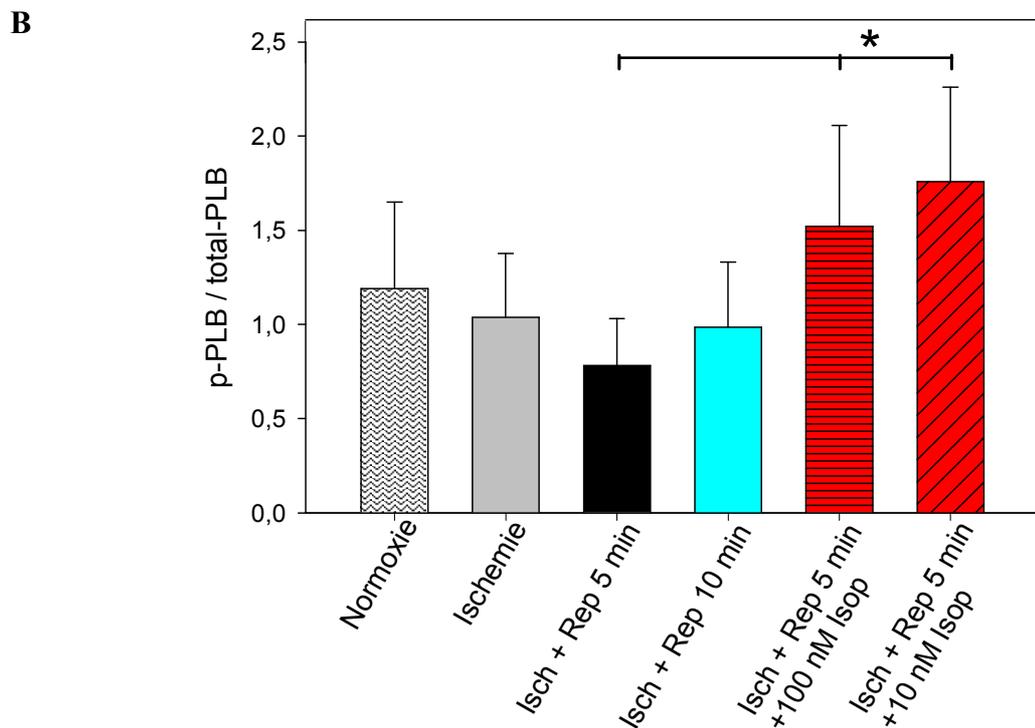
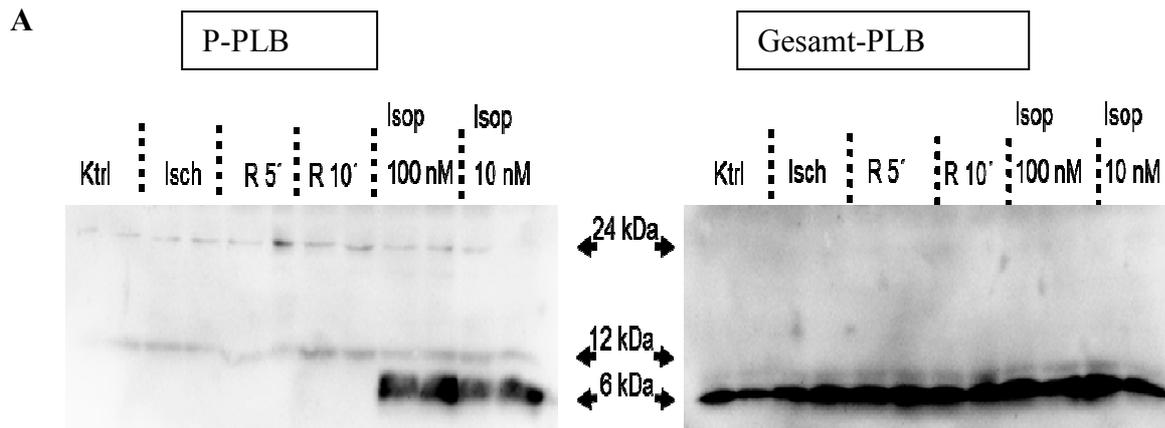


Abb. 4.7.1 (A) Repräsentative Western-Blots vom P-PLB und gesamten PLB.

(B) Densitometrische Auswertung der Western-Blots. Phosphorylierung des Phospholambans an Ser16 bezogen auf das gesamte Phospholamban unter den Bedingungen: Ischämie, Reperfusion und Reperfusion in Anwesenheit von Isoproterenol 10 nM und 100 nM. Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM (n=3; * p < 0,05 vs. Reperfusion 5 min).

Analyse dieser Blots (B) dargestellt. In der kritischen Phase der Reperfusion ist eine Verminderung der PLB-Phosphorylierung zu sehen, welche wiederum durch PKA Aktivierung mit Isoproterenol signifikant erhöht werden kann.

4.7.1 Phospholamban Phosphorylierung in Anwesenheit β -adrenerger Rezeptor-Aktivierung oder von spezifischen PKA Aktivators

Wie in Abb. 4.7.1 dargestellt, führt die Behandlung mit Isoproterenol zu einer signifikant erhöhten Phosphorylierung des SERCA-Regulatorproteins Phospholamban. Um zu untersuchen, ob Phospholamban durch PKA-Aktivität phosphoryliert wird, wurde die Phosphorylierung des Phospholambans durch den spezifischeren PKA-Aktivator „8-Bromo-cAMP“ und durch den spezifischen PKA-Inhibitor „Rp-8-CPT-cAMPs“ und Isoproterenol unter normoxischen Bedingungen verglichen. In Abb. 4.7.1.1 sind die repräsentativen Western-Blots (A) und die quantitative densitometrische Analyse der Blots (B) dargestellt.

Weiterhin führt die Behandlung der Kardiomyozyten mit 10 nM Isoproterenol und 5 μ M 8-Bromo-cAMP zu einer signifikanten Erhöhung der PLB Phosphorylierung. Dabei war die durch Isoproterenol verursachte PLB Phosphorylierung durch 10-minütige Vorbehandlung der Zellen mit RT-8-CPT-cAMPs (Inhibitor) signifikant reduziert.

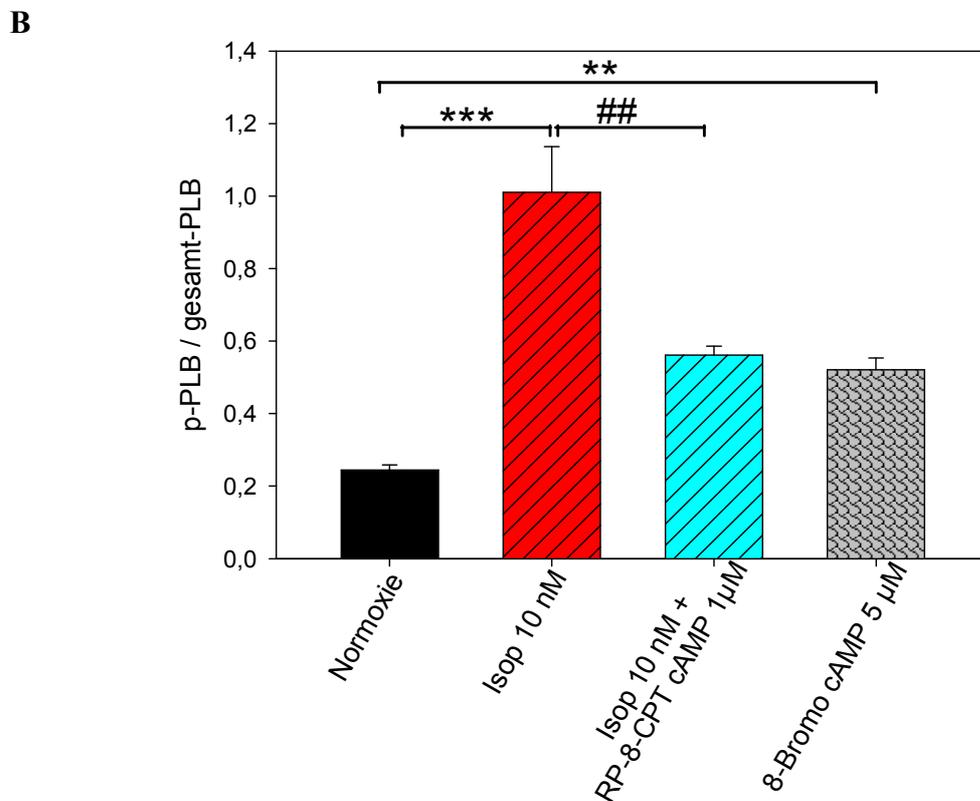
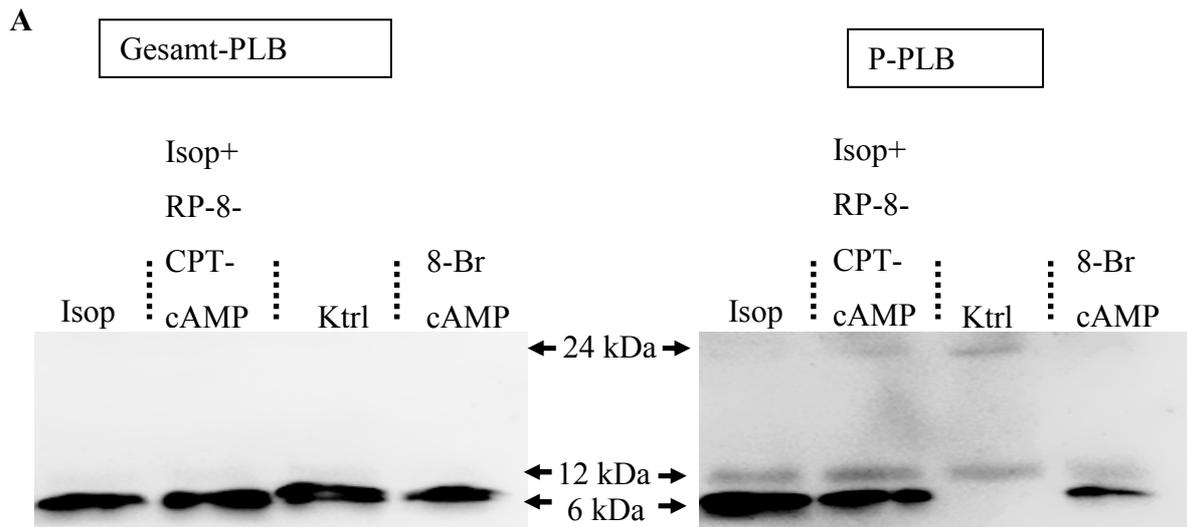


Abb. 4.7.1.1 (A) Repräsentative Western-Blots vom P-PLB und gesamten PLB.

(B) Densitometrische Auswertung der Western-Blots. Phosphorylierung des Phospholambans an Ser16 bezogen auf das gesamte Phospholamban unter den Bedingungen: Normoxie, Normoxie in Anwesenheit von Isop 10 nM, in Anwesenheit von Isop 10 nM + RP-8-CPT-cAMP 1 μM und in Anwesenheit von 8-Bromo cAMP 5 μM. Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM (n=3; * p < 0,001 und ** p < 0,005 vs. Normoxie und ## p < 0,005 vs. Isop 10 nM).**

4.8 Phosphorylierung des Ryanodin Rezeptors an Ser2808 während der Ischämie und Reperfusion und bei Anwesenheit von Isoproterenol

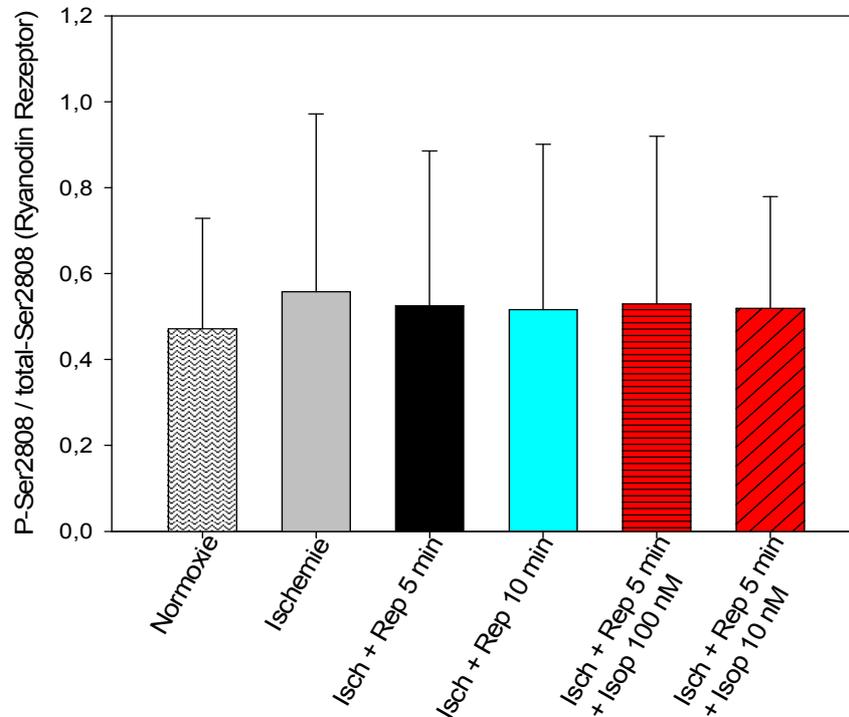


Abb. 4.8.1 Densitometrische Auswertung der Western-Blots. Phosphorylierung des Ryanodinrezeptors an Ser2808 bezogen auf das gesamte Ser2808 unter den Bedingungen: Ischämie, Reperfusion und Reperfusion in Anwesenheit von Isoproterenol 10 nM und 100 nM. Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (n=3; keine Signifikanz).

Die oben dargestellte Abb. 4.8.1 zeigt die quantitative Analyse der Phosphorylierung des Ryanodin Rezeptors an Ser2808. Es konnte keine signifikante Änderung der Ser2808-Phosphorylierung während Ischämie, Reperfusion und Reperfusion bei gleichzeitiger Isoproterenol Behandlung gegenüber der Normoxie festgestellt werden.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivität der Protein Kinase A (PKA) unter simulierten Ischämie-Reperfusion-Bedingungen in isolierten Kardiomyozyten adulter Ratten untersucht. Für die Aktivierung des β -adrenergen Rezeptors wurde während der Reperfusion Isoproterenol verwendet. Die Zusammenfassung der Befunde ist wie folgt:

1. β -adrenerge Rezeptor-Aktivierung mit Isoproterenol schützt die Kardiomyozyten vor Reperfusion-induzierter Hyperkontraktur und nekrotischem Zelltod. Dieser protektive Effekt wird durch die Reduktion der Frequenz und der Amplitude Reperfusionsinduzierter Ca^{2+} -Oszillationen herbeigeführt, indem die Ca^{2+} -Aufnahme aus dem Zytosol in das SR verstärkt wird.
2. Der Aktivitätszustand der PKA ist während der Ischämie und der kritischen Frühphase der Reperfusion signifikant reduziert und konnte durch Behandlung mit Isoproterenol signifikant erhöht werden.
3. Während der Reperfusion ist die Phosphorylierung des SERCA Regulatorproteins Phospholamban durch die β -adrenerge Rezeptor-Aktivierung erhöht, wobei der Phosphorylierungszustand des Ryanodin Rezeptors (RynR) unter Ischämie, Reperfusion und Reperfusion in Anwesenheit β -adrenerger Rezeptor-Aktivierung unverändert bleibt.

Frühere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe untersuchten bereits den Mechanismus der Hyperkontraktorentwicklung während der Reperfusion in Myokardzellen. Diese Studien zeigten, dass die Ischämie alleine zu einer zytosolischen Ca^{2+} -Überladung führt. Dies geschieht dadurch, dass die aerobe Energiegewinnung in Kardiomyozyten während der Ischämie auf anaerob umgestellt wird. Das durch die anaerobe Energiegewinnung produzierte ATP deckt den eigentlichen ATP-Bedarf nicht. Durch die Erhöhung des Laktats, das Produkt der anaeroben Energiegewinnung, entsteht eine Azidose (Owens et al. 1996). Dadurch wird das Schlüsselenzym der Glykolyse, die Phosphofruktokinase, inhibiert. Das wiederum hat zur

Folge, dass alle ATP-abhängigen Mechanismen, unter anderem die Aktivität der ATP-abhängigen Kanäle, nicht mehr aufrechterhalten werden. Da die Na^+/K^+ ATPase in Abwesenheit von ATP nicht mehr funktionstüchtig ist, entsteht eine Na^+ -Überladung im Zytosol, wodurch es über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher dann zu einer zytosolischen Ca^{2+} -Überladung kommt. Mit Hilfe der Reperfusion können die Zellen in Anwesenheit von Sauerstoff nun wieder ATP produzieren. Dies führt zur Aktivierung der SERCA am SR. Dadurch wird das zytosolische Ca^{2+} sehr schnell ins SR aufgenommen. Durch die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration im SR wird Ca^{2+} über den RynR ins Zytosol wieder freigesetzt. Die in der Frühphase der Reperfusion entstandenen Ca^{2+} -Oszillationen, die durch repetitive Ca^{2+} -Aufnahme ins SR und Freisetzung ins Zytosol verursacht wurden, sind für den Reperfusionsschaden, die sog. „Hyperkontraktur“ verantwortlich (Siegmund et al. 1992; Garcia-Dorado 2004; Piper et al. 2006).

In früheren Studien wurde gezeigt, dass eine Unterdrückung der Ca^{2+} -Oszillationen mit Ryanodin die Kardiomyozyten gegen Hyperkontraktur schützt (Hempel et al. 1997; Insete et al. 2000; Piper et al. 2006, 2008). Ryanodin inhibiert den Ryanodin Rezeptor, der Ca^{2+} -Freisetzungskanal auf dem SR, und reduziert dadurch die Frequenz und Amplitude der Ca^{2+} -Oszillationen. Parks und Howlett 2012 zeigten, dass die basale Aktivität der PKA in Abwesenheit von der β -adrenergen Stimulation die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR erhöht. Daher ist die β -adrenerge Rezeptor-Aktivierung zu Beginn der Reperfusion wichtig, denn die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR wird somit nicht begünstigt.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass auch die β -adrenerge Rezeptor-Aktivierung durch Isoproterenol während der Reperfusion, die Kardiomyozyten gegen die Reperfusion-induzierte Hyperkontraktur schützen, indem die Frequenz und Amplitude der Ca^{2+} -Oszillationen signifikant reduziert werden.

Durch die Arbeiten von Ganote et al. 1983 und Barrabes et al. 1996 wurde *in vivo* die Beziehung zwischen Hyperkontraktur und der Entstehung von Nekrose aufgeklärt. Hierdurch wurde das typische histologische Bild der sog. Kontraktionsbandennekrose dargestellt, bei der die Kardiomyozyten sarkolemmale Brüche, hyperkontrahierte und zerrissene myofibrilläre Strukturen aufweisen.

In unseren Ergebnissen wurde neben der Abnahme der Ca^{2+} -Oszillationen eine signifikante Reduktion des Anteils der nekrotischen Zellen durch die β -adrenerge Rezeptor-Aktivierung mit Isoproterenol beobachtet.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivität der PKA unter Ischämie, Reperfusion und Reperfusion mit Isoproterenol-Behandlung untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die Aktivität der PKA in der Ischämie und in der kritischen Phase der Reperfusion (zwischen 5. und 8. Minute der Reperfusion) signifikant reduziert ist. Ab der 10. Minute der Reperfusion ließ sich eine Tendenz in Richtung der normoxischen Bedingung aufweisen, wobei diese PKA-Aktivität signifikant reduziert bleibt. Das bedeutet, dass eine verminderte Aktivität der PKA, die auch als sog. basale PKA-Aktivität bezeichnet werden kann, während der Reperfusion für die Kardiomyozyten ungünstig ist. Die Experimente mit der Isoproterenol-Behandlung wiesen auf, dass die Aktivität der PKA während der Reperfusion somit signifikant erhöht wurde. Dies schützt die Kardiomyozyten wiederum gegen den Reperfusionsschaden, indem die Ca^{2+} -Oszillationen reduziert wurden

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass die durch den erhöhten cAMP-Spiegel aktivierte PKA in der Lage ist, den RynR zu phosphorylieren (Bers 2002). Dies führt zur Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration des Zytoplasmas, indem Ca^{2+} aus dem SR ins Zytosol freigesetzt wird.

In den Experimenten dieser Studie im Hinblick auf die RynR Phosphorylierung an Ser2808 war kein signifikanter Unterschied zwischen den nicht behandelten beziehungsweise den mit Isoproterenol behandelten Zellen während der Reperfusion zu beobachten. Es ist auch keine Veränderung des Phosphorylierungszustands des RynRs während Ischämie im Vergleich zur normoxischen Bedingungen zu verzeichnen. Demnach ist zu vermuten, dass die PKA Aktivierung während der Reperfusion im Zellmodell keinen Einfluss auf die Aktivität von RynRs hat.

Die PKA-Aktivierung unter β -adrenerge Rezeptor Stimulation führt allerdings auch zur PLB-Phosphorylierung. Infolgedessen kommt es zu einer Steigerung der SERCA-Aktivität (Simmern et al. 1998; Shannon et al. 2001; Bers 2002), Reduktion der Ca^{2+} -Konzentration im Zytoplasma und Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration im SR (Kranias et al. 1985).

Es wurde durch Arbeiten von Sabine et al. 1995 und Abdallah et al. 2005, 2006 gezeigt, dass die Beförderung der Ca^{2+} -Aufnahme aus dem Zytoplasma ins SR die Myokardzellen gegen Hyperkontraktur schützt. Dies wurde durch die Aktivierung der Protein Kinase G (PKG) durch ANP-Rezeptor-Agonisten sowie mit Insulin während der Reperfusion vermittelt, indem die PKG das Phospholamban phosphoryliert. Durch Phosphorylierung des Phospholambans durch PKG wird SERCA aktiviert, welche die Aufnahme von Ca^{2+} ins SR verstärkt.

Anhand unserer Ergebnisse bezüglich der PLB-Phosphorylierung ist eine signifikante Zunahme der PLB-Phosphorylierung durch die PKA Aktivierung mit Isoproterenol zu beobachten. Dies deutet auf eine Protektion der Kardiomyozyten gegen Reperfusion-induzierte Schäden durch die Erhöhung der SERCA-Aktivität hin. Hierfür verhält sich die Protein Kinase A wie die Protein Kinase G.

Durch adenovirale Transfektion des SERCA2a Gens zur Überexpression des SERCA2a in adulten Kaninchen-Kardiomyozyten wurde eine Verbesserung der systolischen und diastolischen Funktion sowie eine Reduktion des Zelltodes und Arrhythmien erreicht (Davia K et al. 2001). Zhang GX et al. 2012 zeigte in den SERCA2a überexprimierenden transgenen Rattenherzen eine erhöhte Linkeventrikel-Funktion, eine Verbesserung der Kontraktilität und verbesserte Ca^{2+} -Toleranz.

Zunächst wurde untersucht, ob die Erhöhung der SERCA Aktivierung tatsächlich eine erhöhte Ca^{2+} -Rückspeicherung initiiert. Dafür wurden die Zellen am Ende der Reperfusion mit Koffein (10 mM) behandelt, denn Koffein öffnet die Kanäle zur Ca^{2+} -Freisetzung (RynRs) und dadurch wird schließlich eine maximale Freisetzung des Ca^{2+} aus dem SR ins Zytosol bewirkt (Lukyanenko et al. 2001). Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse der Koffein-Behandlung und der PLB-Phosphorylierung, dass die Behandlung mit Isoproterenol zu einer signifikanten Steigerung der Ca^{2+} -Speicherung im SR führt, welche auf die Steigerung der SERCA-Aktivität zurückzuführen ist.

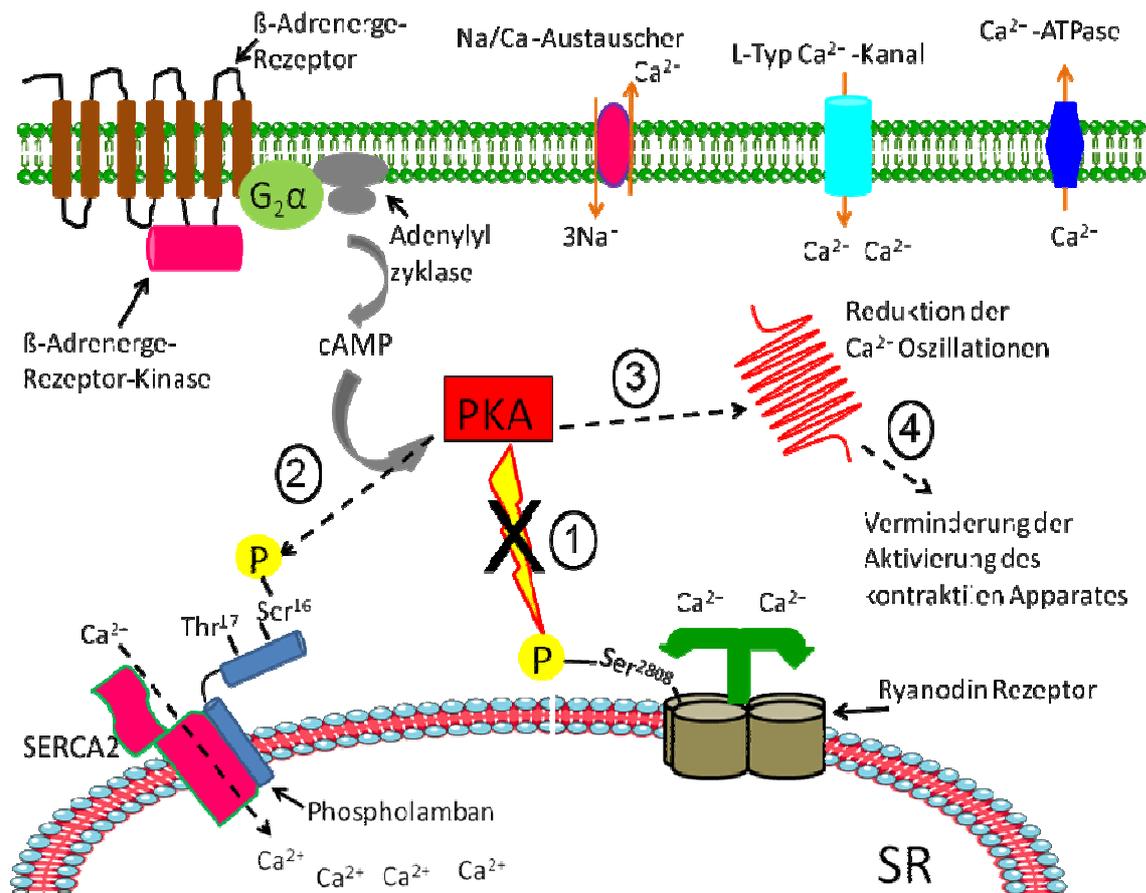


Abb. 5.3.1 Schematische Darstellung der Protektion gegen den Reperfusionsschaden durch die PKA Aktivierung. Die PKA Aktivierung hat keinen Effekt auf die Phosphorylierung des RynRs während der Reperfusion (1). Die PKA Aktivierung weist eine gesteigerte PLB-Phosphorylierung auf (2), was den Ca²⁺-Einstrom ins SR initiiert. Die Beförderung der Ca²⁺-Aufnahme reduziert die Ca²⁺-Oszillationen signifikant (3), sodass die Kardiomyozyten gegen die Reperfusion-induzierte Hyperkontraktur geschützt werden (4). (modifiziert nach den Arbeiten von Frau Dr. Kranias Evangelia (University of Cincinnati)).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Signalweg analysiert, in welchem die Isoproterenol induzierte Aktivierung des β-adrenergen Rezeptors zu einer Aktivierung der PKA führt. Diese PKA Aktivierung in der Frühphase der Reperfusion wirkt protektiv gegen die Hyperkontraktur der myokardialen Zellen bzw. gegen den nekrotischen Zelltod. Bei der durch PKA Aktivierung vermittelten Protektion der Kardiomyozyten wird das sarkoplasmatische Retikulum (SR) als Zielorganell in den Fokus gestellt, in dem die Ca²⁺-Aufnahme aus dem Zytosol ins SR verstärkt wird.

Piper et al. 2008 und Rodriguez-Sinovas et al. 2007 legten dar, dass die Frühphase der Reperfusion nach prolongierter Myokardischämie ein klinisch wichtiges Fenster für neue Therapieansätze gegen den Herzinfarkt darstellt. Daher ist es von besonderer Bedeutung, den PKA-vermittelten Signalweg während der Reperfusion durch die Applikation von Isoproterenol aufzuklären, denn es bietet neue Möglichkeiten zur Protektion des Myokards. Bisher sind keine klinischen Studien über die Applikation der PKA Aktivatoren zur Verminderung der Reperfusionsschäden nach einem akuten Herzinfarkt bekannt. In der hier vorliegenden Arbeit wird die PKA Aktivierung als akut angewandte und nicht als langfristige Behandlung eingesetzt. Deshalb könnte der lokale Einsatz der PKA-Aktivatoren in der Frühphase der Reperfusion Therapie der Wahl sein. Für die lokale Behandlung könnte das Perkutane Transluminale Coronarangioplastie (PTCA) eingesetzt werden.

6 Zusammenfassung

Die aktuelle Therapie eines drohenden Myokardinfarktes ist eine sofortige Reperfusion. Die Reperfusion führt jedoch in experimentellen Modellen in vivo und in vitro zum Reperfusionsschaden, der sich in Form von Hyperkontraktur und nekrotischem Zelltod zeigt. Aus mehreren Studien ist bekannt, dass es zu Beginn der Reperfusion präventive Interventionen zur Verhinderung von Reperfusionsschäden gibt. In dieser Studie wurde die Rolle β -adrenerger Rezeptor-Aktivierung in Kardiomyozyten aus adulten Ratten unter Ischämie und Reperfusion mit folgender Fragestellung untersucht:

1. Kann die β -adrenerge Rezeptor-Aktivierung während der Reperfusion Kardiomyozyten gegen die Reperfusion-bedingte Hyperkontraktur und Nekrose schützen?
2. Welche zelluläre Mechanismen sind an der Protektion gegen den Reperfusionsschaden involviert?

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen dar:

1. Die β -adrenerge Rezeptor-Aktivierung während der Reperfusion reduziert signifikant die Entwicklung der Reperfusion-induzierten Hyperkontraktur und Nekrose.
2. Diese Reduktion des Reperfusionsschadens basiert auf einer Verminderung der Frequenz und Amplitude der zytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen.
3. Die Verminderung der Ca^{2+} -Oszillationen wird vermutlich durch eine erhöhte Ca^{2+} -Speicherung im sarkoplasmatischen Retikulum (SR) herbeigeführt.
4. Die erhöhte Aktivität des SRs durch die PKA-Aktivierung wurde durch die Phosphorylierung des PLBs nachgewiesen.

7 Summary

Reperfusion is the current standard therapy of ischemic myocardium, however, reperfusion itself leads to reperfusion injury, which can be determined in hypercontracture and necrotic cell death. It has been shown in previous studies that there are interventions at the beginning of reperfusion are able to reduce the myocardial reperfusion injury. In the present study the role of β -adrenergic receptor stimulation in cardiac myocytes was investigated. Cardiac myocytes from adult rats were subjected to simulated ischemia and reoxygenation conditions. The following issues were aimed:

1. Whether β -adrenergic receptor stimulation during the reperfusion protects the cardiomyocytes against reperfusion-induced hypercontracture and necrosis.
2. Which cellular mechanisms are involved in this protection.

The results of the present study are:

1. β -adrenergic receptor stimulation during the reperfusion significantly reduces the development of reperfusion-induced hypercontracture and necrosis.
2. The protection against reperfusion injury is due to a decrease frequency and amplitude of cytosolic calcium oscillations.
3. The reduction of cytosolic calcium oscillations is due to an enhanced calcium sequestration into the sarcoplasmic reticulum through activation of SR Ca^{2+} -Pump (SERCA) achieved by phospholamban (PLB) phosphorylation.

8 Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
AKAP	A –Kinase Ankerprotein
AM	Acetoxymethylester
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	Zweifach destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BDM	2, 3 –Butanedione monoxime
°C	Grad Celcius
ca.	zirka
Ca ²⁺	Kalzium –Ionen
CaCl ₂	Kalziumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CCD	Charge –coupled Device Kamera
CCT	Kreatin –Karnitin –Taurin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylendioxy-bis-(ethylenitrilo)-tetraessigsäure
et al.	und andere
FBS	Fetal Bovine Serum
G _s	stimulierendes G-Protein
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
HRP	Horseradisch –Peroxidase
IgG	Immunoglobulin G
K ⁺	Kalium –Ionen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
mg	Milligramm
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
Min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol / Liter
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogenkarbonat
NaOH	Natriumhydroxid

NCE	Na ⁺ / Ca ²⁺ Exchanger
nM	Nanomol / Liter
O ₂	Sauerstoff
PBS	Phosphate buffered Saline
PDE	Phosphodiesterase
PKA	Proteinkinase A
PKG	Proteinkinase G
PLB	Phospholamban
PTCA	Perkutane Transluminale Coronarangioplastie
r.E.	relative Einheiten
RISK	Reperfusion Injury Salvage Kinase
RynR	Ryanodin Rezeptor
SDS-PAGE	(Sodium) –Dodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler)
Ser	Serin
SERCA	Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Ca ²⁺ - ATPase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TBS-T	Tris Buffered Saline Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
Thr	Threonin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomet

u.a.

unter anderem

% (vol/vol)

Volumenprozent (Volume per Volume)

% (wt/vol)

Gewichtsprozent (Weight per Volume)

9 Literaturverzeichnis

Abdallah Y, Gkatzoflia A, Pieper H, Zoga E, Walther S, Kasseckert S, Schäfer M, Schlüter KD, Schäfer C (2005). Mechanism of cGMP-mediated protection in a cellular model of myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res*; 66:123-31.

Abdallah Y, Gkatzoflia A, Gligorievski D, Kasseckert S, Euler G, Schlüter KD, Schäfer M, Piper HM, Schäfer C (2006). Insulin protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture by a survival pathway targeting SR Ca²⁺ storage. *Cardiovasc Res*; 70:346-53.

Abdallah Y, Iraqi W, Said M, Kasseckert SA, Shahzad T, Erdogan A, Neuhof C, Gündüz D, Schlüter KD, Piper HM, Reusch HP, Ladilov Y (2012). Interplay between Ca²⁺ cycling and mitochondrial permeability transition pores promotes reperfusion-induced injury of cardiac myocytes. *J Cell Mol Med*; 15(11):2478-85.

Allshire A, Piper HM, Cuthbertson KSR, Cobbold PH (1987). Cytosolic free calcium in single rat heart cells during anoxia and reoxygenation. *Biochem J*; 244(2):381-5.

Anderson SE, Murphy E, Steebergen C, London RE, Cala PM (1990). Na-H exchange in myocardium: effects of hypoxia and acidification on Na and Ca. *Am J Physiol*; 259(6 Pt 1):C940-8.

Barrabes JA, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Piper HM, Solares J, Gonzáles MA, Oliveras J, Pilar Herrejón M, Soler Soler J (1996). Myocardial segment shrinkage during coronary reperfusion in situ. Relation to hypercontracture and myocardial necrosis. *Pflugers Arch*; 431(4):519-526.

Bell RM, Yellon DM (2003). Bradykinin limits infarction when administered as an adjunct to reperfusion in mouse heart: the role of PI3K, Akt and eNOS. *J Mol Cell Cardiol*; 35(2):185-93.

Bhamra GS, Hausenloy DJ, Davidson SM, Carr RD, Paiva M, Wynne AM, Mocanu MM, Yellon DM (2008). Metformin protects the ischemic heart by the Akt-mediated inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening. *Basic Res Cardiol*; 103(3):274-84.

Bopassa JC, Ferrera R, Gateau-Roesch O, Couture-Lepetit E, Ovize M (2006). PI3-kinase regulates the mitochondrial transition pore in controlled reperfusion and postconditioning. *Cardiovasc Res*; 69(1):178-85.

Cazorla O, Szilagy S, Vignier N, Salazar G, Krämer E, Vassort G, Carrier L, Lacampagne A (2006). Length and protein kinase A modulations of myocytes in myosin binding protein C-deficient mice. *Cardiovasc Res*; 69(2):370-80.

Cerra MC, Imbrogno S (2012). Phospholamban and cardiac function: a comparative perspective in vertebrates. *Acta Physiol (Oxf)*; 205(1):9-25.

Colyer J (1998). Phosphorylation states of Phospholamban. *Ann N Y Acad Sci*; 853:79-91.

Conti M, Beavo J (2007). Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu Rev Biochem*; 76:481-511.

Corbin JD, Keely SL, Park CR (1975). The distribution and dissociation of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinases in adipose, cardiac, and other tissues. *J Biol Chem*; 250(1):218-25.

Dalrymple MB, Pflieger KD, Eidne KA (2008). G protein-coupled receptor dimmers: functional consequences, disease states and drug targets. *Pharmacol Ther*; 118(3):359-71.

Danila CI, Hamilton SL (2004). Phosphorylation of ryanodine receptors. *Biol Res*; 37(4):521-5.

Davia K, Bernobich E, Ranu HK, del Monte F, Terraciano CM, MacLeod KT, Adamson DL, Chaudri B, Hajjar RJ, Harding SE (2011). SERCA2A overexpression decreases the incidence of aftercontractions in adult rabbit ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol*; 33(5):1005-15.

Dennis SC, Gevers W, Opie LH (1991). Protons in ischemia: where do they come from; where do they go to?. *J Mol Cell Cardiol*; 23:1077-1086.

Dodge-Kafka KL, Langeberg L, Scott JD (2006). Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of A-kinase anchoring proteins. *Circ Res*; 98(8):993-1001.

Edwards AS, Scott JD (2000). A-kinase anchoring proteins: protein kinase A and beyond. *Curr Opin Cell Biol*; 12(2):217-21.

Frank K, Tilgmann C, Shannon TR, Bers DM, Kranias EG (2000). Regulatory role of Phospholamban in the efficiency of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} transport. *Biochemistry*; 39(46):14176-82.

Ganote CE (1983). Contraction band necrosis and irreversible myocardial injury. *J Mol Cell Cardiol*; 15(2):67-73.

Garcia-Dorado D, Thérroux P, Duran JM, Solares J, Alonso J, Sanz E, Munoz R, Elizaga J, Botas J, Fernandez-Avilés F (1992). Selective inhibition of the contractile apparatus: A new approach to modification of infarct size, infarct composition, and infarct geometry during coronary artery occlusion and reperfusion. *Circulation*; 85(3):1160-74.

Garcia-Dorado D, Inserte J, Ruiz-Meana M, Gonzáles MA, Solares J, Juliá M, Barrabés JA, Soler-Soler J (1997). Gap junction uncoupler heptanol prevents cell-to-cell progression of hypercontracture and limits necrosis during myocardial reperfusion. *Circulation*; 96(10):3579-86.

Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Padilla F, Rodriguez-Sinovas A, Mirabet M (2002). Gap junction-mediated intercellular communication in ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res*; 55(3):456-65.

Garcia-Dorado D (2004). Myocardial reperfusion injury: a new view. *Cardiovasc Res*; 61:363-4.

Garcia-Dorado D, Rodriguez-Sinovas A, Ruiz-Meana M, Inserte J, Agulló L, Cabestrero A (2006). The end-effectors of preconditioning protection against myocardial cell death secondary to ischemia-reperfusion. *Cardiovasc Res*; 70(2):274-85.

García-Rivas Gde J, Carvajal K, Correa F, Zazueta C (2006). Ru360, a specific mitochondrial calcium uniporter inhibitor, improves cardiac post-ischaemic functional recovery in rates in vivo. *Br J Pharmacol*; 149(7):829-37.

Gergely J (1976). Excitation-contraction coupling-cardiac muscle events in the myofilament. *Fed Proc*; 35(6):1283-7.

Gergs U, Kirchhefer U, Buskase J, Kiele-Dunsche K, Buchwalow IB, Jones LR, Schmitz W, Traub O, Neumann J (2011). Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in neonatal rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*; 51(5):682-8.

Gomez L, Thibault H, Gharib A, Dumont JM, Vuagniaux G, Scalfaro P, Derumeaux G, Ovize M (2007). Inhibition of mitochondrial permeability transition improves functional recovery and reduces mortality following acute myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 293(3):H1654-61.

Gorbe A, Giricz Z, Szunyog A, Csont T, Burley DS, Baxter GF, Ferdinandy P (2010). Role of cGMP-PKG signaling in the protection of neonatal rat cardiac myocytes subjected to simulated ischemia/reoxygenation. *Basic Res Cardiol*; 105(5):643-50.

HaigneyMC, Miyata H, Lakatta, EG, Stern MD, Silverman HS (1992). Dependence of hypoxic cellular calcium loading on Na⁺-Ca²⁺ exchange. *Circ Res*; 71(3):547-57.

Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA (2004). Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion- a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res*; 61(3):372-85.

Hamdani N, de Waard M, Messer AE, Boontje NM, Kooij V, van Dijk S, Versteilen A, Lamberts R, Merkus D, Dos Remedios C, Duncker DJ, Borbely A, Papp Z, Paulus W, Stienen GJ, Marston SB, van der Velden J (2008). Myofilament dysfunction in cardiac disease from mice to men. *J Muscle Res Cell Motil*; 29(6-8):189-201.

Hausenloy DJ, Yellon DM (2004). New direction for protecting the heart against ischemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res*; 61(3):448-60.

Hausenloy DJ, Yellon DM (2006). Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Res*; 70(2):240-53.

Hausenloy DJ, Yellon DM (2007). Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection. *Heart Fail Rev*; 12(3-4):17-34.

Hempel A, Friedrich M, Schlüter KD, Forssman WG, Kuhn M, Piper HM (1997). ANP protects against reoxygenation-induced hypercontracture in adult cardiomyocytes. *Am J Physiol*; 273(1 Pt 2):H244-9.

Herron TJ, Korte FS, McDonald KS (2001). Power output is increased after phosphorylation of myofibrillar proteins in rat skinned cardiac myocytes. *Circ Res*; 89(12):1184-90.

Houslay MD, Adams DR (2003). PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochem J*; 370(Pt 1):1-18.

Hulme JT, Ahn M, Hauschka SD, Scheuer T, Catterall WA (2002). A novel leucine zipper targets AKAP15 and cyclic AMP-dependent protein kinase to the C terminus of the skeletal muscle Ca²⁺ channel and modulates its function. *J Biol Chem*; 277(6):4079-87.

Hulme JT, Lin TW, Westenbroeck RE, Scheuer T, Catterall WA (2003). Beta-adrenergic regulation requires direct anchoring of PKA to cardiac CaV1.2 channels via leucine zipper interaction with A-kinase anchoring protein 15. *Proc Natl Acad Sci USA*; 100(22):13093-8.

Inserte J, Garcia-Dorado D, Agulló L, Paniagua A, Soler-Soler J (2000). Urodilatin limits acute reperfusion injury in the isolated rat heart. *Cardiovasc Res*; 45(2):351-9.

Inserte J, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Padilla F, Barrabés JA, Pina P, Agulló L, Piper HM, Soler-Soler J (2002). Effect of inhibition of Na(+)/Ca(2+) exchanger at the time of myocardial reperfusion on hypercontracture and cell death. *Cardiovasc Res*; 55(4):739-48.

Joung B, Tang L, Maruyama M, Han S, Chen Z, Stucky M, Jones LR, Fishbein MC, Weiss JN, Chen PS, Lin SF (2009). Intracellular calcium dynamics and acceleration of sinus rhythm by beta-adrenergic stimulation. *Circulation*; 119(6):788-96.

Kentish JC, McCloskey DT, Layland J, Palmer S, Leiden JM, Martin AF, Solaro RJ (2001). Phosphorylation of troponin I by protein kinase A accelerates relaxation and crossbridge cycle kinetics in mouse ventricular muscle. *Circ Res*; 88(10):1059-65.

Kitakaze M, Asakura M, Kim J, Shintani Y, Asanuma H; Hamasaki T, Seguchi O, Myoishi M, Minamino T, Ohara T, Nagai Y, Nanto S, Watanabe K, Fukuzawa S, Hirayama A, Nakamura N, Kimura K, Fujii K, Ishihara M, Saito Y, Tomoike H,

Kitamura S, (2007). Human atrial natriuretic peptide and nicorandil as adjunct to reperfusion treatment for acute myocardial infarction (J-WIND): Two randomised trials. *Lancet*; 370(9597):1483-1493.

Kornev AP, Taylor SS (2010). Defining the conserved internal architecture of a protein kinase. *Biochim Biophys Acta*; 1804(3):440-4.

Kranias EG, Garvey JL, Srivastava RD, Solaro RJ (1985). Phosphorylation and functional modifications of sarcoplasmic reticulum and myofibrils in isolated rabbit hearts stimulated with isoprenaline. *Biochem J*; 226(1):113-21.

Ladilov YV, Siegmund B, Piper HM (1995). Protection of reoxygenated cardiomyocytes against hypercontracture by inhibition of Na⁺/H⁺ exchange. *Am J Physiol*; 268(4 Pt 2):H1531-9.

Ladilov YV, Haffner S, Balsler-Schäfer C, Maxeiner H, Piper HM (1999). Cardioprotective effects of KB-R7943: a novel inhibitor of the reverse mode of Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Am J Physiol*; 276(6 Pt 2):H1868-76.

Ladilov Y, Efe O, Schäfer C, Rother B, Kasseckert S, Abdallah Y, Meuter K, Dieter Schlüter K, Piper HM (2003). Reoxygenation –induced rigor-type contracture. *J Mol Cell Cardiol*; 35(12):1481-90.

Langeberg LK, Scott JD (2005). A-kinase-anchoring proteins. *J Cell Sci*; 118(Pt15):3217-20.

Layland J, Solaro RJ, Shah Am (2005). Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation. *Cardiovasc Res*; 66(1):12-21.

Lefkowitz RJ (2004). Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci*; 25(8):413-22.

Li Y, Kranias EG, Mignery GA, Bers DM (2002). Protein kinase A phosphorylation of the ryanodine receptor does not affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes. *Circ Res*; 90(3):309-16.

Lukyanenko V, Viatchenko-Karpinski S, Smirnov A, Wiesner TF, Györke S (2001). Dynamic regulation of sarcoplasmic reticulum Ca(2+) content and release by luminal Ca(2+)-sensitive leak in rat ventricular myocytes. *Biophys J*; 81(2):785-98.

Lygren B, Carlson CR, Santamaria K, Lissandron V, McSorley T, Litzenberg J, Lorenz D, Wiesner B, Rosenthal W, Zaccolo M, Taskén K, Klussmann E (2007). AKAP complex regulates Ca²⁺-re-uptake into heart sarcoplasmic reticulum. *EMBO Rep*; 8(11):1061-7.

Ma X, Zhang X, Li C, Luo M (2006). Effect of postconditioning on coronary blood flow velocity and endothelial function and LV recovery after myocardial infarction. *J Interv Cardiol*; 19(5):367-75.

Ma XJ, Zhang XH, Li CM, Luo M (2006). Effect of postconditioning on coronary blood flow velocity and endothelial function in patients with acute myocardial infarction. *Scand Cardiovasc J*; 40(6):327-33.

MacLennan DH, Kranias EG (2003). Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 4(7):566-77.

Manni S, Mauban JH, Ward CW, Bond M (2008). Phosphorylation of cAMP-dependent protein kinase (PKA) regulatory subunit modulate PKA-AKAP interaction, substrat phosphorylation, and calcium signaling in cardiac cells. *J Biol Chem*; 283(35):24145-54.

Masterson LR, Yu T, Shi L, Wang Y, Gustavsson M, Mueller MM, Veglia G (2011). cAMP-dependent protein kinase A selects the excited states of the membrane substrate Phospholamban. *J Mol Biol*; 412(2):155-64.

Mongillo MT, McSorley T, Evellin S, Sood A, Lissandron V, Terrin A, Huston E, Hannawacker A, Lohse MJ, Pozzan T, Houslay MD, Zaccolo M (2004). Fluorescence resonance energy transfer –based analysis of cAMP dynamics in live neonatal rat cardiac myocytes reveals distinct functions of compartmentalized phosphodiesterases. *Circ Res*; 95(1):67-75.

Nichols CG, Lederer WJ (1990). The role of ATP in energy-deprivation contractures in unloaded rat ventricular myocytes. *Can J Physiol Pharmacol*; 68(2):183-94.

Owens LM, Fralix TA, Murphy E, Cascio WE, Gettes LS (1996). Correlation of ischemia –induced extracellular and intracellular ion changes to cell-to-cell electrical uncoupling in isolated blood-perfused rabbit hearts. *Experimental Working Group. Circulation*; 94(1):10-13.

Padilla F, Garcia-Dorado D, Agulló L, Inserte J, Paniauga A, Mirabet S, Barrabés JA, Ruiz-Meana M, Soler-Soler J (2000). L-Arginin administration prevents reperfusion-induced cardiomyocytes hypercontracture and reduces infarct size in the pig. *Cardiovasc Res*; 46(3):412-20.

Padilla F, Garcia-Dorado D, Agulló L, Barrabés JA, Inserte J, Escalona N, Meyer M, Mirabet M, Pina P, Soler-Soler-J (2001). Intravenous administration of the natriuretic peptide urodilatin at low doses during coronary reperfusion limits infarct size in anesthetized pigs. *Cardiovasc Res*; 51(3):592-600.

Parks RJ, Howlett SE (2012). H-89 decreases the gain of excitation-contraction coupling and attenuates calcium sparks in the absence of beta-adrenergic stimulation. *Eur J Pharmacol*; 691(1-3):163-72.

Pfleiderer P, Sumandea MP, Rybin VO, Wang C, Steinberg SF (2009). Raf-1: a novel cardiac troponin T kinase. *J Muscle Res Cell Motil*; 30(1-2):67-72.

Pike MM, Luo CS, Clark MD, Kirk KA, Kitakaze M, Madden MC, Cragoe EJ Jr, Pohost GM (1993). NMR measurements of Na⁺ and cellular energy in ischemic rat heart: role of Na⁽⁺⁾-H⁺ exchange. *Am J Physiol*; 265(6 Pt 2):H2017-26.

Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, Elbelghiti R, Cung TT, Bonnefoy E, Angoulvant D, Macia C, Raczka F, Sportauch C, Gahide G, Finet G, André-Fouét X, Revel D, Kirkorian G, Monassier JP, Derumeaux G, Ovize M (2008). Effect of cyclosporine o reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Eng J Med*; 359(5):473-81.

Piper HM, Probst I, Schwartz P, Hütter FJ, Spieckermann PG (1982). Culturing of calcium stable adult cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*; 14(7):397-412.

Piper HM, Garcia-Dorado D, Ovize M (1998). A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res*; 38:291-300.

Piper HM, Abdallah Y, Schäfer C (2004). The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovasc Res*; 61:365-3671

Piper HM, Kasseckert S, Abdallah Y (2006). The sarcoplasmic reticulum as the primary target of reperfusion protection. *Cardiovasc Res*; 70:170-3.

Piper HM, Kasseckert SA, Schlüter KD, Abdallah Y (2008). Pathophysiology of myocardial reperfusion injury. *Dtsch Med Wochenschr*; 133:586-90.

Piper HM, Abdallah Y, Kasseckert S, Schlüter KD (2008). Sarcoplasmic reticulum-mitochondrial interaction in the mechanism of acute reperfusion injury. *Viewpoint. Cardiovasc Res*; 77(2):234-6.

Ramzy D, Rao V, Weisel RD (2006). Clinical applicability of preconditioning and postconditioning: the cardiothoracic surgeon's view. *Cardiovasc Res*; 70(2)-174-80.

Reimann EM, Brostrom CO, Corbin JD, King CA, Krebs EG (1971a). Separation of regulatory and catalytic subunits of the cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate-dependent protein kinase(s) of rabbit skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*; 42(2):187-94.

Reimann EM, Walsh DA, Krebs EG (1971b). Purification and properties of skeletal muscle 3', 5'-adenosine monophosphate dependent protein kinase. *J Biol Chem*; 246(7):1986-95.

Robidoux J, Martin TL, Collins S (2004). Beta-adrenergic receptors and regulation of energy expenditure: a family affair. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 44:297-323.

Rodriguez-Sinovas A, Abdallah Y, Piper HM, Garcia-Dorado D (2007). Reperfusion injury as a therapeutic challenge in patients with acute myocardial infarction. *Heart Fail Rev*; 12(3-4):207-16.

Ruehr ML, Russel MA, Bond M (2004). A-kinase anchoring protein targeting of protein kinase A in the heart. *J Mol Cell Cardiol*; 37(3):653-65.

Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D, Hofstaetter B, Piper HM, Soler Soler J (1999). Propagation of cardiomyocyte hypercontracture by passage of Na⁽⁺⁾ through gap junctions. *Circulation*; 85(3):280-7.

Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D, Lane S, Pina P, Inserte J, Mirabet M, Soler-Soler J (2001). Persistence of gap junction communication during myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 280(6):H2563-71.

Ruiz-Meana M, Abellán A, Miró-Casas E, Garcia-Dorado D (2007). Opening of mitochondrial permeability transition pore induces hypercontracture in Ca²⁺ overloaded cardiac myocytes. *Basic Res Cardiol*; 102(6):542-52.

Ruiz-Meana M, Abellán A, Miró-Casas E, Agulló E, Garcia-Dorado D (2009). Role of sarcoplasmic reticulum in mitochondrial permeability transition and cardiomyocyte death during reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 297(4):H1281-9.

Rupprecht HJ, vom Dahl J, Terres W, Seyfarth KM, Richardt G, Schultheis HP, Buerke M, Sheehan FH, Drexler H (2000). Protective effects of the Na⁺/H⁺ exchange inhibitor cariporide in patients with anterior myocardial infarction undergoing direct PTCA. *Circulation*; 101(25):2902-8.

Sabine B, Willenbrock R, Haase H, Karczewski P, Wallukat G, Dietz R, Krause G (1995). Cyclic GMP-mediated phospholamban phosphorylation in intact cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*; 214(1):75-80.

Schäfer C, Ladilov YV, Siegmund B, Piper HM (2000). Importance of bicarbonate transport for protection of cardiomyocytes against reoxygenation injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 278(5):H1457-63.

Schäfer C, Ladilov Y, Inserte J, Schäfer M, Haffner S, Garcia-Dorado D, Piper HM (2001). Role of the reverse mode of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in reoxygenation –induced cardiomyocytes injury. *Cardiovasc Res*; 51(2):241-50.

Schlüter KD, Weber M, Schraven E, Piper HM (1994). NO donor SIN-1 protects against reoxygenation –induced cardiomyocyte injury by a dual action. *Am J Physiol*; 267(4 Pt 2):H1461-6.

Sebbag L, Verbinski SG, Reimer KA, Jennings RB (2003). Protection of ischemic myocardium in dogs using intracoronary 2,3-butanedione monoxime (BDM). *J Mol Cell Cardiol*; 35(2):165-76.

Shahzad T, Kasseckert SA, Iraqi W, Johnson V, Schulz R, Schlüter KD, Dörr O, Parahuleva M, Hamm C, Ladilov Y, Abdallah Y (2013). Mechanisms involved in postconditioning protection of cardiomyocytes against acute reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*; 58:209-16.

Shan J, Kushnir A, Betzenhauser MJ, Reiken S, Li J, Lehnart SE, Lindegger N, Mongillo M, Mohler PJ, Marks AR (2010). Phosphorylation of the ryanodine receptor mediates to cardiac flight or flight response in mice. *J Clin Invest*; 120(12):4388-98.

Shintani-Ishida K, Inui M, Yoshida K (2012). Ischemia-reperfusion induces myocardial infarction through mitochondrial Ca^{2+} overload. *J Mol Cell Cardiol*; 53(2):233-9.

Siegmund B, Klietz T, Schwartz P, Piper HM (1991). Temporary contractile blockade prevents hypercontracture in anoxic-reoxygenated cardiomyocytes. *Am J Physiol*; 260(2 Pt 2):H426-35.

Siegmund B, Zude R, Piper HM (1992). Recovery of anoxic-reoxygenated cardiomyocytes from severe Ca^{2+} -overload. *Am J Physiol*; 263(4 Pt 2):H1262-9.

Siegmund B, Ladilov YV, Piper HM (1994). Importance of sodium for recovery of calcium control in reoxygenated cardiomyocytes. *Am J Physiol*; 267(2 Pt 2):H506-13.

Siegmund B, Schlack W, Ladilov YV, Balsler C, Piper HM (1997). Halothane protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture. *Circulation*; 96(12):4372-9.

Simmerman HK, Jones LR (1998). Phospholamban: protein structure, mechanism of action and role in cardiac function. *Physiol Rev*; 78(4):921-947.

Sivaraman V, Mudalagiri NR, Di Salvo C, Kolvekar S, Hayward M, Yap J, Keogh P, Hausenloy DJ, Yellon DM (2007). Postconditioning protects human atrial muscle through the activation of the RISK-pathway. *Basic Res Cardiol*; 102(5):453-9.

Skalhegg BS, Tasken K (2000). Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci*; 5:D678-93.

Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L'Huillier I, Aupetit JF, Bonnefoy E, Finet G, André-Fouét X, Ovize M (2005). Postconditioning the human heart. *Circulation*; 112:2143-8.

Statistische Bundesamt (2011). unter:
<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabelle/SterbefaelleInsgesamt.html> (Abgerufen am 29.04.2013)

Strang KT, Sweitzer NK, Greaser ML, Moss RL (1994). Beta-adrenergic receptor stimulation increases unloaded shortening velocity of skinned single ventricular myocytes from rats. *Circ Res*; 74(3):542-9.

Szentesi P, Pignier C, Egger M, Kranias EG, Niggli E (2004). Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ refilling controls recovery from Ca²⁺ induced Ca²⁺ release refractoriness in heart muscle. *Circ Res*; 95(8):807-13.

Tada M, Toyofuku T (1996). SR Ca(2+)-ATPase/ Phospholamban in cardiomyocytes function. *J Card Fail*; 2(4 Suppl):S77-85.

Takasago T, Imagawa T, Furukawa K, Ogurusu T, Shigekawa M (1991). Regulation of cardiac ryanodine receptor by protein kinase-dependent phosphorylation. *J Biochem*; 109(1):163-70.

Taskén K, Aandahl EM (2004). Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev*; 84(1):137-67.

Taylor SS, Buechler JA, Yonemoto W (1990). cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem*; 59:971-1005.

Theroux P (2000). Myocardial cell protection: a challenging time for action and a challenging time for clinical research. *Circulation*; 101:2874-2876.

Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM (2004). Postconditioning: a form of “modified reperfusion” protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circ Res*; 95(3):230-2.

Ventura-Clapier R, Veksler V (1994). Myocardial ischemic contracture. Metabolites affect rigor tension development and stiffness. *Circ Res*; 74(5):920-9.

Walsh DA, Perkins JP, Krebs EG (1968). An adenosine 3', 5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem*; 243(13):3763-5.

Wier WG, ter Keurs HE, Marban E, Gao WD, Balke CW (1997). Ca²⁺ ‘sparks’ and waves in intact ventricular muscle resolved by confocal imaging. *Circ Res*; 81(4):462-9.

Wong W, Scott JD (2004). AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 5(12):959-70.

Xiao B, Sutherland C, Walsh MP, Chen SR (2004). Protein kinase A phosphorylation at serine-2808 of the cardiac Ca²⁺ -release channel (ryanodine receptor) does not dissociate 12.6-kDa FK506 -binding protein (FKBP12.6). *Circ Res*; 94(4):487-95.

Yeagle PL, Albert AD (2003). A conformational trigger for activation of a G protein by a G protein-coupled receptor. *Biochemistry*; 42(6):1365-8.

Zaccola M, Pozzan T (2002). Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science*; 295(5560):1711-5.

Zaccola M (2006). Phosphodiesterases and compartmentalized cAMP signaling in the heart. *Eur J Cell Biol*; 85(7):693-7.

Zhang GX, Obata K, Takeshita D, Mitsuyama S, Nakashima T, Kikuta A, Hirabayashi M, Tomita K, Vetter R, Dillmann WH, Takaki M (2012). Evaluation of left ventricular mechanical work and energetics of normal hearts in SERCA2a transgenic rats. *J Physiol Sci*; 62(3):221-31.

Zhang R, Zhao J, Mandveno A, Potter JD (1995). Cardiac troponin I phosphorylation increases the rate of cardiac muscle relaxation. *Circ Res*; 76(6):1028-35.

Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J (2003). Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 285(2):H579-88.

10 Publikationsverzeichnis

Rajalin AM, **Micoogullari M**, Sies H, Steinbrenner H (2014). Upregulation of thioredoxin-dependent redox system during differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Biol Chem*; doi:10.1515/hsz-2014-0102

Appukutan A, Kasseckert SA, **Micoogullari M**, Flacke JP, Kumar S, Woste A, Abdallah Y, Pott L, Reusch HP, Ladilov Y (2012). Typ 10 adenylyl cyclase mediates mitochondrial Bax translocation and apoptosis of adult rat cardiomyocytes under simulated ischemia/reperfusion. *Cardiovasc Res*; 93(2):340-9.

Härtel FV, Holl M, Arshad M, Aslam M, Gündüz D, Weyand M, **Micoogullari M**, Abdallah Y, Piper HM, Noll T (2010). Transient hypoxia induces ERK-dependent anti-apoptotic cell survival in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*; 298(6):C1501-9.

11 Eidesstattliche 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. 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. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Giessen, den 29.05.2013

12 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinem Doktorvater PD Dr. Yaser Abdallah für die Bereitstellung des Themas und für die gute Betreuung ganz herzlich danken.

Recht herzlich bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Susanne Rohrbach für die engagierte Unterstützung.

Allen Kollegen des physiologischen Instituts und besonders des Kalziumlabors möchte ich für die freundschaftliche Atmosphäre und Unterstützung während der gesamten Zeit danken.

Ganz besonderer Dank geht an Dr. Sascha A. Kasseckert, Dr. Wisam Iraqi, Dr. Muhammed Aslam, Dr. Ling Li und Dr. Rolf Schreckenber, die immer bereit waren Fragestellungen zu diskutieren. Danke auch an Benedikt Siegler für die Mithilfe bei der sprachlichen Korrektur.

Großen Dank schulde ich meiner Familie, die mich all die Jahre unterstützt und gefördert hat. Für die moralische Unterstützung danke ich meinen Schwiegereltern. Für Hilfe und Rat bei der Gestaltung der Dissertation im Rahmen der Struktur und Formatierung bedanke ich mich bei Özgür Emir, meinem Schwager.

Mein größter Dank gilt meiner Frau Nergis Micoogullari, für die Unterstützung, die Motivation und das Verständnis bei all meinen Entscheidungen.