

**Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies auf den  
zytosolischen Calciumgehalt  
koronarmikrovaskulärer Endothelzellen in der  
postischämischen Reperfusion**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Jessica Simone Hornung geb. Butz

Aus dem Physiologischen Institut des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. med. M. Diener

und

Aus dem Physiologischen Institut des Fachbereichs Medizin der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. med. Dr. phil. H. M. Piper

**Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies auf den  
zytosolischen Calciumgehalt  
koronarmikrovaskulärer Endothelzellen in der  
postischämischen Reperfusion**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
**Jessica Simone Hornung geb. Butz**  
Tierärztin aus Böblingen

Gießen 2013

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter:

1. Gutachter: Prof. Dr. med. M. Diener
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. phil. H. M. Piper
3. Gutachter: Prof. Dr. med. vet., Dipl. ECVIM-CA M. Schneider

Tag der Disputation: 25.10.2013

*Für meine Familie*

## **Veröffentlichungen von Ergebnissen dieser Arbeit**

### **Vorträge:**

**Peters S C, Nagy M A, Butz J, Piper H M**

Rolle von ROS und PLC bei der reperfusionsinduzierten Calciumüberladung der Endothelzelle.

74. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, März 2008 in Mannheim

**Butz J S, Piper H M, Peters S C**

Malfunction of the mitochondria causes reoxygenation-induced calcium overload in cardiac endothelial cells.

Main Meeting of The Physiological Society, Juli 2008 in Cambridge, UK

Vortrag C66

**Butz J S, Piper H M, Peters S C**

Mitochondrial ROS initiate reoxygenation-induced calcium overload in cardiac endothelial cells.

Acta Physiologica 2009; 195, Suppl 669:O8

The 88th Annual Meeting of The German Physiological Society, März 2009 in Giessen

**Butz J S, Peters S C, Piper H M**

Mitochondrien-generierte Radikalproduktion initiiert die Reperfusions-induzierte Calciumüberladung in koronaren Endothelzellen.

75 Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, April 2009 in Mannheim,

Vortrag 235

## Verzeichnis

### Abkürzungen

<b>1 Einleitung</b>	1
1.1 Fragestellung	1
1.2 Beschreibung des Modelles zur Erzeugung der partiellen Ischämie und Reperfusion	5
1.3 Pathophysiologie der Endothelzellen unter Ischämie-/Reperusionsbedingungen	7
1.3.1. Funktionelle Vielfalt des Endothels	7
1.3.2. Rolle der Mitochondrien im endothelialen Stoffwechsel	7
1.3.3. Zelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase von Endothelzellen	10
1.4 Entstehung und Wirkung von Radikalen in Endothelzellen	11
<b>2 Material und Methoden</b>	14
2.1 Material	14
2.1.1 Lösungen für die Zellpräparation und Zellkultur	14
2.1.2 Lösungen für die Fluoreszenzmessungen	15
2.1.3 Lösungen für die Molekularbiologie	16
2.1.4 Tiere für die Zellgewinnung	18
2.1.5 Isolation und Kultivierung kardialer Endothelzellen der Ratte	18
2.1.6 Konzentrationsangaben verschiedener Substanzen	20
2.2 Methoden	23
2.2.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an koronar-endothelialen Monolayern	23
2.2.1.1 Versuchsaufbau	23
2.2.1.2 Versuchsablauf	26
2.2.2 Fluoreszenzmikroskopische Messungen	26
2.2.2.1 Bestimmung des intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes	26
2.2.2.2 Bestimmung der Radikalentstehung	29
2.2.2.3 Messung des mitochondrialen Membranpotentials	31
2.2.2.4 Bestimmung des intrazellulären ATP-Spiegels	32
2.2.2.5 Bestimmung der interzellulären Lücken	32
2.2.3 Westernblot	33
2.2.3.1 Zellkultur und Stimulation	33
2.2.3.2 Lyse der Endothelzellen	33
2.2.3.3 Proteinbestimmung	33
2.2.3.4 Immunpräzipitation	34
2.2.3.5 Gelelektrophorese	35
2.2.3.6 Western-Blot-Analyse	35
2.2.4 Statistische Auswertung	37
<b>3 Ergebnisse</b>	38
3.1 Zytosolisches $\text{Ca}^{2+}$ während simulierter Ischämie und Reperfusion	38

# Verzeichnis

3.2	Radikalentstehung während simulierter Ischämie und Reperfusion	39
3.3	Einfluss der Radikalbildung auf den zytosolischen $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg während simulierter Reperfusion	41
3.4	Herkunft der Radikale während simulierter Reperfusion	43
3.5	Effekte verschiedener Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette auf die Radikalentstehung	46
3.6	Mitochondriales Membranpotential $\Delta\Psi_m$ während simulierter Ischämie und Reperfusion	48
3.7	Beeinflussung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$ während simulierter Reperfusion durch Radikalfänger	49
3.8	Zellulärer ATP-Gehalt während simulierter Ischämie und Reperfusion	51
3.9	Beeinflussung des ATP-Gehaltes während simulierter Reperfusion durch Radikalfänger und Inhibitoren der Atmungskette	53
3.10	Hemmstoffe der Atmungskette beeinflussen den $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel während simulierter Reperfusion	55
3.11	Zusammenhang zwischen Radikalen und Aktivierung der Phospholipase C	57
3.11.1	Wirkung von Inhibitoren der src-Kinasen auf den $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt während simulierter Reperfusion	57
3.11.2	Aktivierung der $\text{PLC}_{\gamma 1}$ durch Radikale	58
3.12	Effekte auf die interzelluläre Lückenbildung	62
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>65</b>
4.1	Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) mitochondrialer Herkunft während der Reperfusion	70
4.2	Entstehung von Radikalen in der mitochondrialen Atmungskette in Komplex II und III, nicht Komplex I	72
4.3	Radikale und $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung in der simulierten Reperfusion	75
4.4	Aktivierung der PLC durch Radikale	77
4.5	Bedeutung der src-Kinasen	79
4.6	Einfluss von Ischämie/Reperfusionsexperimenten auf den Energiestatus der Endothelzellen	80
4.7	Veränderungen des Mitochondriales Membranpotentials $\Delta\Psi_M$ durch simulierte Ischämie und Reperfusion	81
4.8	Einfluss der simulierten Reperfusion auf die interzelluläre Lückenbildung	83
4.9	Therapieansätze	84
4.10	Stellenwert des Myokardinfarktes in der Tiermedizin	84
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>86</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>87</b>

# Verzeichnis

<b>7 Literatur</b>	88
<b>8 Anhang</b>	106
8.1 Geräte und Messapparatur, Laborbedarf und eingesetzter Substanzen	106
8.2 Protokoll für die Proteinbestimmung	109
8.3 Tierschutzrechtliche Voraussetzungen	110
<b>8.4 Erklärung</b>	111
<b>8.5 Danksagung</b>	112

## Abkürzungen

### Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Aqua bidest.	zweifach demineralisiertes Wasser
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
°C	Grad Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	zytosolische freie Calciumionenkonzentration
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
DAG	1,2-Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	Endothelzellen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis(-aminoethylether) tetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere
FBS	„ <i>Foetal Bovine Serum</i> “ Fetales Kälberserum
ΔF/F <sub>0</sub>	Relative Änderung der Fluoreszenzintensität (F) im Verhältnis zur Hintergrundfluoreszenz (F <sub>0</sub> )
x g	x Erdbeschleunigung
GSH	Glutathion
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-2-ethansulfonsäure
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HUVEC	Endothelzellen der humanen Nabelvene (human umbilical vein endothelial cells)
IE	Internationale Einheiten
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-Trisphosphat
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NCS	„ <i>Neonatale Calf Serum</i> “ Neonatales Kälberserum
NO	Nitritoxid, Stickstoffmonoxid
n. s.	Keine Signifikanz
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxid-Anion
•OH	Hydroxylradikal
ONOO <sup>-</sup>	Peroxyinitrit

## Abkürzungen

p	Signifikanzniveau
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PLC	Phospholipase C
Q <sub>i</sub> -Zentrum	Ubichinon-Reduktionszentrum der Cytochrom-c-Reduktase
ROS	„ <i>reactive oxygen species</i> “ Sauerstoffradikale
S.	Seite
s.	siehe
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes
SOC	Speicher gesteuerter Kanal ( <i>store-operated channel</i> )
SOD	Superoxid-Dismutase
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
vs.	versus

# 1 Einleitung

## 1.1 Fragestellung

Kardiovaskuläre Erkrankungen gelten in westlichen Nationen heutzutage als eine der häufigsten Todesursachen. Aus diesem Grund kommt der Forschung zu diesem Thema ein hoher Stellenwert zu. Das Interesse richtet sich dabei besonders auf den Verlauf von Myokardinfarkten und die dadurch entstehenden Schäden für das Herz und den gesamten Organismus. Der Herzinfarkt zeichnet sich durch eine Unterbrechung der Blutzufuhr und dadurch bedingten Sauerstoff- und Energiemangel des Herzgewebes aus. In der klinischen Humanmedizin kann durch interventionelle Verfahren ein kurzzeitiger Gefäßverschluss rekanalisiert und damit eine Reperfusion des zuvor ischämischen Gewebes erreicht werden. Es wurde gezeigt, dass im Moment der Reperfusion, in dem die Zellen wieder mit Sauerstoff und Glukose versorgt werden, zusätzliche Schäden entstehen können (Maxwell und Lip 1997). Zur Erklärung dieses *Reperfusionsschadens* existieren in der wissenschaftlichen Literatur zwei unterschiedliche Hypothesen. Nach der einen Theorie kommt es während der Reperfusion zu einer fortgesetzten Zellschädigung, die schon während der Ischämie begonnen hat. Dabei wird der Standpunkt vertreten, dass ein eigenständiger Reperfusionsschaden, der eine irreversible Schädigung der Zellen zur Folge hat, nicht existiert (Matsumura et al. 1998). Die andere Hypothese besagt, dass durch metabolische Veränderungen während der Reperfusion irreversible zelluläre Schäden entstehen, die während der vorangegangenen Ischämie noch nicht vorhanden waren und deshalb als eigenständige Reperfusionsschäden angesehen werden müssen (Hearse 1977, Vanden Hoek et al. 2003).

Die Schäden der Myokardzellen nehmen nach der Hypothese eines eigenständigen Reperfusionsschadens erst in der Phase der Reperfusion ihr volles Ausmaß in Form von Zellkontraktur und Nekrose an. Als Auslöser des Geschehens werden die pH-Wert-Änderung zu Beginn der Reperfusion, die Wiederversorgung mit Sauerstoff und Energie und außerdem die Normalisierung der extrazellulären Osmolalität gesehen. Im Zusammenspiel bewirken diese Faktoren intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung, Zellkontraktur und -schwellung, die zusätzlich zu den Schäden der Ischämie entstehen (Piper et al. 1998). Diese Schäden führen bei Kardiomyozyten zu einer Zellnekrose mit dem besonderen morphologischen Merkmal von sog. *contraction bands*, in der Myofibrillen teilweise extrem kontrahiert und teilweise zerstört

## Einleitung

sind (Piper et al. 1998, Yellon und Hausenloy 2007). Es ist bekannt, dass sich durch Applikation verschiedener Substanzen mit Beginn der Reperfusion eine schützende Wirkung auf das Myokard gegen Zellschäden und Nekrose erzielen lässt (Hausenloy und Yellon 2004), was die Theorie der eigenständigen Reperfusionsschäden bestätigt.

Da Kardiomyozyten den Hauptbestandteil des Herzens darstellen, richteten sich Studien bisher überwiegend auf diesen Zelltyp. In Herzmuskelzellen findet in der Ischämie ein intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg statt. Dieser Anstieg verstärkt sich zusätzlich im Verlauf der Reperfusion (Allshire et al. 1987). In vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC) wurde nach Ischämie-/Reperfusionsexperimenten (I/R) ebenfalls ein intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg beobachtet (Dignan et al. 1992, Szadujkis-Szadurska et al. 2010). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass es auch in Endothelzellen des Herzens wie in Kardiomyozyten mit Beginn der Ischämiephase zu einem Anstieg des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  kommt, der sich in der Reperfusion noch verstärkt (Ladilov et al. 2000, Peters und Piper 2007). Ein anhaltender zytosolischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg wird allgemein als wichtiger Faktor hinsichtlich der Aktivierung von strukturschädigenden Mechanismen in der Zelle betrachtet (Curry 1992, Furchgott und Vanhouette 1993). In Endothelzellen löst ein zytosolischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg durch Aktivierung des kontraktiven Apparates z. B. die Bildung von interzellulären Lücken aus (Noll et al. 1995, Schäfer et al. 2003). Eine Zunahme der Permeabilität führt daraufhin in betroffenen Organen zu schädlicher Ödembildung (Watanabe et al. 1991, Garcia-Dorado et al. 1992). Ein typischer Verlauf der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kinetik von koronaren mikrovaskulären Endothelzellen in I/R-Experimenten ist in Abb. 1.2. (S. 5) dargestellt.

Die Erkenntnis, dass Endothelzellen eine eigene Rolle bei der Entstehung von Organschäden unter I/R-Bedingungen spielen, hat dazu geführt, dass sich die Forschung auch auf diesen Zelltyp ausgeweitet hat. Großes Interesse richtet sich dabei auf den zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg der Endothelzellen während Ischämie und Reperfusion. Die Ursache des  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieges in Endothelzellen während der Ischämiephase ist initial eine  $\text{IP}_3$ -gesteuerte Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern, die den folgenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum triggert (Schäfer et al. 2001). Der intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg wird dabei zunächst ursächlich durch Energiemangel und anschließend hauptsächlich durch den niedrigen pH-Wert während der Ischämie bewirkt (Noll et al. 1995, Ladilov et al. 2000, Schäfer et al. 2001).

## Einleitung

Besonderes Interesse richtet sich nun allerdings auf die postischämische Reperfusion, in der sich der zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg noch verstärkt, was vermutlich eine Ursache für den eigentlichen Reperfusionsschaden darstellt. Auch in der Reperfusion wird in Endothelzellen eine initiale Ausschüttung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) über Inositoltrisphosphat-gesteuerte Kanäle beschrieben. Daraufhin strömt  $\text{Ca}^{2+}$  von extrazellulär über sog. *store-operated channels* (SOC) in die Endothelzellen (Peters und Piper 2007). Die Phospholipase C (PLC) wird dabei als initialer Trigger der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschüttung gesehen (Peters und Piper 2007). Die aktivierte PLC bewirkt die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-Bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ), wobei die Botenstoffe Diacylglycerol (DAG) und Inositol-Trisphosphat ( $\text{IP}_3$ ) entstehen.  $\text{IP}_3$  bindet an Rezeptoren des ER und löst somit die initiale  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschüttung in das Zytosol aus (Ferris und Snyder 1992). Im Gegensatz zur Ischämie spielt der pH-Wert für die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschüttung der Endothelzellen in der Reperfusion nur eine untergeordnete Rolle (Ladilov et al. 2000). Bisher war noch nicht hinreichend geklärt, weshalb die PLC in Endothelzellen während der Reperfusion aktiviert wird. Aus der Literatur ist allerdings bekannt, dass die PLC durch ROS (reaktive Sauerstoffspezies) aktiviert werden kann (Lum und Roebuck 2001, Hong et al. 2006, Sato et al. 2009). Es wurde obendrein gezeigt, dass in der Reperfusion tatsächlich Radikale generiert werden (Hashimoto et al. 1994). Daher besteht die Möglichkeit, dass reaktive Sauerstoffspezies, die in der Reperfusion in den Endothelzellen entstehen, durch Aktivierung der PLC Einfluss auf die zellulären Signalwege haben und somit ein Auslöser für den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg sind. Als zelluläre Quellen für Radikalentstehung werden hauptsächlich die Atmungskette der Mitochondrien, die NADPH-Oxidase und die Xanthin-Oxidase diskutiert (Arroyo et al. 1990, Hashimoto 1994, Hohler et al. 2000, Sohn et al. 2003).

Ziel dieser Arbeit war es deshalb zu untersuchen:

- ob ROS in der postischämischen Reperfusion koronarer mikrovaskulärer Endothelzellen generiert werden,
- ob es einen Hinweis auf den Entstehungsort von ROS innerhalb der Endothelzelle gibt,

## Einleitung

- wie sich das mitochondriale Membranpotential und der ATP-Gehalt der Endothelzellen im Verlauf der Reperfusion verhalten, um den Einfluss entstandener Sauerstoffradikale auf wichtige zelluläre Funktionen zu untersuchen,
- ob es eine Beteiligung von Radikalen an der PLC $\gamma$ -Aktivierung in der Reperfusion gibt und ob die Entstehung von ROS zu einer intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Überladung der Endothelzellen führt,
- ob es eine Beteiligung von src-Kinasen an der PLC $\gamma$ -Aktivierung und der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Ausschüttung gibt und
- ob sich durch Hemmung der Radikalentstehung ein Effekt auf die interzelluläre Lückenbildung in der Reperfusion erzielen lässt.

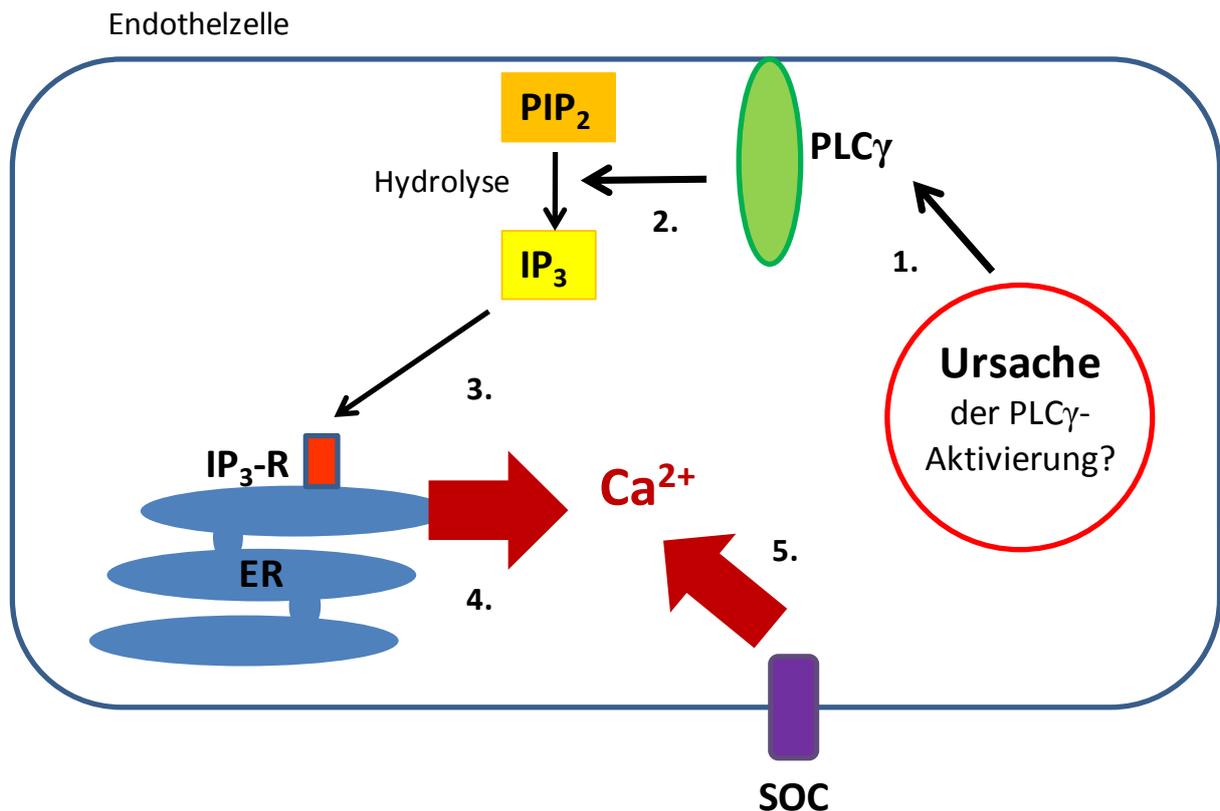


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Signalweges, der innerhalb einer Endothelzelle während der Reperfusion zur intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Überladung führt: 1. Aktivierung der PLC $\gamma$ . 2. Die aktivierte PLC $\gamma$  bewirkt die Hydrolyse von PIP<sub>2</sub> zu IP<sub>3</sub>. 3. IP<sub>3</sub> bindet an IP<sub>3</sub>-Rezeptoren (IP<sub>3</sub>-R) des Endoplasmatischen Retikulums (ER). 4. Aus dem ER strömt Ca<sup>2+</sup> ins Zytosol. 5. Es folgt der Ca<sup>2+</sup>-Einstrom vom Extrazellulärraum durch SOC (store operated channels) in die Zelle.

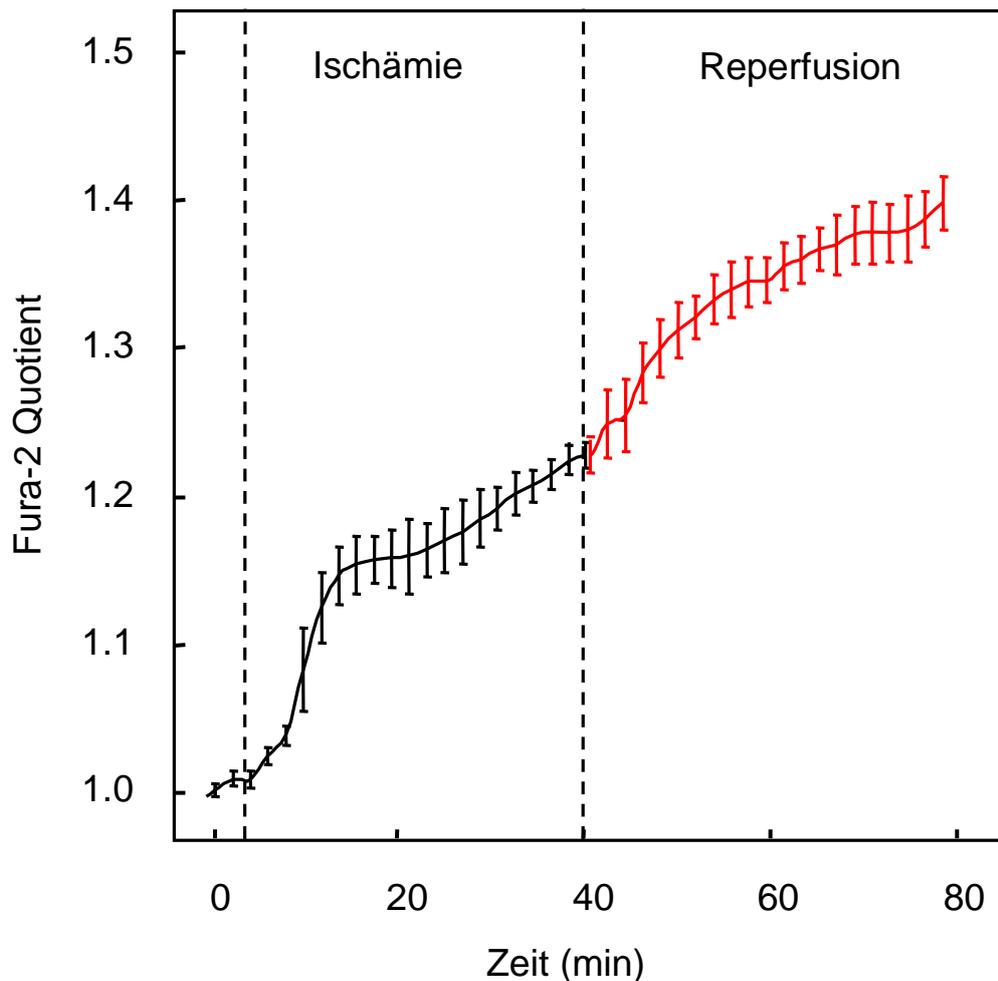


Abbildung 1.2:  $\text{Ca}^{2+}$ -Messung mit dem Farbstoff Fura-2. Anstieg des Fura-2-Signals während 5 min Normoxie und 40 min simulierter Ischämie. Anschließend zusätzliche intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Zunahme im Verlauf 40 min simulierter Reperfusion (Diagramm modifiziert nach Peters und Piper 2007).

## 1.2 Beschreibung des Modelles zur Erzeugung der partiellen Ischämie und Reperfusion

Bei einem Verschluss oder einer Einengung eines Gefäßes wird das Gewebe nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt, was zu Substratmangel führt. Außerdem kommt es aufgrund der anaeroben Verhältnisse zu einer Anhäufung von Laktat und dadurch zu einer Verschiebung des pH-Wertes in den sauren Bereich (Gores et al. 1989, Fujiwara et al. 1992, Gourdin et al. 2009). Endothelzellen reagieren auf den Mangel an Energie und Sauerstoff im Vergleich zu Kardiomyozyten eher unempfindlich und können ihren ATP-

## Einleitung

Spiegel über einen längeren Zeitraum stabil halten (Culic et al. 1997). Die Freisetzung von Protonen und Laktat der empfindlicheren Kardiomyozyten in der Nähe der Endothelzellen führt jedoch dazu, dass auch bei Endothelzellen eine schnelle Verschiebung des zytosolischen pH-Wertes stattfindet (Ladilov et al. 2000).

In der Forschung gibt es verschiedene Modelle, um das Ischämie-/Reperfusionsgeschehen zu simulieren. Um eine Ischämie in-vivo zu erzeugen, wird bei einem Versuchstier unter Narkose eine temporäre Ligatur des Gefäßes durchgeführt. Dabei wirkt sich die Unterbrechung des Blutflusses innerhalb eines Organes auf den ganzen Organismus aus und erzeugt so eine sehr realistische Reaktion des Körpers auf einen künstlichen Eingriff. Eine In-vitro-Methode zur Untersuchung am isolierten Organ ist die Langendorff-Perfusion, bei der das komplette Herz entnommen wird und durch Unterbrechung der Perfusion eine Ischämie erzeugt werden kann, auf die eine Reperfusion folgt. Dabei beeinflusst das Zusammenspiel verschiedener Zelltypen wie Kardiomyozyten, glatter Muskelzellen und Endothelzellen die Reaktion des Organs, wie es auch am intakten Koronarsystem zu erwarten wäre. Bei der In-vitro-Methode der vorliegenden Arbeit werden die zu untersuchenden Zellen aus dem Organ isoliert und an diesen gewonnenen Primärzellen und deren Passagen in der Zellkultur Ischämie- und Reperfusionsexperimente durchgeführt. Dabei ist der Vorteil, dass die so erzielten Ergebnisse ausschließlich dem entsprechenden Zelltyp zugesprochen werden können und so zelltypspezifische Mechanismen identifiziert und analysiert werden können.

In dieser Arbeit wurden Untersuchungen an frisch isolierten kultivierten koronaren mikrovaskulären Endothelzellen durchgeführt, die aus Rattenherzen gewonnen wurden. Diese Zellen bieten im Vergleich zu Zelllinien den Vorteil, weitgehend mit den Eigenschaften des ursprünglichen Gewebes übereinzustimmen. Endothelzellen sind bisher im Ischämie-/Reperfusionsgeschehen des Herzens wenig untersucht, obwohl das Endothel das erste Organ des Körpers ist, das mit den schädigenden Einflüssen in Kontakt kommt (Suval et al. 1987). Um für Endothelzellen eine dem Myokardinfarkt vergleichbare Situation zu simulieren, wurden die Zellen in ein luftdichtes System verbracht. Anstelle von Blut wurde durch die Kammer ein Puffer geleitet. Zunächst wies der Puffer einen normalen Sauerstoffgehalt auf. Um in der Zellkammer die Bedingungen einer partiellen Ischämie zu erzeugen, wurde ein Wechsel des Perfusionsmediums eingeleitet, um Substratmangel zu simulieren. Dabei wurde ein glukose- und sauerstofffreier Puffer mit saurem pH-Wert verwendet.

Die anschließende Reperfusion wurde in dieser Arbeit simuliert, indem am Ende der Ischämiephase ein anderes Perfusionsmedium zu den Endothelzellen geleitet wurde. Dieser

Puffer wies einen physiologischen Sauerstoffgehalt und einen physiologischen pH-Wert von 7,4 auf und war wieder mit einem Energiesubstrat in Form von Glukose angereichert.

### **1.3 Pathophysiologie der Endothelzellen unter Ischämie-/ Reperusionsbedingungen**

#### **1.3.1 Funktionelle Vielfalt des Endothels**

Die innere Auskleidung aller Blutgefäße und des Herzens besteht aus einer Schicht Endothelzellen. Dieser dünne Monolayer hat in einem Menschen schätzungsweise insgesamt eine Masse von 1,5–3,5 kg (Just et al. 1994, Bassenge 1996). Die Endothelzellen können abhängig von ihrer Lokalisation im Organismus unterschiedlich dichte Barrieren ausbilden. Das wird durch die Art und Anzahl der Zell-Zell-Verbindungen zwischen den Endothelzellen bestimmt. Furchgott und Zawadski zeigten 1980, dass Endothelzellen neben der Barrierefunktion eine erhebliche Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus spielen. Die Veränderungen des Vasotonus haben dabei direkten Einfluss auf den Blutdruck und werden wiederum von diesem bestimmt. Neben der Regulation des Blutdruckes kontrolliert das Endothel auch die Gerinnung und Koagulation und unterstützt das Gleichgewicht der Hämostase (Staubesand 1994). Eine weitere Aufgabe des Endothels ist die Steuerung der Adhäsion und Emigration der Leukozyten bei einer Entzündungsreaktion (Jaffe 1985, Cotran 1987). Außerdem sind Endothelzellen an der Angiogenese beteiligt (Jaffe 1985). Aufgrund seiner vielfältigen Funktionen wird das vaskuläre Endothel, auch wenn es nur als hauchzarter Monolayer in den Blutgefäßen und Organen vorkommt, mittlerweile als eigenständiges, sehr aktives Organ betrachtet.

#### **1.3.2 Rolle der Mitochondrien im endothelialen Stoffwechsel**

Im Gegensatz zu Kardiomyozyten, die unter aeroben Verhältnissen ihren Energiebedarf zum Großteil durch Metabolisierung von Laktat und Fettsäuren decken, stellt die glykolytische ATP-Produktion die Hauptenergiequelle (75–99 %) der koronaren Endothelzellen bei der Umwandlung von Glukose zu Pyruvat dar (Spahr et al. 1989, Krützfeldt et al. 1990, Culic et al. 1997). Außerdem besitzt der Hexose-Monophosphatweg der Endothelzellen (EC) mit 1 % eine große Kapazität (Krützfeldt et al. 1990, Culic et al. 1997). Der weitere aerobe

## Einleitung

Energiestoffwechsel der Endothelzellen findet durch oxidative Phosphorylierung innerhalb der mitochondrialen Atmungskette statt.

Die Atmungskette ist aus fünf Enzymkomplexen aufgebaut: der NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase (Komplex I), der Succinat-Ubiquinon-Oxidoreduktase (Komplex II), der Cytochrom-c-Reduktase (Komplex III), der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) und der ATP-Synthase (Komplex V). Von den energiereichen Molekülen NADH und FADH<sub>2</sub>, die bei der Glykolyse, der Fettsäureoxidation und im Citratzyklus entstehen, werden Elektronen über die ersten vier Komplexe der Atmungskette auf molekularen Sauerstoff übertragen, wobei von den Komplexen I, III und IV gleichzeitig Protonen durch die Membran geleitet werden. Die F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase (ATP-Synthase) kann das dabei erzeugte Membranpotential zur ATP-Produktion nutzen und stellt den eigentlich energielieferenden Prozess für die Zelle dar (Mitchel 1961, Wikström 1984, Hatefi 1985, Saraste 1999, Berg et al. 2007).

### Inhibitoren der Atmungskette

Die mitochondriale Atmungskette kann an den einzelnen Komplexen durch spezielle Inhibitoren blockiert werden. Die folgende Auflistung schließt nur die Substanzen ein, die in dieser Studie eingesetzt wurden.

#### Inhibitoren von Komplex I:

**Rotenon:** Hemmung der Protonen- und Elektronenübertragung der NADH-Q-Reduktase. Dabei wird der Elektronenfluss über den Komplex II nicht beeinträchtigt (Lehninger, Nelson, Cox 1994, Li et al. 2003).

**Diphenyleneiodonium-Chlorid (DPI):** Hemmung von Komplex I durch irreversible Inhibition der NO-Synthase (Lambert et al. 2008).

#### Inhibitor von Komplex II:

**Thenoyl Trifluoroacetone (TTFA):** blockiert die Übertragung von Wasserstoff auf Ubichinon des Q-Zyklus vor Komplex III der Atmungskette (Ingledeew und Ohnishi 1977, Indo et al 2007, Liu et al. 2010).

#### Inhibitor von Komplex III:

**Antimycin A:** Hemmung der Übertragung des Elektrons von Cytochrom b auf Ubichinon am Qi-Zentrum (dem Ubichinon-Reduktionszentrum auf der Matrixseite) in Komplex III. (Chandel et al 2000, Turrens 2003, Indo et al. 2007, Liu et al. 2010).

## Einleitung

### Inhibitor von Komplex V:

**Oligomycin:** Spezifische Inhibition der  $F_1F_0$ -ATPase durch Bindung an deren  $F_0$ -Einheit. Dies bewirkt eine Blockade des Protonenflusses durch die innere Mitochondrienmembran, der für die Umwandlung von ADP zu ATP benötigt wird (Lehninger, Nelson, Cox 1994, Grover et al. 2004a, Kyoj et al. 2006).

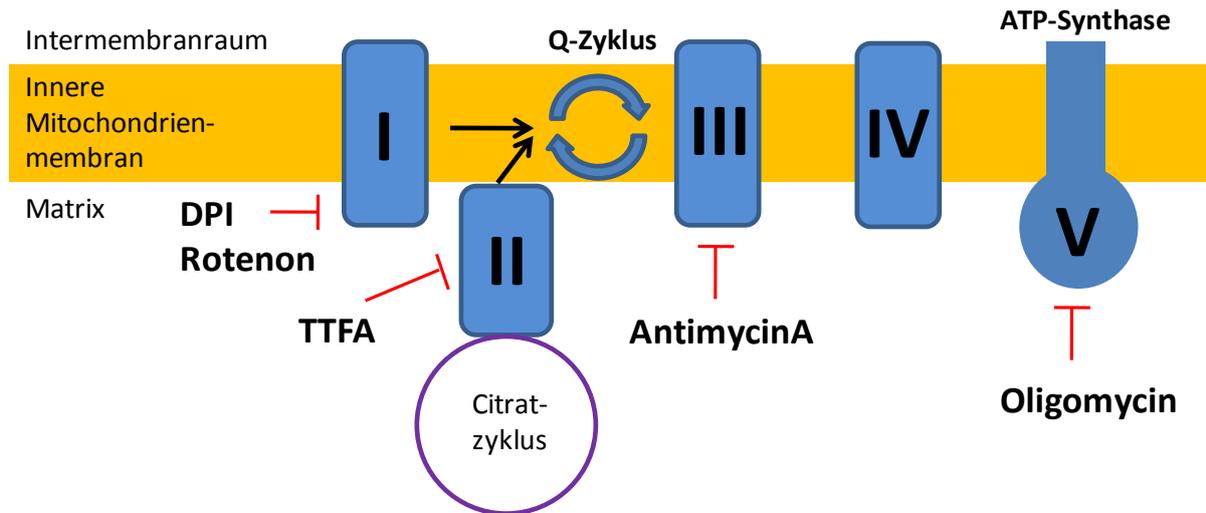


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der inneren Mitochondrienmembran mit den Komplexen der Atmungskette und deren Inhibitoren.

Insgesamt führen Inhibitoren der Atmungskette dazu, dass einerseits die Energiegewinnung der Zelle, parallel dazu aber auch die Entstehung von Radikalen innerhalb der Atmungskette in unterschiedlichem Ausmaß beeinflusst werden.

Rotenon, DPI und TTFA führen zwar zum Erliegen des Elektronenflusses innerhalb der Komplexe I oder II, jedoch kann die Energiegewinnung der oxidativen Phosphorylierung in eingeschränktem Maße noch fortgesetzt werden (Saraste 1999, Berg et al. 2002). Der Grund dafür ist, dass Komplex I und II nicht direkt hintereinander geschaltet sind, sondern beide eigenständig den Elektronentransfer weiterführen können. Dies ist möglich, da sowohl Komplex I als auch Komplex II Wasserstoffatome in den Q-Zyklus einbringen, die dann durch Ubichinol in der Atmungskette weitergeführt werden (Lehninger, Nelson, Cox 1994, Berg et al. 2002, Cecchini 2003). Komplex II ist ein Teil des Citratzyklus und gleichzeitig in die Elektronentransportkette der mitochondrialen Atmungskette als membranständiges Protein eingebunden. Im Gegensatz zu den anderen Komplexen der Atmungskette durchspannt Komplex II nicht die innere Mitochondrienmembran und kann deshalb nicht als

## Einleitung

Protonenpumpe fungieren. Zunächst katalysiert die Succinat-Dehydrogenase die Oxidation von Succinat zu Fumarat, wobei Succinat aus dem Citratzyklus stammt. Die dabei anfallenden Elektronen reduzieren Ubichinon zu Ubichinol, welches als Elektronenüberträger von Komplex II auf Komplex III dient (Lehninger, Nelson, Cox 1994, Cecchini 2003).

Die Blockade von Komplex III mit Antimycin A hat den Effekt, dass sie einerseits zu gehemmtem Sauerstoffverbrauch an Komplex IV und zur Blockade der ATP-Synthese führt, andererseits aber auch eine Anhäufung der bis dahin gebildeten Reaktionsprodukte wie z. B. Ubisemiquinon bewirkt. Angehäuftes Ubisemiquinon wird dabei seinerseits als Radikalproduzent diskutiert (Turrens 2003).

Oligomycin bewirkt als Inhibitor der ATP-Synthase durch Bindung an deren  $F_0$ -Einheit einen stark verlangsamten Abbau des Protonengradienten durch den  $H^+$ -Kanal des Enzymes und führt damit fast zum kompletten Erliegen des Elektronenflusses der Atmungskette (Lehninger, Nelson, Cox 1994a, Berg et al. 2002).

Die Bindungsstelle für molekularen Sauerstoff des Komplexes IV kann durch Cyanid, Azid und CO inhibiert werden. Dadurch kommt es zur Anhäufung von Elektronen aus den vorangegangenen Komplexen der Atmungskette, da diese nicht auf molekularen Sauerstoff übertragen werden können (Berg et al. 2002).

### 1.3.3 Zelluläre $Ca^{2+}$ -Homöostase von Endothelzellen

Der intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Gehalt wird von der Zelle in engen Grenzen innerhalb 50–600 nM reguliert (Bootman et al. 2001). Verantwortlich hierfür sind verschiedene Kanäle auf der Zelloberfläche wie auch im Zellinneren. In der Zellmembran der Endothelzellen regulieren verschiedene  $Ca^{2+}$ -Transporter den Einstrom von  $Ca^{2+}$ . Hier sind einerseits mechanisch aktivierbare und andererseits speichergesteuerte (SOC)  $Ca^{2+}$ -Kanäle zu erwähnen. Auch spannungsabhängige Kanäle werden bei Endothelzellen beschrieben, diesen kommt aber im Vergleich zu Zellen der glatten Muskulatur hier eine untergeordnete Bedeutung zu (Tran et al. 2000). Außerdem werden unselektive Kationenkanäle beschrieben. Intrazellulär sind die  $Ca^{2+}$ -Kanäle des Endoplasmatischen Retikulums für Endothelzellen von großer Bedeutung, da diese größere Mengen  $Ca^{2+}$  ins Zytosol ausschütten können (Tran et al. 2000). Für den  $Ca^{2+}$ -Ausstrom aus dem endothelialen Zytosol spielen  $Ca^{2+}$ -Pumpen auf der Plasmamembran und der Oberfläche des Endoplasmatischen Retikulums, der  $Na^+/Ca^{2+}$ -Austauscher in der Zellmembran und der  $Ca^{2+}$ -Transporter der Mitochondrien eine wichtige Rolle. Im Zellinneren der Endothelzellen sind als  $Ca^{2+}$ -Speicher sowohl das Endoplasmatische

## Einleitung

Retikulum als auch die Mitochondrien involviert (Laskey et al. 1992, Bootman et al. 2001, Malli et al. 2005). Die verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierenden Kanäle stabilisieren bei ruhenden Zellen einen zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt von ca. 100 nM (Bootman et al. 2001). Nach der Literatur liegt der zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel unstimulierter Endothelzellen der Rattenaorta bei etwa 100 nM. Als Reaktion auf ATP wird in diesem Zelltyp von einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg auf ca. 800 nM berichtet (Usachev et al. 1995). Auch bei Stimulation anderer Art, wie Depolarisation der Plasmamembran, mechanischer Verformung, hormoneller Aktivierung und Sauerstoffmangel, wird ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg bis zu 1  $\mu\text{M}$  beschrieben (Laskey et al. 1992, Bootman et al. 2001).

Die physiologischen Aufgaben des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  sind sehr vielfältig.  $\text{Ca}^{2+}$  vermittelt die Gen-Transkription, die Aktivierung des kontraktilen Apparates sowie die Zellproliferation und überträgt viele weitere physiologische Signale. Von großer Bedeutung ist  $\text{Ca}^{2+}$  für die Zelle aber auch bei der Reaktion auf zellschädigende Einflüsse. Zytosolischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg setzt Veränderungen des Zytoskeletts, Schwellung der Mitochondrien, Strangbrüche der DNA und Genexpression in Gang. Die Fähigkeit der Zelle, die Schäden zu reparieren, entscheidet dann, ob es sich um eine reversible Veränderung handelt oder ob die Zelle in Nekrose oder Apoptose geht (Bootman et al. 2001, Borutaite 1999, Trump und Berezsky 1995).

### **1.4 Entstehung und Wirkung von Radikalen in Endothelzellen**

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die während der Reperfusion vermehrt entstehen, werden entweder als direkte Ursache der Zellschädigung (Lum und Roebuck 2001) oder indirekt als Stimulus des schädigenden intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieges (Dreher und Junod 1995) diskutiert. Es gibt mittlerweile die Erkenntnis, dass die Radikalentstehung in Endothelzellen bei ischämie-/reperusionsbedingten Organschäden beteiligt ist (Schinetti et al. 1989).

Die wichtigsten vorkommenden Radikalspezies sind dabei das Sauerstoffradikal Superoxid-Anion  $\text{O}_2^-$ , das Hydroxylradikal ( $\bullet\text{OH}$ ) und das aufgrund seiner Reaktionsfreudigkeit zu den reaktiven Sauerstoffspezies gehörende  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Rodney et al. 2000). Das Superoxid-Anion  $\text{O}_2^-$  ist sehr instabil und wird schon kurz nach seiner Entstehung entweder spontan oder enzymatisch in  $\text{H}_2\text{O}_2$  umgewandelt.  $\text{H}_2\text{O}_2$  wiederum ist stabiler und kann im Gegensatz zu  $\text{O}_2^-$  aus dem Mitochondrium diffundieren.  $\text{H}_2\text{O}_2$  selbst ist nur zu einem geringeren Teil für Oxidationsschäden verantwortlich, kann jedoch über eine Reaktion vom Fenton-Typ metallionenkatalysiert reaktive Hydroxyl-Radikale ( $\bullet\text{OH}$ ) generieren und dadurch indirekt DNA-Schäden verursachen (Li und Jackson 2002). Außerdem entstehen in Endothelzellen

## Einleitung

u. a. noch die reaktiven Sauerstoffspezies Nitritoxid (NO) und Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>) (Li und Shah 2004).

Unter physiologischen Bedingungen werden 1–2 % des Sauerstoffes, der in der Atmungskette der Mitochondrien reduziert wird, zu O<sub>2</sub><sup>-</sup> umgewandelt. Dabei werden die Komplexe I und III als Hauptort für physiologische Radikalentstehung diskutiert (Kowaltowski und Vercesi 1999). Als Quellen der Radikalproduktion werden außer der Atmungskette auch der mitochondriale Zitratzyklus, die Xanthin-Oxidase in Endothelzellen der humanen Nabelschnurvene (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) (Hashimoto et al. 1994) und die NADPH-Oxidase in arteriellen Endothelzellen der Schweinelunge (Hohler et al. 2000) beschrieben. Die Auswirkungen, die reaktive Sauerstoffspezies auf die Gefäßfunktionen haben, hängen stark von deren Konzentration ab. Reaktive Sauerstoffspezies erfüllen im Organismus in physiologischen Konzentrationen vielfältige Aufgaben, wie z. B. die Signalübertragung. Sie beeinflussen außerdem das Wachstum der glatten Muskelzellen, der Gefäße und der Fibroblasten (Lum und Roebuck 2001, Griendling und FitzGerald 2003). Die Radikalbildung wird deshalb durch zelleigene Antioxidantien im Gleichgewicht gehalten. Die zellulären Antioxidantien werden in nichtenzymatische und enzymatische Radikalfänger unterteilt. Die nichtenzymatischen Antioxidantien der Endothelzellen sind Harnsäure, Ascorbinsäure (Vitamin C),  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E) und Glutathion. Die wichtigsten enzymatischen Radikalfänger sind die Superoxid-Dismutase (SOD), die sowohl im Zytosol als auch in der Mitochondrienmatrix in unterschiedlichen Formen vorliegt und O<sub>2</sub><sup>-</sup> zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> umwandelt (Slot et al. 1986), außerdem die zelleigene Katalase und die Glutathion-Peroxidase (Li und Shah 2004), die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> außerhalb der Mitochondrien zu Wasser abbauen (Mattiasson 2004).

Während verschiedener pathologischer Prozesse, wie z. B. bei Entzündungsgeschehen, Scherstress, Zellverformung (Lum und Roebuck 2001, Griendling und FitzGerald 2003) und in den ersten Minuten der postischämischen Reperfusion (Hashimoto et al. 1994, Zweier et al. 1988), werden diese Radikale vermehrt gebildet und können vermutlich von den zelleigenen Radikalfängern nicht mehr unter Kontrolle gehalten werden. Oxidativer Stress findet in dem Moment statt, in dem die ROS-Entstehung die zelluläre antioxidative Kapazität übersteigt (Dreher und Junod 1995). Folgen des entstandenen Radikalüberschusses sind u. a. DNA-Schäden, verminderte Proteinsynthese und Apoptose (Jornot et al. 1991, Lum und Roebuck 2001, Griendling und FitzGerald 2003).

## Einleitung

Neben den zelleigenen Radikalfängern existieren einige künstlich erzeugte Substanzen, die eine ähnliche Wirkung aufweisen wie ihre natürlichen Vorbilder. MitoQ z. B. stellt eine künstliche Form des zelleigenen Ubichinons dar, das durch eine kovalente Bindung mit einem lipophilen Kation die Fähigkeit erlangt, in die innere Mitochondrienmembran vorzudringen. Dort wird es von der Atmungskette von Ubichinon zu der reaktiven Form Ubichinol reduziert, welches als Elektronenüberträger von Komplex I bzw. II auf III funktioniert, aber auch effektiv als Antioxidanz die Lipidperoxidation und Schädigung des Mitochondriums verhindert und von der Atmungskette danach wieder katalytisch in die reaktive Form umgewandelt wird (Kelso et al. 2001). Ein anderer künstlich erzeugter Radikalfänger, der in dieser Studie eingesetzt wurde, ist Trolox. Es ist die synthetische, wasserlösliche Form des lipophilen Vitamin E, das durch Unterbindung der Lipidperoxidationskette die Bildung von Lipidradikalen an der Zellmembran hemmt (Wongmekiat et al. 2007). Des Weiteren wurde N<sub>2</sub>-Mercaptopropionylglycin (MPG) verwendet, ein synthetisches Analogon von Glutathion, welches hauptsächlich H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> abfängt (Horwitz et al. 1994, Abdo et al. 2003), und N-Acetyl-L-Cystein (NAC), das als SH-Quelle die GSH-Synthese stimuliert, zusätzlich die Glutathion-S-Transferase-Aktivität fördert und so direkt das Radikalaufkommen reduziert (Wongmekiat et al. 2007, Abdo et al. 2003, Kelly 1998).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 MATERIAL

#### 2.1.1 Lösungen für die Zellpräparation und Zellkultur

##### **Powell-Medium Hepes-gepuffert:**

NaCl	<i>MW: 58,44 g/mol,</i>	110,0 mmol/l	6,43 g/l
KCl	<i>MW: 74,55 g/mol,</i>	2,6 mmol/l	0,19 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	<i>MW: 136,09 g/mol,</i>	1,2 mmol/l	0,16 g/l
MgSO <sub>4</sub>	<i>MW: 246,48 g/mol,</i>	1,2 mmol/l	0,30 g/l
HEPES	<i>MW: 238,3 g/mol,</i>	25 mmol/l	59,58 g/l
Glucose	<i>MW: 198,17 g/mol</i>	11,0mol/l	2,00 g/l

Titration auf pH 7,4 mit NaOH

Begasung: kontinuierlich mit 100 % Sauerstoff

##### **Ca<sup>2+</sup>-Stammlösung:**

CaCl<sub>2</sub> (100,0 mM)

##### **Collagenasepuffer:**

Powell-Medium	50 ml
Collagenase	25 mg
Ca <sup>2+</sup> -Stammlösung	12,5 µl

##### **Ansatz Medium 199:**

M199 <sup>®</sup>	9,8 g/l
Aqua dest.	10 l
HEPES	36 g/l
NaHCO <sub>3</sub>	15 g

Einstellung auf pH 7,4 mit NaOH

##### **Kultivierungsmedium:**

Medium199 <sup>®</sup> /CO <sub>2</sub>	
NCS	10 % (vol/vol)
FBS	10 % (vol/vol)
Penicillin-Streptomycin (1.-2.Tag)	(250 IE/ml Penicillin; 250 µg/ml Streptomycin)
Penicillin-Streptomycin (ab dem 3. Tag)	(100 IE/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin)

### **Modifizierte HEPES-gepufferte Tyrode-Lösung ohne Ca<sup>2+</sup>**

NaCl	<i>MW: 58,44 g/mol,</i>	125,0 mmol/l	7,30 g/l
KCl	<i>MW: 74,55 g/mol,</i>	2,6 mmol/l	0,19 g/l
MgSO <sub>4</sub> *6 H <sub>2</sub> O	<i>MW: 203,31,48 g/mol</i>	1,2 mmol/l	0,24 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	<i>MW: 130,09 g/mol,</i>	1,2 mmol/l	0,16 g/l
HEPES	<i>MW: 238,3 g/mol,</i>	25 mmol/l	5,96 g/l

Titration auf pH 7,4 mit NaOH

### **2.1.2 Lösungen für die Fluoreszenzmessungen**

#### **Perfusionsmedien**

##### **HEPES- gepufferte Tyrode Lösung: Normoxiemedium**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	<i>MW: 136,09 g/mol,</i>	1,2 mmol/l	0,82 g/l
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	<i>MW: 246,48 g/mol,</i>	1,2 mmol/l	1,48 g/l
KCl	<i>MW: 74,55 g/mol,</i>	2,27 mmol/l	0,85 g/l
NaCl	<i>MW: 58,44 g/mol,</i>	139,53 mmol/l	40,77 g/l
HEPES	<i>MW: 238,3 g/mol,</i>	25 mmol/l	29,78 g/l

Titration des pH-Wertes bei 30°C auf pH 7,4 mit NaOH

Kurz vor Versuchsbeginn Zugabe von CaCl<sub>2</sub> (1.3 mmol/l)

##### **HEPES-gepufferte Tyrode Lösung: Anoxiemedium**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	<i>MW: 136,09 g/mol,</i>	1,2 mmol/l	0,82 g/l
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	<i>MW: 246,48 g/mol,</i>	1,2 mmol/l	1,48 g/l
KCl	<i>MW: 74,55 g/mol,</i>	2,27 mmol/l	0,85 g/l
NaCl	<i>MW: 58,44 g/mol,</i>	148,69 mmol/l	43,45 g/l
HEPES	<i>MW: 238,3 g/mol,</i>	25 mmol/l	29,78 g/l

Titration des pH-Wertes bei 30°C auf pH 6,4 mit NaOH. Im Anschluss Zugabe von:

Resazurin	<i>MW: 147,0 g/mol,</i>	1,5 µmol/l	50 µl/l
DL-Cystein	<i>MW: 121,2 g/mol</i>	0,83 mmol/l	200 mg/l

Begasung mit N<sub>2</sub>

Das Medium wurde nach der von Allshire (1987) beschriebenen Methode autoklaviert und in luftdichten Gefäßen aufbewahrt.

Kurz vor Versuchsbeginn Zugabe von CaCl<sub>2</sub> (1.3 mmol/l)

Der Redox-Indikator Resazurin hatte in den Versuchen die Aufgabe, einerseits geringe Restmengen an Sauerstoff zu binden, und andererseits durch die Farbänderung zu signalisieren, falls noch zu viel Sauerstoff im Anoxiemedium vorhanden war. So konnte davon ausgegangen werden, dass ein farbloses Medium weniger als 21,9 µPa Sauerstoffpartialdruck aufwies, da erst ab dieser Sauerstoffmenge das farblose, reduzierte Dihydroresurufin zu Resurufin oxidiert und dadurch eine pinke Verfärbung erkennbar wurde (Allshire 1987).

## Material und Methoden

### **Beladungsmedium:**

Normoxiemedium mit Zusatz von 2 % FBS/NCS

### **Reperusionsmedium:**

Normoxiemedium mit Zusatz von Glucose (2,5 mmol/l)

### **Kalibrierungslösung:**

KCl	(125 mM)
HEPES	(25 mM)
NaCl	(10 mM)
MgSO <sub>4</sub>	(1 mM)
Ionomycin	(5 µM)

Zusatz von EGTA	(5 mM)
oder CaCl <sub>2</sub>	(3 mM)

Titration des pH-Wertes bei 30°C auf 6,4 oder 7,4

### **2.1.3. Lösungen für die Molekularbiologie**

#### **PBS:**

NaCl	<i>MW: 58,44 g/mol,</i>	(1,37 M)
KCl	<i>MW: 74,55 g/mol</i>	(27 mM)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		(80 mM)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		(18 mM)
pH 6,8-7,3		

#### **Lysispuffer:**

##### **Stammpuffer:**

Dulbecco`s PBS w/o Ca & Mg	9 ml
1 % Nonidet P-40 (10 %ig)	1 ml
Kurz vor Gebrauch ansetzen:	
Stammpuffer	139,2 µl
PMSF (1 mM)	1,5 µl
Pepstatin (1 µg/ml)	0,3 µl
Beta-Glycerolphosphat (40 mM)	6 µl
Sigma Phosphatase Cocktail 2	3 µl
Benzonase	10 µl

## Material und Methoden

### **TBST:**

NaCl (150 mM)

Tris/HCl (10 mM)

0,1 % Tween-20

pH-Wert 7,5

### **Natriumphosphatpuffer (0,1 M)**

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (156,01 M) 3,39 g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (178 M) 21,7 g

pH 7,44

Aqua bidest. ad 1000ml

### **Strippuffer**

Glycin 15 g

SDS 1 g

Tween-20 10 ml

Einstellen des pH-Wertes auf 2,2

Aqua bidest. ad 1000 ml

### **2.1.4 Tiere für die Zellgewinnung**

Für die Gewinnung der koronaren mikrovaskulären Endothelzellen wurden männliche Ratten des Auszuchtstammes Han:Wistar aus institutseigener Zucht mit einem Gewicht zwischen 200 und 300 g und einem Alter von ca. 3 Monaten eingesetzt. Die Ratten wurden unter konventionellen Bedingungen gehalten und erhielten ad libitum Zucht-/ oder Haltungsfutter (Nr. 1314 der Firma Altromin) und Wasser.

### **2.1.5 Isolation und Kultivierung kardialer Endothelzellen der Ratte**

#### **Präparation und Kultivierung der koronaren mikrovaskulären Endothelzellen**

Die Präparation der koronaren mikrovaskulären Endothelzellen erfolgte in Anlehnung an ein Protokoll von Piper und Mitarbeitern (Piper et al. 1990).

Die Ratten wurden mit Ether oder CO<sub>2</sub> mit einer Flussrate von 6 l/Typ III Käfig betäubt und umgehend durch zervikale Dislokation getötet. Danach wurde der Thorax eröffnet und das Geschlinge herausgelöst, indem der Ösophagus sowie die Trachea und die Aorta durchtrennt wurden. Die Organe wurden unverzüglich in kalte 0,9 % NaCl-Lösung gelegt. Das Herz wurde aus dem umliegenden Gewebe freipräpariert, der Aortenbogen wurde kaudal des Truncus brachiocephalicus abgetrennt und an der Aorta an einer Langendorff-Apparatur befestigt. Dann wurde das Herz mit ca. 20 ml O<sub>2</sub>-begastes Powell-Medium bei 37°C perfundiert, um das verbliebene Blut aus den Koronargefäßen zu entfernen. Anschließend erfolgte eine rezirkulierende Perfusion mit Collagenasepuffer mit einer Flussgeschwindigkeit von 2-3 ml/min. Das Medium wurde dabei konstant auf 37°C erwärmt. Nach 30 min wurde das Herz von der Langendorff Apparatur entfernt und distal der Vorhöfe abgetrennt. Das abgetrennte Gewebe wurde daraufhin mit einem Gewebehacker in Stücke von ca. 0,3 x 0,3 mm Größe zerkleinert. Im Anschluss daran wurde das Gewebe für fünf Minuten bei 37°C in Collagenasepuffer inkubiert.

Um die Endothelzellen aus ihrem Zusammenhalt zu lösen, wurden sie mit einer 5 ml Pipette auf und ab pipettiert. Die verbliebenen Zellaggregate wurden getrennt, indem die Suspension durch einen Nylonfilter mit einer Porengröße von 0,2 mm filtriert wurde. Das Filtrat wurde in zwei 50 ml fassende Plastikgefäße überführt und für 3 min bei 25 x g zentrifugiert.

Der Überstand über dem Pellet aus Herzmuskelzellen wurde mit 10 mg Trypsin (250 mg/l) und 25 µl der Ca<sup>2+</sup>-Stammlösung versetzt und weitere zweimal zentrifugiert. Danach wurde

## Material und Methoden

die Zellsuspension in einer Dichte von  $10^6$  Zellen pro 10 cm beschichteten Zellkulturschale für Primärzellen ausplattiert und im  $\text{CO}_2$ -Brutschrank für 4 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in den Zellkulturschalen mit modifizierter Tyrode-Lösung ohne  $\text{Ca}^{2+}$  gewaschen und mit 30 ml des  $37^\circ\text{C}$  warmen Kultivierungsmediums überschichtet und im Brutschrank aufbewahrt.

Alle zwei Tage erfolgte ein Mediumwechsel nach vorherigem Spülen mit  $37^\circ\text{C}$  warmem M199, um abgestorbene Zellen und Verunreinigungen zu entfernen. Nach ca. einer Woche waren die Zellen konfluent und konnten für den Einsatz in den Ischämie-/Reperfusionsexperimenten vorbereitet werden.

### **Vorbereitung der Endothelzellen für Ischämie-/Reperfusionsexperimente**

Der konfluent gewachsene Endothelzellmonolayer wurde 3 x mit calciumfreier modifizierter Tyrode-Lösung gespült, um neben nicht angehafteten Zellen auch das  $\text{Ca}^{2+}$  zu entfernen, welches Enzyme inhibieren kann. Dann wurde der Monolayer für eine Minute mit 3 ml  $37^\circ\text{C}$  warmem Trypsin-EDTA (0,05 %) überschichtet und anschließend mit einer 1-ml-Pipette vorsichtig auf und ab pipettiert um die Endothelzellen voneinander zu trennen. Die Suspension wurde mit 5 ml warmem M199-Medium vermischt, um die enzymatische Wirkung des Trypsins auf die Endothelzellen zu stoppen. Die Zellen wurden in 3-cm-Zellkulturschalen mit darin befindlichen sterilen Deckgläschen nach Zellzählung mit der Neubauer-Zählkammer in unterschiedlicher Zelldichte (100 000, 120 000, 150 000 Zellen/Deckgläschen) in Kultivierungsmedium ausgesät und im Brutschrank (5 %  $\text{CO}_2$ ) aufbewahrt. Nach zwei bis drei Tagen waren die Endothelzellen zu ca. 70–80 % konfluent und konnten in Imagingversuchen eingesetzt werden.

### **Reinheit der Zellkultur**

Um die Reinheit der Kultur zu bestätigen, wurden in der Arbeitsgruppe in regelmäßigen Abständen immunhistochemische Färbungen nach dem Protokoll von Peters et al. (2005) durchgeführt. Es handelte sich dabei um fluoreszenzoptische Messungen, einerseits zur Bestimmung der zellulären Aufnahme von acetyliertem *low density lipoprotein* (Dil-Ac-LDL) und andererseits zur Visualisierung des endothelialen F-Actins. Zusätzlich wurde der Von-Willebrand-Faktor (vWF) nach Markierung mit fluoreszierendem Antikörper nachgewiesen, der als Marker für Endothelzellen dient. Bei fluoreszenzoptischen Messungen des  *$\alpha$ -smooth-*

## Material und Methoden

*muscle-Actins* glatter Muskelzellen konnte darüber hinaus sichergestellt werden, dass sich in der Zellkultur nur ein geringer Anteil von glatten Muskelzellen befindet.

Durch die angewandte Methode der Zellpräparation wurden Endothelzellen nach Entfernung größerer Blutgefäße aus verschiedenen Lokalisationen des Herzens herangezogen. Die so gewonnenen Endothelzellen entsprechen deshalb einer repräsentativen Mischung. Da sich jedoch die absolute Mehrzahl der Endothelzellen in den Kapillaren der Herzmuskulatur befindet, stellen die auf diese Weise isolierten Zellen hauptsächlich mikrovaskuläre Endothelzellen dar (Piper et al.1990, Kaul und Yayaweera 1997). Diese Theorie konnte durch die Messung des Von-Willebrand-Faktors bestätigt werden.

### 2.1.6. Konzentrationsangaben verschiedener Substanzen

Inhibitoren und andere Substanzen	Endkonzentration
Antimycin A <i>3-Methylbutansäure 3-((3-(formylamino)- 2-hydroxybenzoyl)amino)-8-hexyl- 2,6-dimethyl-4,9-dioxo- 1,5-dioxonan-7-yl ester</i>	2–5 µg/ml
Apocynin <i>4-Hydroxy-3-methoxyacetophenon</i>	250–500 µmol/l
Atractyloside <i>Atractylat</i>	20 µmol/l
CaCl <sub>2</sub>	3 mmol/l
2-DG <i>2-Deoxy-D-Glucose</i>	10 mmol/l
DPI <i>Diphenyleneiodonium -Chlorid</i>	10 µmol/l
DTPP <i>Decyl TPP Bromid</i>	1 µmol/l
EGTA <i>Ethylenglykol-bis (-aminoethylether-)tetraacetat</i>	5 mmol/l
Oligomycin A	10 µmol/l
PP1 <i>4-Amino-5-(methylphenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo-(3,4-d)pyrimidin</i>	1 µmol/l
PP2 <i>4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidin</i>	1 µmol/l
PP3 <i>4-Amino-7-phenylpyrazol[3,4-d]pyrimidin</i>	1 µmol/l

## Material und Methoden

<b>Rotenon</b> <i>2R-(6a,12a)-1,2-Dihydro-2-isopropenyl-8,9-dimethoxychromano[3,4-b]furo[2,3-h]chroman-6-on</i>	5 µmol/l
<b>SU 6656</b> <i>2,3-Dihydro-N,N-dimethyl-2-oxo-3-[(4,5,6,7-tetrahydro-1H-indol-2-yl)methylen]-1H-indol-5-sulfonamid</i>	10 µmol/l
<b>t-BHP</b> <i>tert-Butylhydroperoxid</i> <i>1,1-Dimethylethylhydroperoxid</i>	Verschiedene Konzentrationen
<b>TTFA</b> <b>Thenoyl Trifluoroacetone</b> <i>4,4,4-Trifluoro-1-(2-thienyl)-1,3-butanedione</i>	20–40 µmol/l

<b>Radikalfänger</b>	<b>Endkonzentration</b>
<b>MPG</b> <i>N-MPG: N-(2-mercaptopropionyl)glycin</i>	100 µM
<b>MitoQ<sup>®</sup></b> <b>Mitoquinon</b>	1 µmol/l
<b>NAC</b> <i>N-Acetyl-L-Cystein</i>	25 µmol/l
<b>Trolox</b> <i>6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylsäure</i>	250–500 µmol/l

<b>Farbstoffe</b>	<b>Endkonzentration</b>
<b>Fura-2 AM</b> <i>Fura-2-acetoxymethylester; 1-(2-(5-Carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxo)-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)-ethan- N, N, N', N'-tetraacetat</i>	2–4 µM
<b>H<sub>2</sub>DCFDA</b> <i>2',7'-Dichlorodihydrofluoreszein diacetat</i>	2 µM
<b>JC-1</b> <i>5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanin iodid</i>	1 µM
<b>Mag-Fura-2 AM</b> <i>Mag-Fura-2-acetoxymethylester; 2-[5-[2-[(acetyloxy)methoxy]-2-oxoethoxy]-6-[bis[2-[(acetyloxy)methoxy]-2-oxoethyl]amino]-2-benzofuranyl]- (acetyloxy)methylester</i>	2 µM

## Material und Methoden

<b>Antikörper</b>	<b>Endkonzentration</b>
Anti-Kaninchen-IgG HRP-gekoppelt	1:2000
sc-81 PLC $\gamma$ 1 Antikörper	1:1000
Tyr783 Phospho-PLC $\gamma$ 1	1:500

Alle Substanzen wurden entsprechend den Herstellerangaben gelagert und für den experimentellen Einsatz weiterverarbeitet. 2-Deoxyglucose und NAC wurden in Aqua dest. gelöst. Die Antikörper wurden in TBST-Puffer verdünnt. Bei allen anderen Chemikalien wurde DMSO als Lösungsmittel eingesetzt.

### **2.2 METHODEN**

#### **2.2.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an koronarendothelialen Monolayern**

##### **Simulierung von Ischämie und Reperfusion**

In einem Versuchsablauf sollten im luftdichten System für koronarendotheliale Monolayer Bedingungen geschaffen werden, die partiell einem Herzinfarkt und der dabei auftretenden Ischämie entsprechen. Um ähnliche Verhältnisse zu gewährleisten, wurde während der Phase der Ischämie Anoxiemedium (modifizierte Tyrode-Lösung s. 2.1.2) eingeleitet, das sowohl fast keinen Sauerstoff als auch keine Glukose enthielt und zusätzlich einen sauren pH-Wert von 6,4 aufwies.

Zur partiellen Simulation einer Reperfusion wurde in dieser Arbeit im Anschluss an die Ischämiephase Reperfusionsmedium (modifizierte Tyrode-Lösung s. 2.1.2) zu den Endothelzellen geleitet, das einen normalen Sauerstoffgehalt (Raumluft) aufwies und zusätzlich mit 2,5 mmol/l Glukose angereichert war. Der pH-Wert dieses Mediums entsprach dem physiologischen Wert von 7,4.

##### **2.2.1.1 Versuchsaufbau**

Um verschiedene fluoreszenzoptische Messungen während simulierter Ischämie und Reperfusion durchzuführen, wurden die koronaren mikrovaskulären Endothelzellen der Ratte, die auf einem 25-mm-Deckgläschen zu ca. 70 % konfluent gewachsen waren, mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen beladen und dann in eine speziell angefertigte gasdichte Edelstahlkammer verbracht (Foto 1, S. 25). Durch zwei Gummidichtungen und feste Verschraubung wurde sichergestellt, dass nachträglich keine Luft in das System gelangen konnte (Abb. 2.1). Die Kammer wurde auf beiden Seiten durch gasdichte Edelstahlkapillaren mit den Behältnissen für die Anoxie- und Normoxiemedien und mit einer Rollerpumpe verbunden. Das Anoxiemedium wurde mit 100 % Stickstoff begast, während das Normoxiemedium mit normaler Raumluft in Kontakt stand. Zwischen den beiden unterschiedlichen Medien konnte durch einen Dreiwegehahn kontinuierlich ohne Unterbrechung des Flüssigkeitsflusses umgeschaltet werden. Die Medien wurden durch die Rollerpumpe mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min durch die Kammer geleitet und dabei

## Material und Methoden

durch eine in den Objektisch integrierte Heizung temperiert (Abb. 2.2). Das Sichtfeld des inversen Mikroskops wurde bei jedem Versuch so justiert, dass sowohl intakte Endothelzellen als auch ein kleiner zellfreier Bereich als Hintergrund für die folgenden Berechnungen erkennbar waren.

In diesem System wurden Messungen zur Bestimmung der Calciumhomöostase, der Radikalentstehung, des zellulären ATP-Gehaltes, des mitochondrialen Membranpotentials und der interzellulären Lückenbildung durchgeführt.

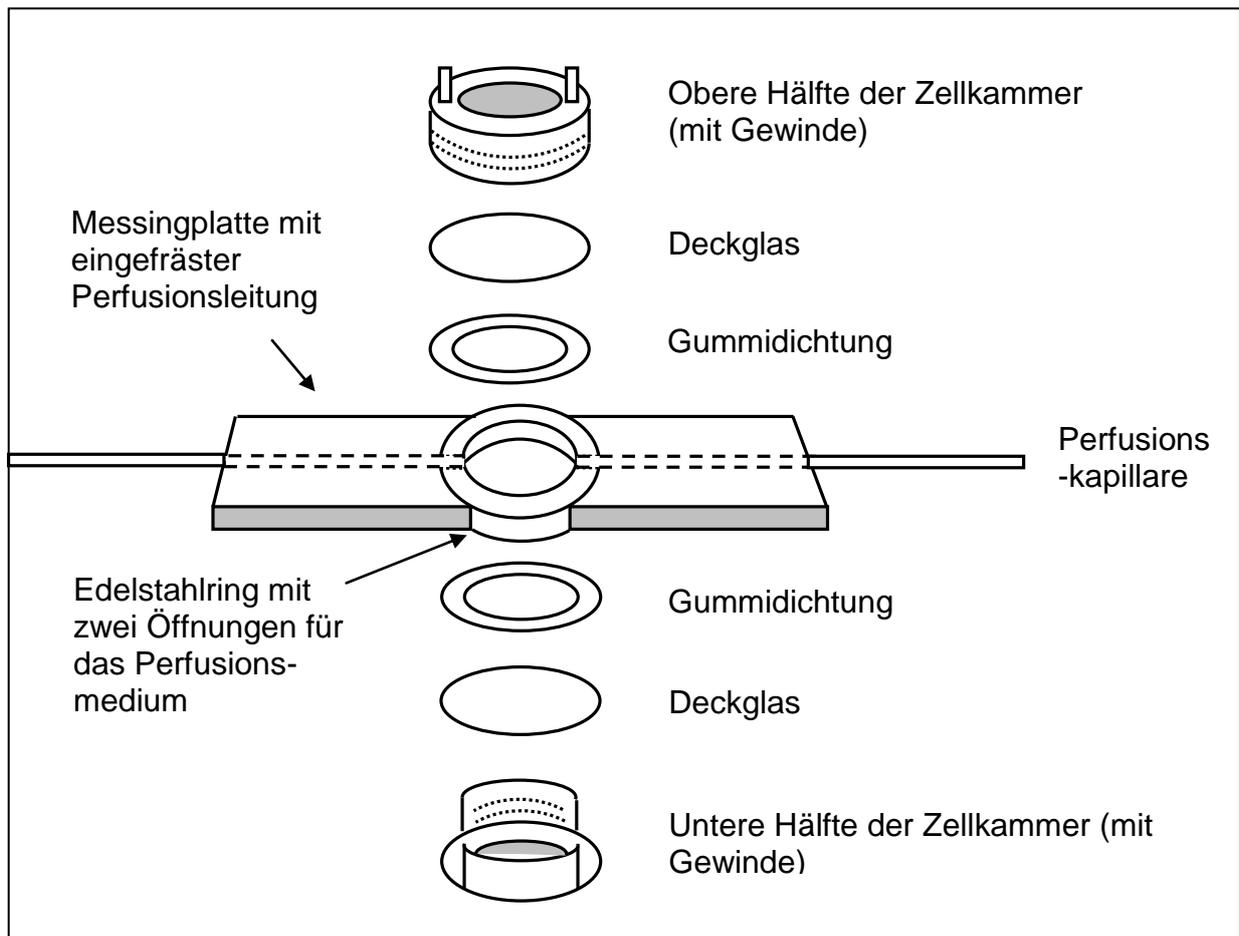


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Zellkammeraufbaues

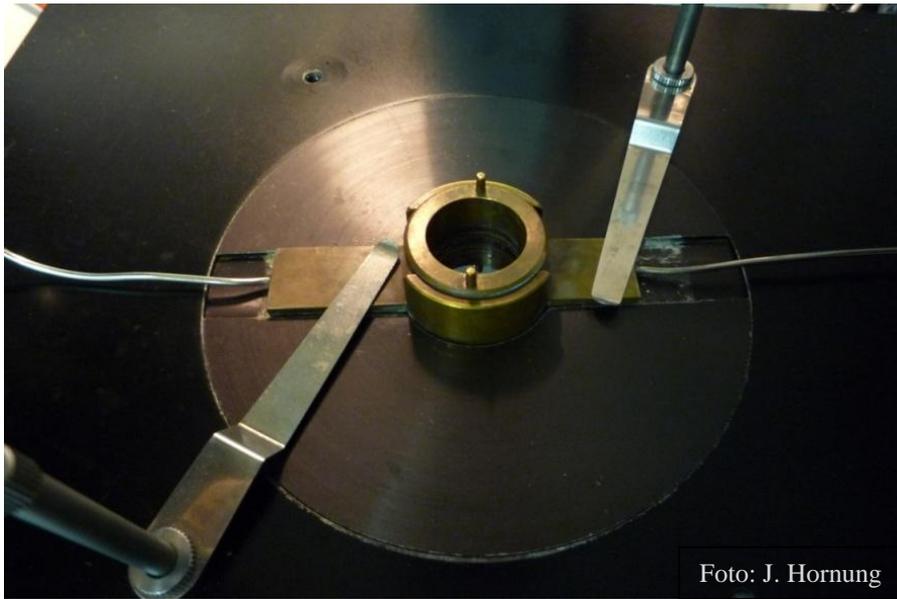


Foto: J. Hornung

Foto 1: Zellkammer auf dem beheizten Objektisch

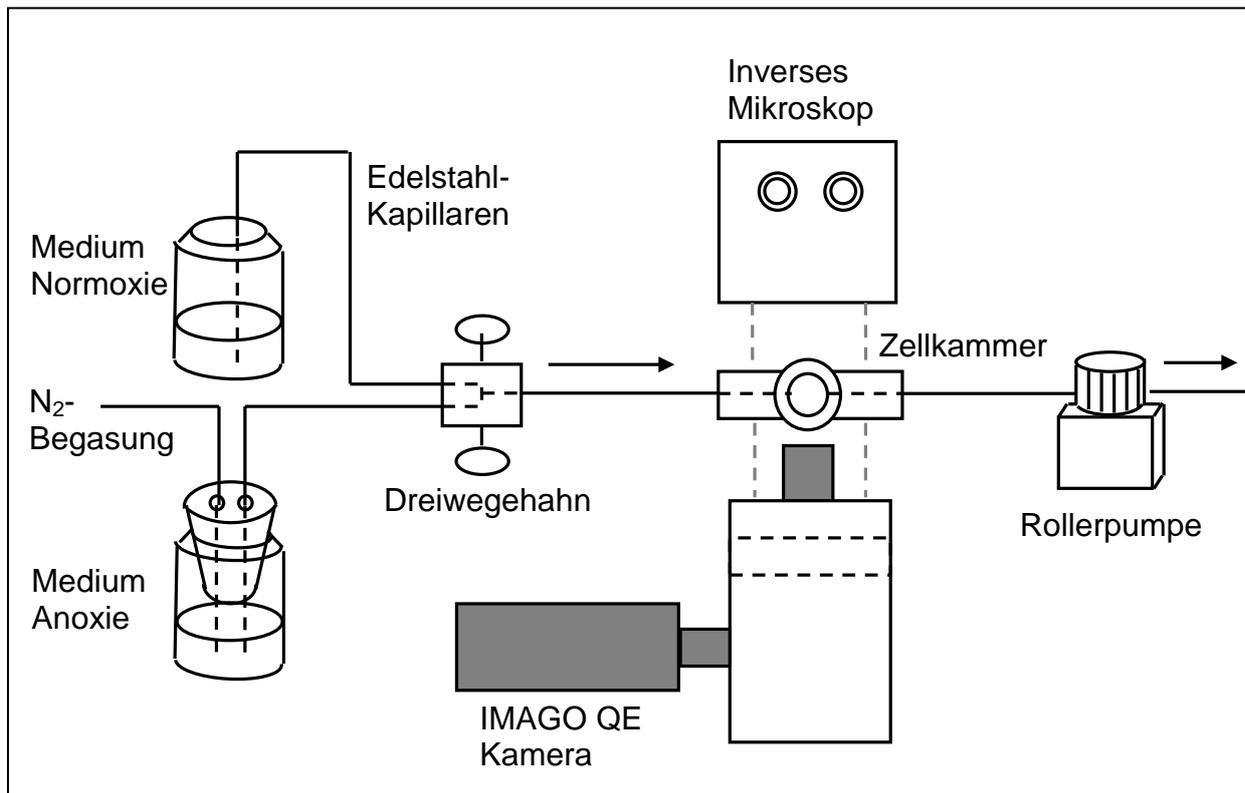


Abb. 2.2: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaues

### 2.2.1.2 Versuchsablauf

Der Versuchsablauf wird in Abb. 2.3. schematisch dargestellt. Die Fluoreszenzmessung begann nach dem Einbau der Zellen mit einer 10-minütigen Equilibrierungsphase mit HEPES-gepufferter Tyrode-Lösung (Normoxiemedium s. 2.1.2) unter normoxen, glukosefreien Bedingungen und einem pH-Wert von 7,4. Anschließend wurde für den Zeitraum von 40 min eine stickstoffbegaste, anoxische HEPES-gepufferte Tyrodelösung (Anoxiemedium s. 2.1.2) ohne Glukose und mit einem pH-Wert von 6,4 durch die Kammer geleitet. Danach folgte eine 40-minütige Reoxygenationsphase, in der das Normoxiemedium der ersten 10 min zusätzlich mit 2,5 mM Glukose versehen wurde. In diesem Versuchsteil wurden dem ReperfusionsmEDIUM verschiedene Substanzen zugesetzt, deren Wirkungen auf die Endothelzellen in der Reperusionsphase getestet werden sollten.

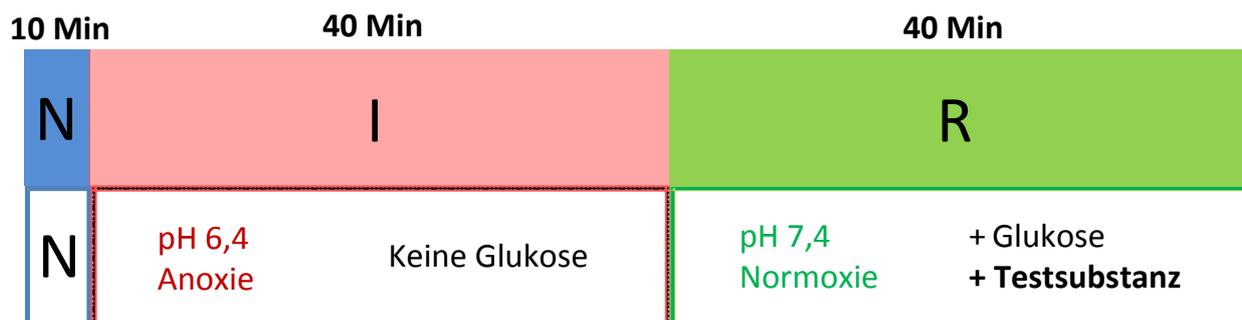


Abb. 2.3: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes. N: Normoxie (pH-Wert 7,4, ohne Glukose), I: Ischämie, R: Reperfusion

### 2.2.2 Fluoreszenzmikroskopische Messungen

#### 2.2.2.1 Bestimmung des intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes

Die ca. 70 % konfluent gewachsenen Endothelzellen wurden für 60 min bei 30°C mit 2–4  $\mu\text{M}$  Fura-2 AM in HEPES-gepufferter Tyrode-Lösung mit 2 % FBS/NCS (Beladungsmedium s. 2.1.2) beladen. In dieser Zeit gelangt der Farbstoff als Acetoxymethylester in die Zelle. Das von zellulären Esterasen gespaltene Fura-2 kann durch die so entstandene Ladungsänderung die Zellmembran nicht mehr passieren und verbleibt dadurch innerhalb der Zelle.

## Material und Methoden

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen wurden mit einem inversen Olympus Mikroskop durchgeführt und mit Hilfe eines TILLvisION-Systems ausgewertet. Abb. 2.4 zeigt Bilder der durchgeführten  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen mit dem Farbstoff Fura-2 AM an koronaren mikrovaskulären Endothelzellen.

Das von einer UV-Lampe entsendete Anregungslicht wurde mit einem Polychromator VI dem Anregungsspektrum des Fluoreszenzfarbstoffes entsprechend eingestellt. Bei Fura-2 betragen die anregenden Wellenlängen 340, 357 und 380 nm. Das Anregungslicht wurde alle 12 sec mit Hilfe eines Glasfaserkabels auf einen dichroiden Spiegel geleitet, der den Lichtstrahl auf die Messkammer lenkte. Das Emissionsmaximum lag bei ca. 510 nm. Das Licht, das nach Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes emittiert wurde, gelangte über den dichroiden Spiegel zu einer Kamera, die mit einem Computer verbunden war. Im Computer wurden die durchgeführten Messungen gespeichert. Für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bestimmung wurde der Quotient aus der gemessenen Fluoreszenz nach Anregung mit 340 nm und 380 nm gebildet. Mit dem Quotienten der gemessenen Emissionsintensitäten konnte im Anschluss die Berechnung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erfolgen.

Die Quotienten wurden in den Diagrammen als relative Einheiten (r.E.) dargestellt und zu einem festgelegten präanoxischen Zeitpunkt bei Versuchsbeginn auf einen Wert von 1,2 normiert.

Bei Messungen des Fluoreszenzspektrums mit hoher und niedriger  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurde zusätzlich eine Wellenlänge ermittelt, bei der keine Veränderung des Signals auftrat. In diesem System erwies sich die Anregung bei einer Wellenlänge von 357 nm  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig und wurde zur anschließenden planimetrischen Berechnung der interzellulären Lückenbildung herangezogen.

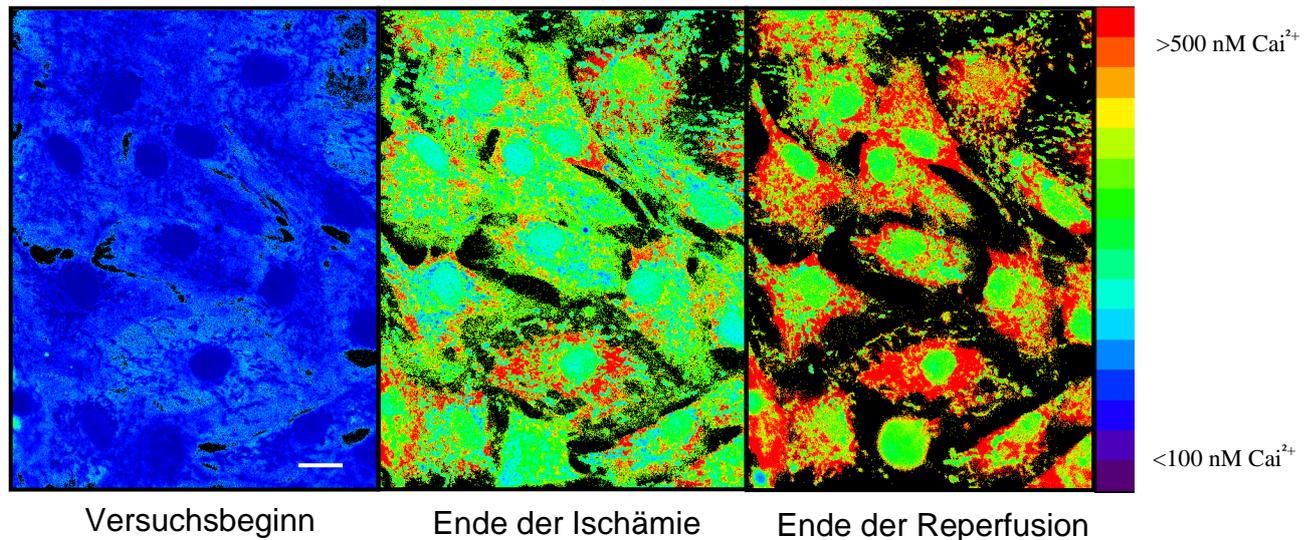


Abb. 2.4: Darstellung der fehlfarbenkodierte Bilder zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Messung mit dem Farbstoff Fura-2 AM nach 10-minütiger Normoxie, am Ende der 40-minütigen Ischämie und nach 40-minütiger Reperfusion. Weißer Balken = 10  $\mu\text{m}$  bei 40-facher Vergrößerung

### Berechnung der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration

Formel nach Grynkiewicz et al. 1985

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times \beta \times (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$$

**Kd:** Affinität von Fura-2 zu freien zytosolischen Calciumionen.

- Kd variiert bei unterschiedlichen experimentellen Bedingungen und ist pH-Wert abhängig.
- In-vitro-Kd-Wert nach Grynkiewicz et al. 1985 für Fura-2: 224 nmol/l.
- Der Kd-Wert wurde in intakten Zellen wie von Schäfer 2003 beschrieben festgelegt.
- (In-vivo-Kd-Wert berechnet von Ladilov et al. 2000 für Fura-2:

bei einem pH-Wert von 7,2:  $309 \pm 8$  nmol/l

bei einem pH-Wert von 6,5:  $357 \pm 7$  nmol/l).

**$\beta$ :** Quotient aus der Emissionsintensität des  $R_{\min}$ -Wertes und aus der Emissionsintensität des  $R_{\max}$ -Wertes, jeweils bei einer Wellenlänge von 380 nm.

## Material und Methoden

Die Kalibrierung wurde nach dem Protokoll von Li et al. 1987 modifiziert. Die Endothelzellen wurden dabei mit Kalibrierungslösung (s. 2.1.2), deren pH-Wert auf 6,4 bzw. 7,4 titriert war, perfundiert.

**R<sub>max</sub>**: Maximaler Quotient

Bestimmung: Zusatz von CaCl<sub>2</sub> (3 mM) zum Perfusionsmedium.

**R<sub>min</sub>**: Minimaler Quotient

Bestimmung: Zusatz von EGTA (5 mM) zum Perfusionsmedium.

### 2.2.2.2 Bestimmung der Radikalentstehung

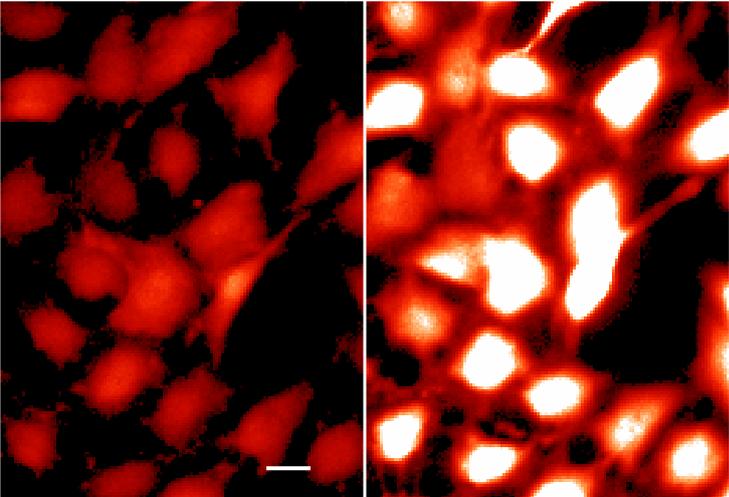
Die Generierung von Radikalen wurde durch fluoreszenzoptische Messungen mit dem Farbstoff H<sub>2</sub>DCFDA bestimmt, der sensitiv auf H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reagiert.

Die reduzierte Membran-permeable Form H<sub>2</sub>DCFDA ist nicht fluoreszierend und diffundiert in die Endothelzellen. In den Zellen spalten Esterasen die Acetat-Gruppe ab und der Farbstoff H<sub>2</sub>DCF kann dadurch nicht mehr aus der Zelle gelangen. Radikale oxidieren H<sub>2</sub>DCF zu dem fluoreszierenden und dadurch messbaren Produkt DCF.

Die Endothelzellen wurden für 30 min bei 30°C in HEPES-gepufferter Tyrode-Lösung mit 2 % FBS/NCS (Beladungsmedium s. 2.1.2) mit 2 µM H<sub>2</sub>DCFDA beladen und im Anschluss in das Ischämie-/Reperfusionssystem verbracht, in dem die fluoreszenzoptischen Messungen der Radikalentstehung durchgeführt wurden. In Abb. 2.5 sind Bilder der Fluoreszenzmikroskopischen Messungen mit dem Farbstoff H<sub>2</sub>DCFDA an koronaren mikrovaskulären Endothelzellen dargestellt. Der Farbstoff H<sub>2</sub>DCFDA wurde in den Versuchen mit der Wellenlänge 475 nm angeregt. Das Emissionsmaximum lag bei 530 nm.

Die DCF-Messwerte wurden in den Diagrammen in Quotienten aus F (Fluoreszenzintensität) und F<sub>0</sub> (Hintergrundfluoreszenz), d. h. einer relativen Zunahme der DCF-Fluoreszenz in Prozent im Vergleich zum Hintergrund, dargestellt.

Um Messungen von DCF-Fluoreszenzsignalen durch Autooxidation des Farbstoffes bei Lichteinfall zu vermeiden, wurde das Belichtungsprogramm vor Versuchsbeginn optimiert. Dafür wurden gefärbte Zellen unter normoxen Bedingungen 80 min lang demselben Belichtungsprogramm ausgesetzt, wie es auch bei den Ischämie-Reperfusionsversuchen der Fall ist. Bei diesen Messungen konnte kein spontaner Anstieg des Signals festgestellt werden (Abb. 2.6).



Versuchsbeginn      Ende der Reperfusion

Abb. 2.5: Fluoreszenzoptische Bilder zur DCF-Messung nach 10 min Normoxie und nach 40 min Reperfusion. Weißer Balken = 10 µm bei 40-facher Vergrößerung

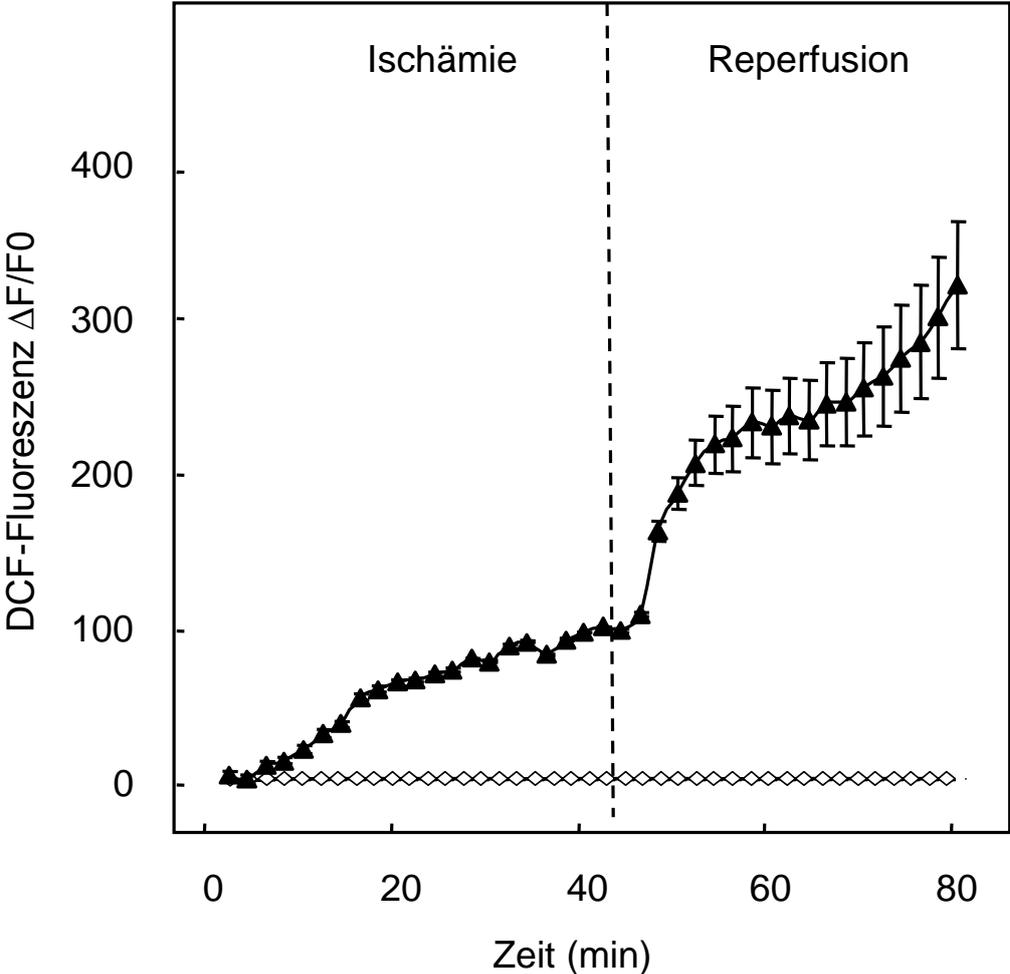


Abb.2.6: DCF-Fluoreszenz nach Hintergrundkorrektur (Zunahme in %, bezogen auf die Ausgangsfluoreszenz) im Verlauf der 40-minütigen Ischämie und Reperfusion —▲—, im Vergleich zu Messungen der gefärbten Zellen mit gleichem Belichtungsprogramm bei 80-minütiger Normoxie —◇—. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM eines einzelnen Experiments (n = 16 Endothelzellen).

### 2.2.2.3 Messung des mitochondrialen Membranpotentials

Die Endothelzellen wurden für 10 min bei 30°C mit 1  $\mu$ M JC-1 in HEPES-gepufferter Tyrode-Lösung (2.1.2) ohne FBS/NCS beladen.

Das mitochondriale Membranpotential wurde durch fluoreszenzoptische Messungen mit dem kationischen, lipophilen Farbstoff JC-1 durchgeführt. JC-1 ist ein 2-Emissionen-Farbstoff, der von den Mitochondrien aufgenommen wird und innerhalb der Mitochondrienmatrix akkumuliert. JC-1 liegt bei steigender Konzentration und stark negativem Membranpotential als Polymer (J-Aggregat) vor, das bei einem Exzitationsspektrum von 490 nm mit einem Emissionsmaximum von ca. 590 nm rot fluoresziert. Die J-Aggregate des JC-1 sind relativ instabil. Durch Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials zerfallen sie in Monomere, die bei einem Anregungsspektrum von 490 nm mit einem Emissionsmaximum von ca. 527 nm grün fluoreszieren. Die Monomere diffundieren aus den Mitochondrien in das Zytosol. Dies führt zur Abnahme der roten Fluoreszenz. Der Quotient zwischen den rot-fluoreszierenden J-Aggregaten und den grün-fluoreszierenden JC-1 Monomeren führt unabhängig von der Mitochondrienform oder -größe auf deren Membranpotential zurück.

Die gemessenen Quotienten aus J-Aggregaten und JC1-Monomeren (590 nm/527 nm) wurden in den Diagrammen als relative Einheiten (r.E.) dargestellt.

### 2.2.2.4 Bestimmung des intrazellulären ATP-Spiegels

Die koronaren mikrovaskulären Endothelzellen wurden für 30 min bei 30°C mit 2 µM Mag-Fura-2 in HEPES-gepufferter Tyrodelösung mit 2 % FBS/NCS (Beladungsmedium s. 2.1.2) gefärbt.

Der intrazelluläre ATP-Gehalt wurde fluoreszenzoptisch indirekt durch den Farbstoff Mag-Fura-2 AM gemessen. Wie bei Fura-2 passiert der Farbstoff die Zellmembran. In der Zelle werden die lipophilen Gruppen von unspezifischen Esterasen abgespalten, so dass Mag-Fura die Zelle nur noch sehr langsam verlassen kann. Mag-Fura bindet an freies  $Mg^{2+}$  innerhalb der Zelle.  $Mg^{2+}$ , welches in Bindung mit ATP vorliegt, wird in diesem Fall nicht gemessen. Bei ATP-Abbau steigt der Spiegel des ungebundenen  $Mg^{2+}$  und dadurch auch das fluoreszenzoptische Signal an. Die Messungen wurden auf gleiche Weise wie die  $Ca^{2+}$ -Bestimmungen durchgeführt. Die anregenden Wellenlängen betragen dabei ebenfalls 340 und 380 nm. Auch die Ergebnisse der Mag-Fura-2-Messungen wurden als Quotient aus den Emissionen der Exzitationswellenlängen 340 und 380 nm in relativen Einheiten (r.E.) dargestellt. In den Diagrammen wurde eine endanoxische Normierung des Quotienten auf 1,10 durchgeführt.

### 2.2.2.5 Bestimmung der interzellulären Lücken

Um die Ausdehnung der interzellulären Lücken zu bestimmen, wurde bei einer Fluoreszenzwellenlänge gemessen, deren Signal von der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration unabhängig ist. Die Wellenlänge, bei der das Signal trotz höherer oder niedrigerer  $Ca^{2+}$ -Konzentration stabil blieb, betrug bei den Messungen 357 nm. Die aufgezeichneten Bilder wurden durch Binarisierung in Areale ohne Zellen (ohne Fluoreszenzsignal = 0) und Bereiche mit Zellen (mit Fluoreszenzsignal = 1) eingeteilt. In einem Programm wurde nun die Summe aller 0-Pixel im kompletten Verlauf der gespeicherten Bilder addiert. Mit den gewonnenen Daten kann nun die prozentuale Zunahme der zellfreien Areale (= 0) im Verhältnis zur Zellfläche berechnet werden. Zur weiteren Auswertung wurde die Anzahl der 0-Pixel während der 10-minütigen Normoxie (pH 7,4) auf 0 % und die endanoxische Anzahl auf 100 % gesetzt. Die Änderung der interzellulären Lückenbildung im Verlauf der Reperfusion bezog sich prozentual auf die Änderung während der Anoxie.

### **2.2.3 Western Blot**

#### **2.2.3.1 Zellkultur und Stimulation**

Endothelzellen wurden wie auch für die optischen Messungen beschrieben, trypsinisiert und in 10-cm-Schalen auf Deckgläschen mit einem Durchmesser von 42 mm ausplattiert und nach 2–3 Tagen bei ca. 70 % Konfluenz für die Versuche eingesetzt. Kammeraufbau und Protokoll für die Ischämie-/Reperusionsversuche entsprachen dem der optischen Messung. Für die Stimulation unter normoxen Bedingungen mit t-BHP ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) wurde das Kulturmedium durch HEPES-gepufferte Tyrode-Lösung (Normoxiemedium s. 2.1.2) ersetzt und die Endothelzellen wurden für 45 min im Wärmeschrank inkubiert, bevor für 20 min mit aufsteigenden Konzentrationen t-BHP (10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 200  $\mu\text{M}$ ) stimuliert wurde. Bei den Reperfusionsexperimenten wurden die Zellen wie bei den Fluoreszenzmessungen behandelt und entsprechende Inhibitoren wurden mit Beginn der Reperfusion gegeben.

#### **2.2.3.2 Lyse der Endothelzellen**

Endothelzellen wurden nach entsprechender Inkubationszeit mit kalter PBS-Lösung einmalig gewaschen und anschließend auf Eis mit 150  $\mu\text{l}$  Lysispuffer und 10  $\mu\text{l}$  Benzonase® (Endkonzentration 50 IE/ml) zwecks Verdau der Nukleinsäuren versetzt. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Boden abgelöst und zusätzlich im Douncer bei 4°C mechanisch aufgeschlossen. Das Lysat wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 1000 x g für 2 min bei 4°C zentrifugiert, um Zellkerne und nicht aufgeschlossene Zellen zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Lysat konnte bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C eingefroren werden.

#### **2.2.3.3 Proteinbestimmung**

Die Proteinkonzentration wurde nach Lowry (Lowry et al. 1951) bestimmt. Zur Quantifizierung des Proteingehalts diente als Standard BSA, gelöst in destilliertem Wasser in folgenden Konzentrationen: 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 und 1,2 mg/ml (s. Anhang).

### 2.2.3.4 Immunpräzipitation

#### Vorbereitung der Dynabeads®

Dynabeads® Protein A wurden in der gewünschten Menge in ein Reaktionsgefäß überführt und mehrmals für 2–3 min in den Magneten (DynaMag™-2) gestellt und mit 0,5 ml eiskaltem 0,1-M-Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) gewaschen. Alle Waschschrte wurden auf Eis durchgeführt. Nach erneutem Entfernen des Überstandes wurden dann auf 6 µl Beads 4–5 µg PLCγ1 Antikörper (sc-81, s. Anhang) in eiskaltem 0,1-M-Natriumphosphatpuffer in einem Volumen von ca. 150 µl hinzugegeben. Dynabeads® und Antikörperlösung wurden bei 4°C für 60–90 min unter langsamer Rotation inkubiert. Dann wurde zum Blockieren noch freier Bindungsstellen gleiches Volumen der Blocklösung hinzugeben (6 % Magermilchpulver in 0,1-M-Natriumphosphatpuffer mit 0,1 % Tween-20) und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß wieder für 2–3 min in den Magneten gestellt und der Überstand entfernt. Die mit Antikörpern beladenen Beads wurden 3–5 x mit 1 ml 0,1-M-Natriumphosphatpuffer mit 0,1 % Tween-20 gewaschen. Dann wurde ca 100 µl PBS (pH 7,4) hinzugegeben und die Beads konnten dann sofort weiter verwendet oder bei 4°C zwischengelagert werden.

#### Immunpräzipitation

Zur Vorreinigung wurde das Lysat mit ungebundenen Dynabeads® (20 µl beads auf 200 µl Lysat) versetzt und 30–60 min rotierend bei 4°C inkubiert. Der Überstand wurde in der Immunpräzipitation eingesetzt.

Zur Immunpräzipitation wurden entsprechend vorbereitete und mit Antikörpern beladene Beads jeweils mit 200 µg Lysat für 90 min bei 4°C unter leichter Rotation inkubiert. Das Gesamtvolumen wurde jeweils auf 500 µl mit 0,1-M-Natriumphosphatpuffer eingestellt, dem Sigma Phosphatase Cocktail 2 und 1 µg/ml Pepstatin zugesetzt waren. Zur Trennung der ungebundenen von den gebundenen Proteinen wurde der Ansatz wieder für 2–3 min in Magneten gestellt und der Überstand entfernt. Zur Kontrolle der erfolgreichen und vollständigen Immunpräzipitation wurde der Überstand bei 4°C aufbewahrt, um direkt aufs Gel aufgetragen bzw. bis zur weiteren Verarbeitung bei -70°C gelagert zu werden.

Dann wurde der Dynabeads®-Lysat-Komplex auf Eis 3–5 x gewaschen mit je 1 ml eiskaltem 0,1-M-Natriumphosphatpuffer mit 0,1 % Tween 20 und abschließend mit 1 ml eiskaltem PBS versetzt.

## Material und Methoden

Das Endprodukt (Dynabeads<sup>®</sup>-Antikörper-Protein-Komplex) wurde in 80 µl NuPAGE<sup>®</sup> LDS Sample Buffer entsprechend den Herstellerangaben aufgenommen und bei 70°C für 10 min denaturiert (gleichzeitig Trennung der Dynabeads<sup>®</sup> vom Antigen-Antikörperkomplex), um dann die Auftrennung der Proteine mit NuPAGE<sup>®</sup> Novex Bis-Tris Gelen im Xcell SureLock<sup>™</sup> Mini-Cell System durchzuführen.

### 2.2.3.5 Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit kommerziell erhältlichen Gradientengelen (NuPAGE<sup>®</sup> Bis-Tris 4-12 %, 1.5 mm, 10 Well) und XCell SureLock<sup>™</sup> Mini-Cell nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll. Alle Lösungen und Puffer wurden nach dem vom Hersteller angegebenen Protokollen angesetzt. 20–25 µl der entsprechenden Probe wurden zusammen mit je 2 Proteinstandards pro Gel (SeeBlue<sup>®</sup> Plus2 Pre-Stained Standard, MagicMark<sup>™</sup> XP Western Protein Standard) aufgetragen und bei 200 V für 60–90 min aufgetrennt. Zum Proteinnachweis erfolgte nach der Gelelektrophorese das Blotting des Gels zum Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran (Invitrolon<sup>™</sup> PVDF). Dies erfolgte ebenfalls mit einem kommerziell erhältlichen System (XCell II<sup>™</sup> Blot Module) mit zugehörigem Netzteil (PowerEase<sup>®</sup> 500 Power Supply) nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll. Der Proteintransfer erfolgte bei 30 V für 70 min bei Raumtemperatur.

### 2.2.3.6 Western-Blot-Analyse

#### Reversible Proteinfärbung mit Ponceau S

Zur Kontrolle des vollständigen Proteintransfers auf die Membran wurde eine reversible Färbung mit Ponceau S (Kohn und Riches 1978) durchgeführt. Bei diesem Verfahren wurden die Membranen in einer 0,2 %igen Ponceau-S-Lösung 5 sec lang gefärbt, was zu einer unspezifischen Rotfärbung der transferierten Proteine führte. Anschließend wurde der Membranhintergrund durch Schwenken in Aqua bidest. entfärbt, um die Proteinbanden für die Dokumentation gut sichtbar zu machen. Die Einfärbung der Proteine konnte anschließend durch Waschen in TBST-Puffer wieder vollständig rückgängig gemacht werden.

#### Immunologischer Nachweis von phosphorylierter und nicht phosphorylierter PLC $\gamma$ 1

Die entsprechenden Proteine konnten nach erfolgreichem Proteintransfer durch den Einsatz spezifischer Antikörper nachgewiesen werden.

## Material und Methoden

Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen wurden die Membranen zunächst 60 min bei Raumtemperatur in 5 %iger Milchpulverlösung in TBST-Puffer inkubiert. Nach 3 x Waschen in TBST-Puffer wurden die Membranen über Nacht bei 4°C mit phosphoPLC $\gamma$ 1 (PLC $\gamma$ 1 in phosphorylierter Form, Tyr783, 1:500-Verdünnung sc-81) bzw. PLC $\gamma$ 1 Antikörper (gesamtPLC $\gamma$ 1, sc-81, 1:1000-Verdünnung) in 5 % BSA in TBST-Puffer bei leichter Rotation inkubiert. Dann wurden die Membranen 4 x für 5 Min in TBST-Puffer gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen.

Um die Antigen-Antikörperbindung zu detektieren, wurden die Membranen anschließend mit den *Horse raddish peroxidase* (HRP) gekoppelten Zweitantikörpern (Anti-Kanichen-IgG (HRP-gekoppelt) 1:2000) in 5 % Milchpulver in TBST-Puffer für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Membranen 4 x für 5 min in TBST-Puffer gewaschen.

Zur Visualisierung der phosphoPLC $\gamma$ 1 bzw. gesamtPLC $\gamma$ 1 wurden die Membranen kurz in ECL-Reagenz (SuperSignal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate) geschwenkt, wodurch die chemilumineszierende Peroxidasereaktion in Gang gesetzt wurde. Die dadurch entstehende Chemilumineszenz wurde mittels Digitalkamera aufgenommen und anschließend mit Hilfe des Softwareprogramms QuantityOne<sup>®</sup> quantifiziert.

Zur Bestimmung des gesamtPLC $\gamma$ 1 Gehaltes wurden der primäre und der sekundäre Antikörper mittels „Stripping“ entfernt. Der Erfolg des Stripping zeigte sich durch Inkubation mit dem sekundären Antikörper, wobei keine Chemilumineszenz mehr detektiert werden konnte. Zur Antikörperentfernung wurde die Membran zweimal 5 min im Strippuffer und dann zweimal für 10 min in PBS und anschließend für 5 min in TBST-Puffer gewaschen. Die Rehydratation der PVDF-Membran (Invitrolon<sup>™</sup> PVDF) erfolgte für ca. 30 sec in Methanol, gefolgt von 5 min Inkubation in TBST. Dann konnte, wie oben beschrieben, wieder das Blocken der Membran und die weitere Antikörperinkubation erfolgen.

### **2.2.4 Statistische Auswertung**

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte  $\pm$  SEM aus mehreren Experimenten ( $n \geq 3$ ) von mindestens drei verschiedenen Zellpräparationen dargestellt. Dabei wurde bei jedem einzelnen Experiment der Mittelwert aller auswertbaren Zellen für die weiteren Berechnungen herangezogen. Die Daten wurden durch eine ANOVA (One-Way Analysis of Variance) mit nachfolgendem Tukey- oder Bonferroni-Test analysiert. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen. Alle Datenanalysen wurden mit dem Statistikprogramm Sigmastat erstellt.

Um Kinetiken für fluoreszenzoptische Messungen verschiedener Farbstoffe über den gesamten Versuchszeitraum von 80 min besser darstellen zu können, wurden einzelne Versuche ausgewählt, die einen typischen Verlauf aufwiesen. Die Diagramme der Kinetiken entstehen deshalb jeweils aus den Mittelwerten aller ausgewerteten Zellen einzelner Versuche.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Zytoplasmatisches $\text{Ca}^{2+}$ während simulierter Ischämie und Reperfusion

Die in dieser Arbeit verwendeten koronaren mikrovaskulären Endothelzellen zeigten unter Ischämie- und Reperusionsbedingungen einen charakteristischen Verlauf der Fura-2-Fluoreszenz und damit im zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ , wie er auch in vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe beschrieben wurde. In den ersten 10–15 min der Ischämiephase kam es zu einem schnellen Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels. Im Anschluss an diesen initialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg stieg das zytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$  im weiteren Verlauf der simulierten Ischämie langsam kontinuierlich an. Dabei lag der endischämische Wert nach 40 min signifikant über dem Wert zu Beginn der Ischämie (Fura-2 Quotient: Beginn Ischämie  $1,01 \pm 0,02$  vs. Ende Ischämie  $1,27 \pm 0,01$ ;  $n = 12$  Zellen,  $p < 0,05$ ). Mit dem Einsetzen der Reperfusion, in der die Zellen wieder Sauerstoff und Glukose erhielten, verstärkte sich der intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg erneut und lag nach 40 min signifikant über dem endischämischen Wert (Fura-2 Quotient: 40 Min Ischämie  $1,27 \pm 0,01$  vs. 40 min Ischämie + Reperfusion  $1,47 \pm 0,03$ ;  $n = 12$  Zellen,  $p < 0,05$ ). Eine typische  $\text{Ca}^{2+}$ -Kinetik ist in Abbildung 1 dargestellt.

In den folgenden Untersuchungen sollte die Ursache für diesen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg in der Reperfusion gefunden werden. Ziel war es, die Rolle von Radikalen bei der Entstehung dieses zusätzlichen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstiegs in der Reperfusion zu charakterisieren und eine mögliche Beteiligung der Radikale bei der Aktivierung der Phospholipase C (PLC) zu analysieren.

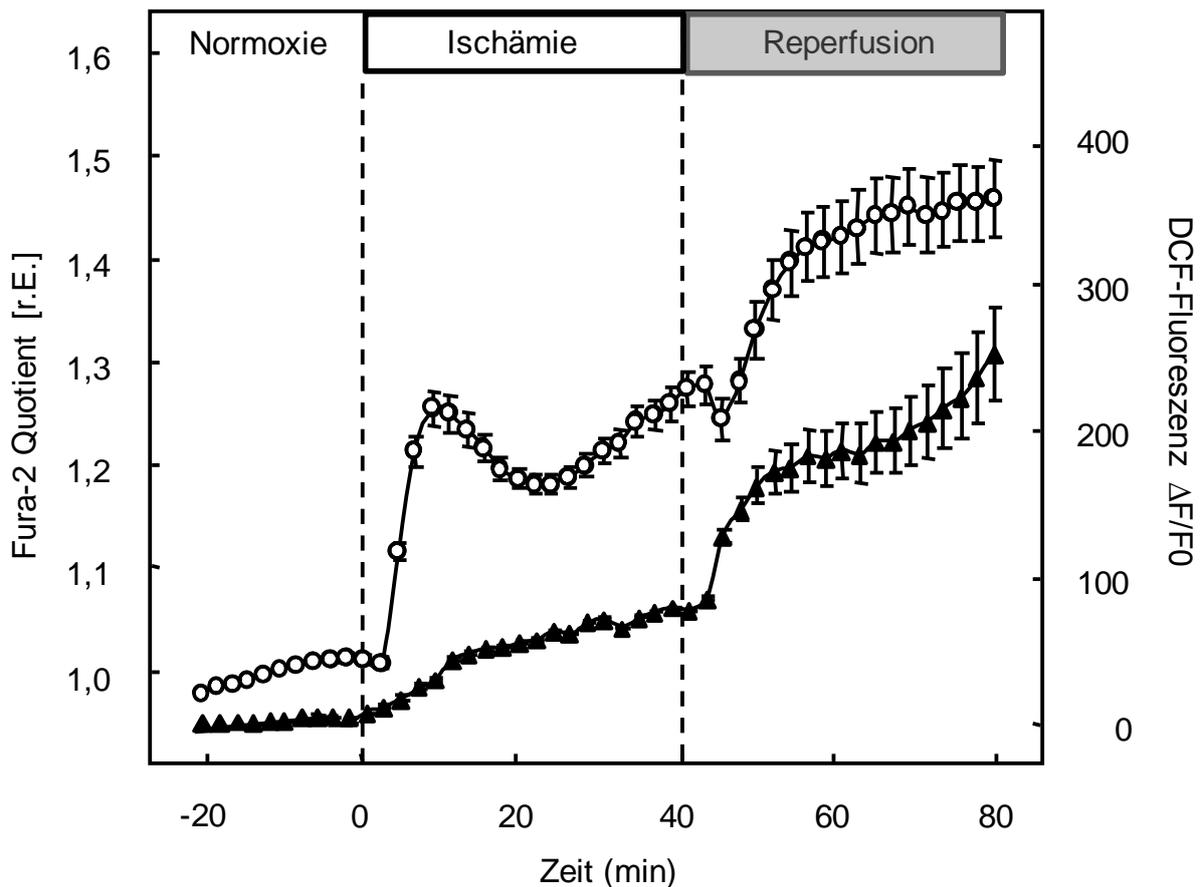


Abb. 1: Repräsentative Kinetik des Fura-2 Quotienten, dargestellt als relative Einheiten [r.E.] —○—, und der DCF-Fluoreszenz nach Hintergrundkorrektur ( $\Delta F/F_0$ ) —▲— (Zunahme in %, bezogen auf die Ausgangsfluoreszenz). Unter Kontrollbedingungen: während 20 min Normoxie, 40 min simulierter Ischämie und 40 min simulierter Reperfusion. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SEM von 16 Endothelzellen in einem einzelnen repräsentativen Experiment ( $n = 16$  Endothelzellen, 1 Experiment).

### 3.2 Radikalentstehung während simulierter Ischämie und Reperfusion

Bei diesen Experimenten sollte die Frage geklärt werden, ob unter den Bedingungen der simulierten Reperfusion, bei der die Endothelzellen also wieder Sauerstoff und Energie erhalten, gleichzeitig ein vermehrter Anstieg der Radikalproduktion registriert werden kann. Als fluoreszenzoptischer Indikator wurde dafür der Farbstoff  $H_2DCFDA$  eingesetzt.

Wie Abbildung 1 zeigt, stieg die Radikalbildung der Endothelzellen während simulierter Ischämie kontinuierlich an (in diesem Experiment: DCF-Fluoreszenzzunahme ( $\Delta F/F_0$ ) in %: Normoxie  $4 \pm 1$  vs. End-Ischämie  $85 \pm 1$ ;  $n = 16$  Zellen,  $p < 0,05$ ). Während der simulierten Reperfusion kam es bereits in den ersten Minuten zu einem schnellen und deutlichen Anstieg

## Ergebnisse

der DCF-Fluoreszenz. Danach verlangsamte sich der Anstieg, nahm aber bis zum Ende des Versuches weiterhin zu (in diesem Experiment: DCF-Fluoreszenzzunahme ( $\Delta F/F_0$ ) in %: End-Ischämie  $85 \pm 1$  vs. Ischämie + Reperfusion  $368 \pm 46$ ;  $n = 16$  Zellen,  $p < 0,05$ ). In Abbildung 2 wird der Verlauf der DCF-Fluoreszenzzunahme als Mittelwert  $\pm$  SEM aller Kontrollversuche dargestellt. Die deutliche Zunahme des Fluoreszenzsignals in der Reperfusionsphase konnte durch die Zugabe des Radikalfängers Trolox, ein Vitamin-E-Analogon, mit Beginn der Reperfusion auf nahezu endischämische Werte reduziert werden (Abb. 3). Diese Daten zeigen, dass es mit Beginn der Reperfusion zu Radikalbildung kommt.

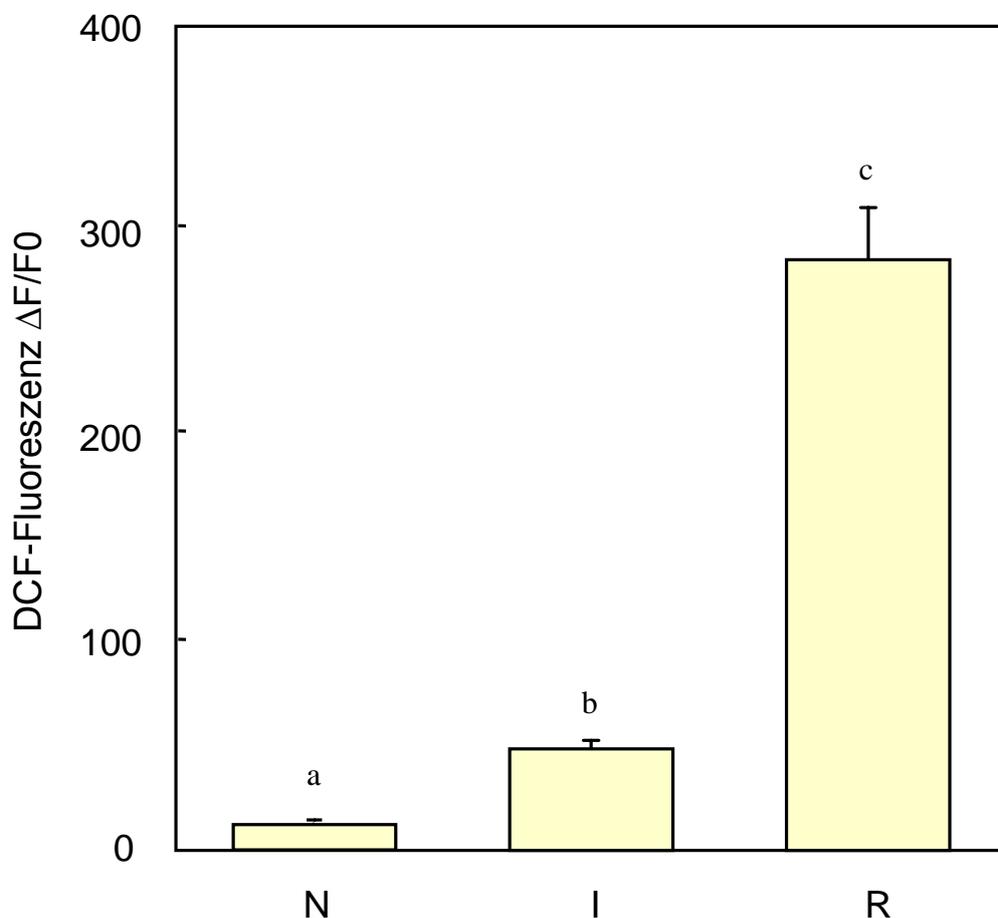


Abb. 2: DCF-Fluoreszenzsignal ( $\Delta F/F_0$ ) nach Hintergrundkorrektur (Zunahme in %, bezogen auf die Ausgangsfluoreszenz): während Normoxie (N), nach 40 min simulierter Ischämie (I) und am Ende der 40 min simulierten Reperfusion (R). Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM. Gruppen, die mit unterschiedlichen Buchstaben (a, b, c) markiert sind, unterscheiden sich signifikant voneinander (Tukey) ( $n = 6$  Experimente,  $p < 0,05$ ).

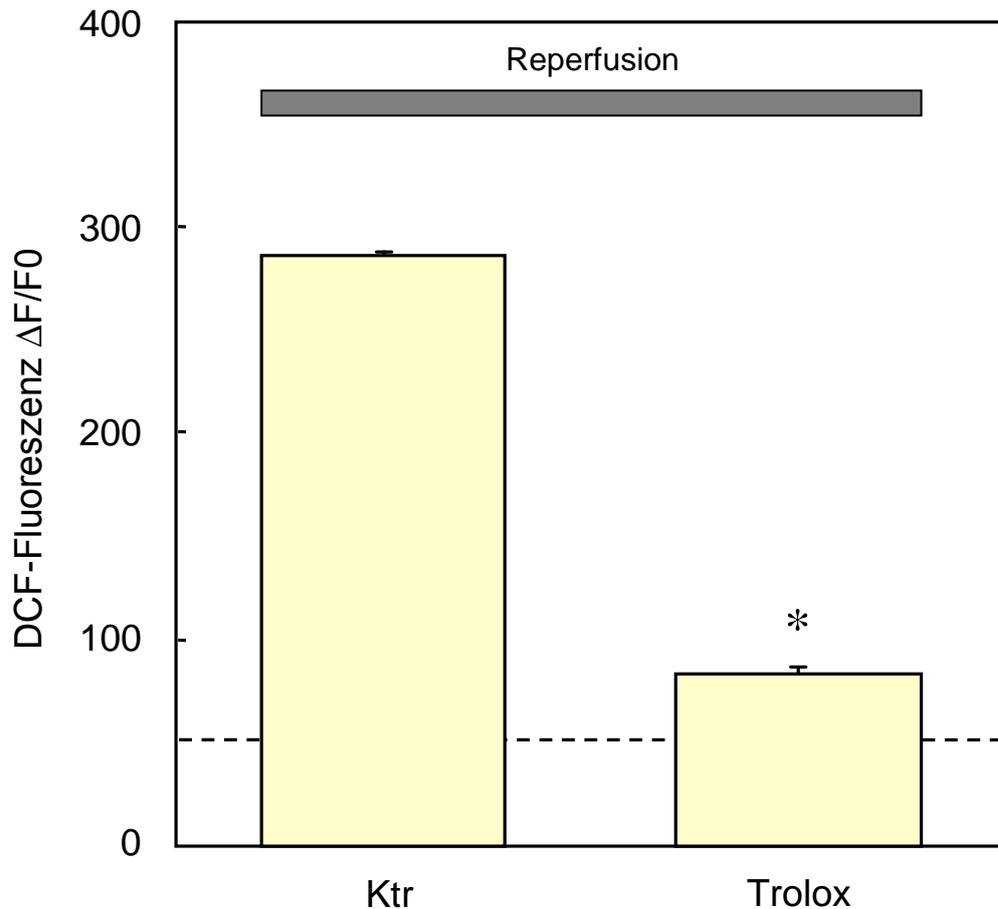


Abb. 3: DCF-Fluoreszenzsignal ( $\Delta F/F_0$ ) nach Hintergrundkorrektur (in %, bezogen auf die Ausgangsfluoreszenz): nach 40 min Reperfusion unter Kontrollbedingungen (Ktr) und nach Applikation von Trolox (500  $\mu$ M). Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* signifikanter Unterschied zur Kontrolle nach Bonferroni (n = 6 Experimente, p < 0,05). Die gestrichelte Linie zeigt den endischämischen Mittelwert.

### 3.3 Einfluss der Radikalbildung auf den zytosolischen $Ca^{2+}$ -Anstieg während simulierter Reperfusion

In Abbildung 4 wird zunächst dargestellt wie sich der intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Gehalt im Verlauf der Ischämie-/Reperfusionsexperimente in den Kontrollversuchen entwickelte. Um in der Reperfusion einen Zusammenhang zwischen Radikalentstehung und zytosolischem  $Ca^{2+}$  zu untersuchen, wurden bei Fura-2-Messungen mit Beginn der Reperfusion Radikalfänger appliziert. In der Literatur werden für einige Radikalfänger, wie z. B. Tiron, unspezifische Effekte auf den intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Gehalt durch Chelatbildung beschrieben (Gosh et al. 2002). Deshalb wurden drei unterschiedliche Radikalfänger eingesetzt, um unspezifische

## Ergebnisse

Effekte auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen auszuschließen: Trolox, N-2-Mercaptopropionylglycin (MPG) und N-Acetylcystein (NAC). Alle drei Radikalfänger reduzierten den zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt im Vergleich zur Kontrolle signifikant (Abb. 5). Diese Daten zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen Radikalentstehung und Anstieg im zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  besteht. Im Weiteren sollte nun die Herkunft der Radikale näher untersucht werden.

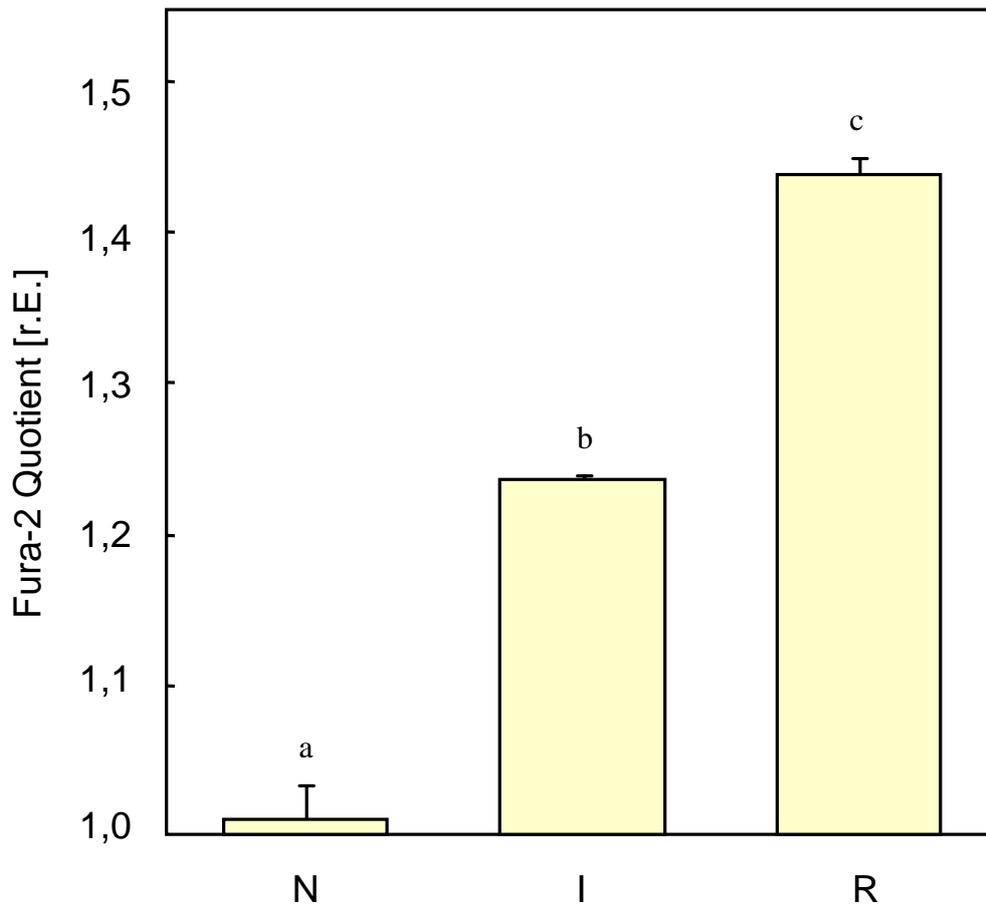


Abb. 4: Fura-2 Quotient während Normoxie (N), nach 40 min simulierter Ischämie (I) und am Ende der 40 min simulierten Reperfusion (R). Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM. Gruppen, die mit unterschiedlichen Buchstaben (a, b, c) markiert sind, unterscheiden sich signifikant voneinander (Tukey) ( $n = 5$  Experimente,  $p < 0,05$ ).

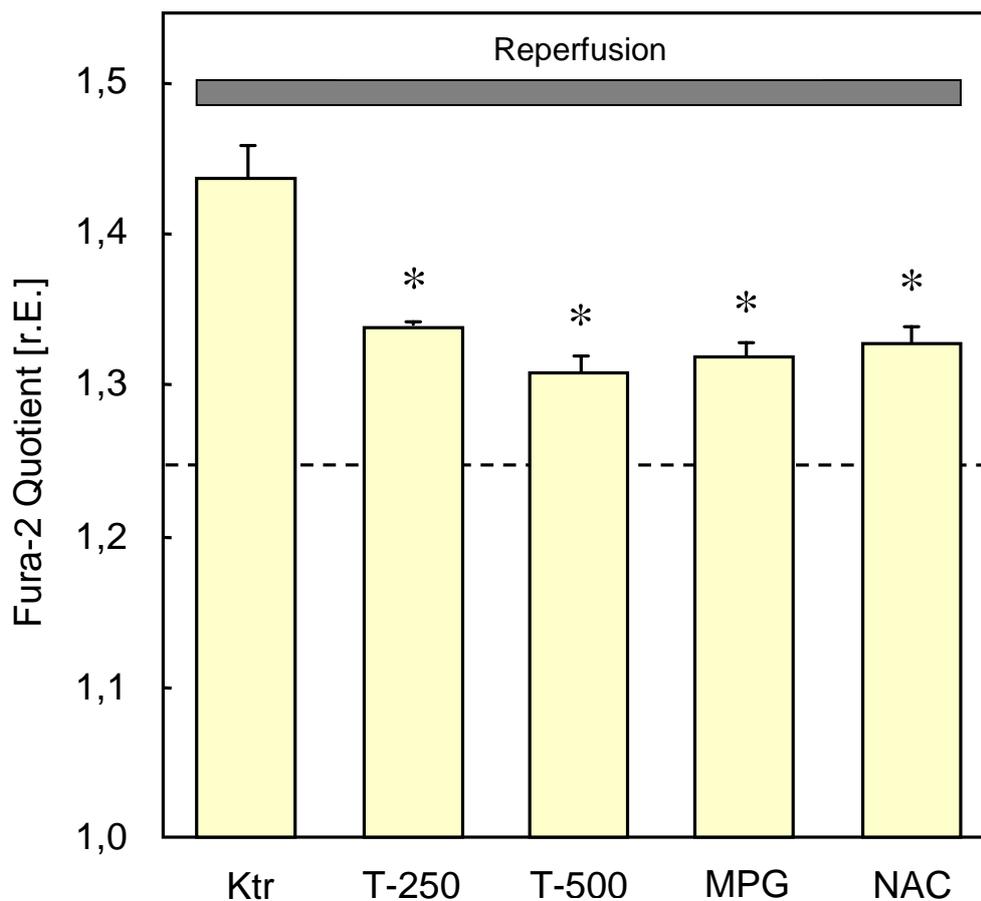


Abb. 5: Effekte von Trolox (T-250  $\mu\text{M}$  und T-500  $\mu\text{M}$ ), MPG (100  $\mu\text{M}$ ) sowie NAC (25 mM) auf den Fura-2 Quotienten am Ende der Reperfusion. Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* signifikanter Unterschied zur Kontrolle nach Bonferroni ( $n = 5$  Experimente,  $p < 0,05$ ). Die gestrichelte Linie zeigt den endischämischen Mittelwert.

### 3.4 Herkunft der Radikale während simulierter Reperfusion

Bei den folgenden Untersuchungen wurde der Fokus auf zwei mögliche Radikalquellen gelegt: die NADPH-Oxidase und die Mitochondrien. Die NADPH-Oxidase spielt in der Literatur bei der Radikalentstehung in Endothelzellen eine größere Rolle, weshalb Apocynin, ein spezifischer Inhibitor der NADPH-Oxidase, mit Beginn der Reperfusion appliziert wurde. Apocynin wurde dabei in zwei unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt, von denen eine Hemmung der NADPH-Oxidase bekannt ist (Zhang et al. 2002, Chen et al. 2006, Almeida et al. 2012). In Abbildung 6 sind die Ergebnisse der DCF-Messungen dargestellt. Die Hemmung der NADPH-Oxidase durch Apocynin führte dabei zu keiner Reduktion der Radikalentstehung.

## Ergebnisse

Auch die Mitochondrien gelten innerhalb der Zelle als eine bedeutende Radikalquelle. Gerade in der Reperfusion könnte die Verfügbarkeit von Sauerstoff und Energie dazu führen, dass durch steigende mitochondriale Aktivität eine vermehrte Radikalproduktion begünstigt wird. In den Untersuchungen wurde deshalb MitoQ, ein sehr effektiver, Mitochondrien-spezifischer Radikalfänger eingesetzt. Im Gegensatz zu dem NADPH-Oxidase-Inhibitor Apocynin führte die MitoQ-Applikation zu einer deutlichen Reduktion der Radikalproduktion während simulierter Reperfusion (Abb. 6). Dies weist auf die Mitochondrien als Quelle der Radikalbildung hin.

Ziel der folgenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen war, die Effekte von MitoQ und Apocynin auch auf das zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$  hin zu analysieren. Als Kontrollexperiment wurde in den  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen zusätzlich das inaktive Analogon von MitoQ, DTPP verwendet. Die Ergebnisse der  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen sind in Abbildung 7 dargestellt. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Radikal-Messungen hatte Apocynin, der Inhibitor der NADPH-Oxidase, auf den Anstieg in der Fura-2-Fluoreszenz sowohl bei 100  $\mu\text{M}$  (Abb. 7) als auch in der höheren Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  (hier nicht gezeigt) keinen Effekt. Im Gegensatz dazu konnte MitoQ in wirksamen Konzentrationen eine signifikante Reduktion des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels bewirken. Das inaktive Analogon DTPP zeigte dagegen keine Veränderung des Fura-2-Signals (Abb. 7). Dies deutet darauf hin, dass die Generierung mitochondrialer Radikale verantwortlich für den Reperfusion-induzierten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg ist.

## Ergebnisse

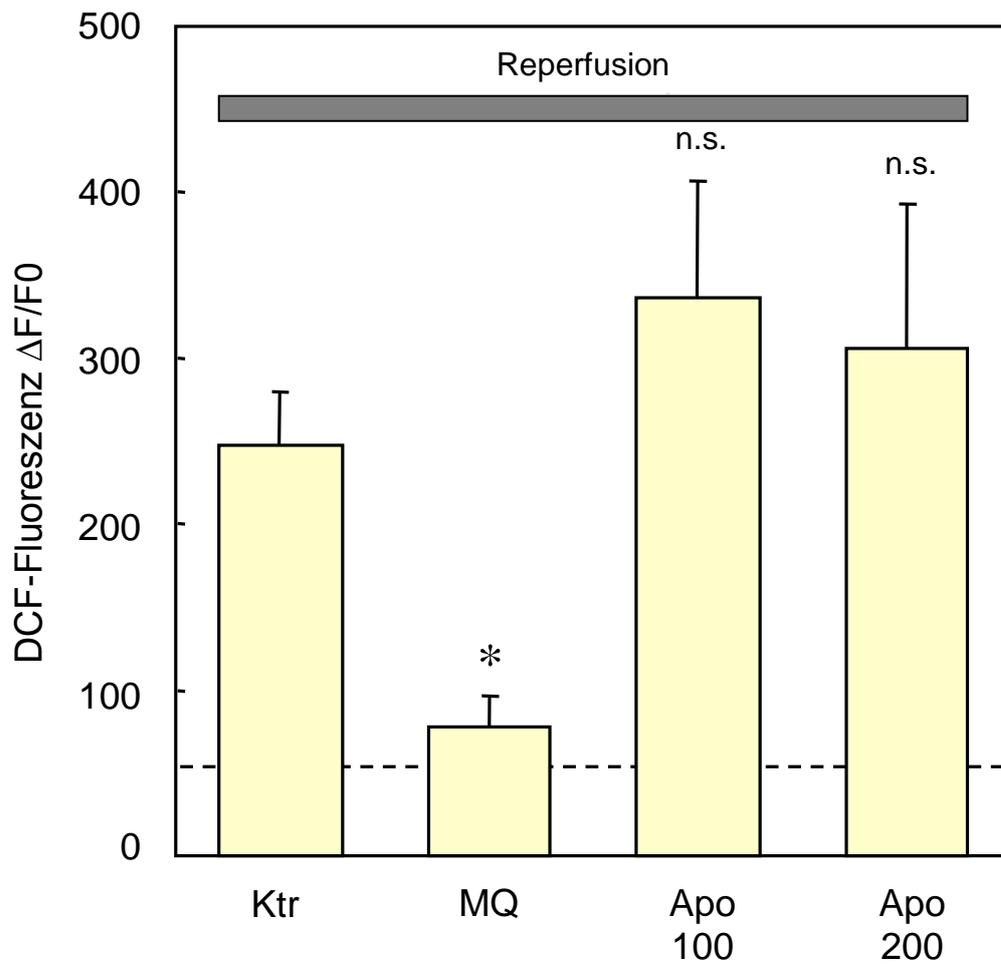


Abb. 6: Effekt von MitoQ (MQ 1  $\mu\text{M}$ ) und Apocynin (Apo 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ ) auf das DCF-Fluoreszenzsignal ( $\Delta F/F_0$ ) nach Hintergrundkorrektur (Zunahme in %, bezogen auf die Ausgangsfluoreszenz) nach 40 min simulierter Reperfusion. Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* signifikanter Unterschied zur Kontrolle nach Bonferroni (n = 5 Experimente,  $p < 0,05$ ). Die gestrichelte Linie zeigt den endischämischen Mittelwert.

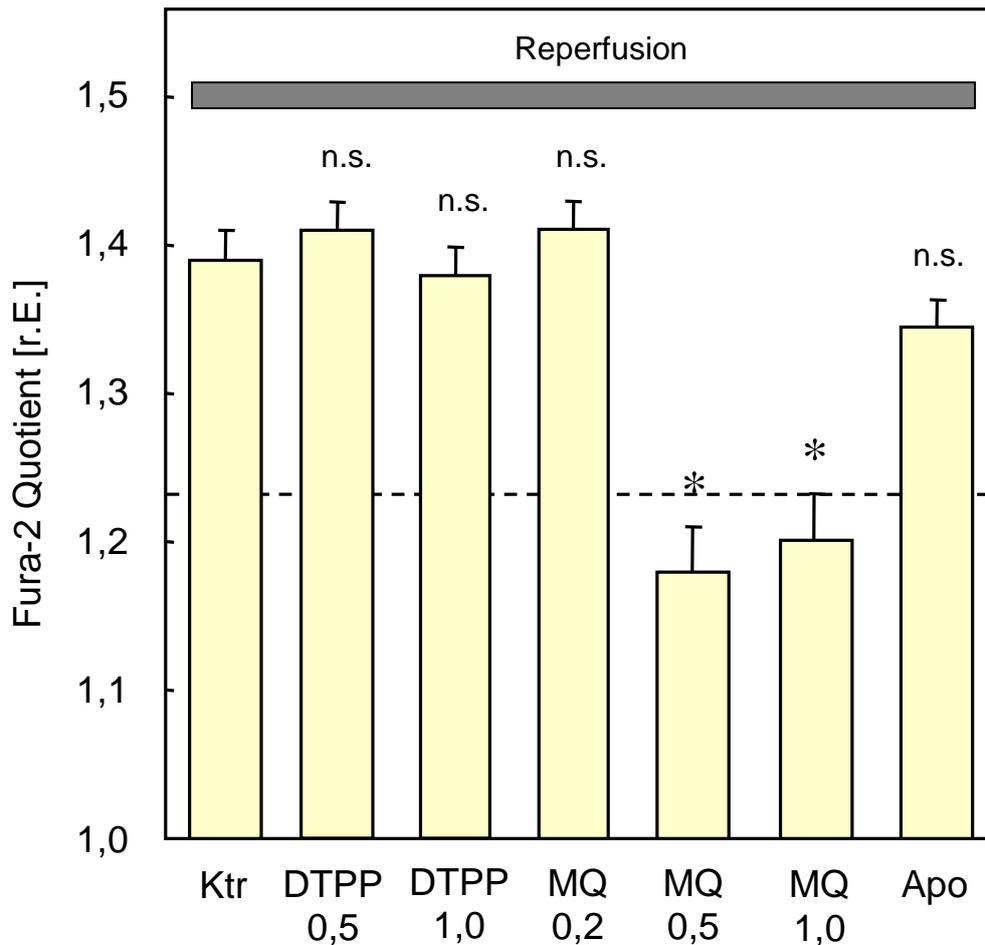


Abb. 7: Effekt von DTPP (0,5  $\mu$ M, 1,0  $\mu$ M) und MitoQ (MQ 0,2  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M, 1,0  $\mu$ M) sowie Apocynin (Apo 100  $\mu$ M) auf den Fura-2 Quotienten nach 40 min simulierter Reperfusion. Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* signifikanter Unterschied zur Kontrolle nach Bonferroni (n = 5 Experimente, p < 0,05). Die gestrichelte Linie zeigt den endischämischen Mittelwert.

### 3.5 Effekte verschiedener Inhibitoren der mitochondrialen

#### Atmungskette auf die Radikalentstehung

Um die Orte der Radikalentstehung innerhalb der mitochondrialen Atmungskette näher eingrenzen zu können, wurden verschiedene Inhibitoren der Komplexe I, II und III der mitochondrialen Atmungskette mit Beginn der Reperfusion appliziert: Rotenon (Komplex I-Inhibitor), DPI (Komplex I-Inhibitor), TTFA (Komplex II-Inhibitor) und Antimycin A (Komplex III-Inhibitor). Die Inhibitoren wurden dabei in gängigen, in der Literatur verwendeten Konzentrationen eingesetzt (Ingledew und Ohnishi 1977, Chandel et al. 2000, Grover 2004, Kumaran et al. 2004, Kyoi et al. 2006, Lambert et al. 2008, Lui et al. 2010). Als

## Ergebnisse

Kontrollexperiment wurde zur Unterbrechung des Substratflusses 2-Desoxyglukose (2-DG) eingesetzt. 2-DG bewirkt eine Hemmung der Glykolyse (Sokoloff et al. 1977). Dies führt indirekt zu einem Substratmangel für die mitochondriale Atmungskette.

TTFA, Inhibitor des Komplexes II, und Antimycin A, Inhibitor des Komplexes III, konnten beide die Radikalentstehung signifikant reduzieren. Im Gegensatz dazu hatten die Inhibitoren des Komplexes I, DPI und Rotenon, keinen hemmenden Effekt auf die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (Abb. 8).

2-Desoxyglukose (2-DG) zeigte eine reduzierende Wirkung auf die Radikalgenerierung (Abb. 8).

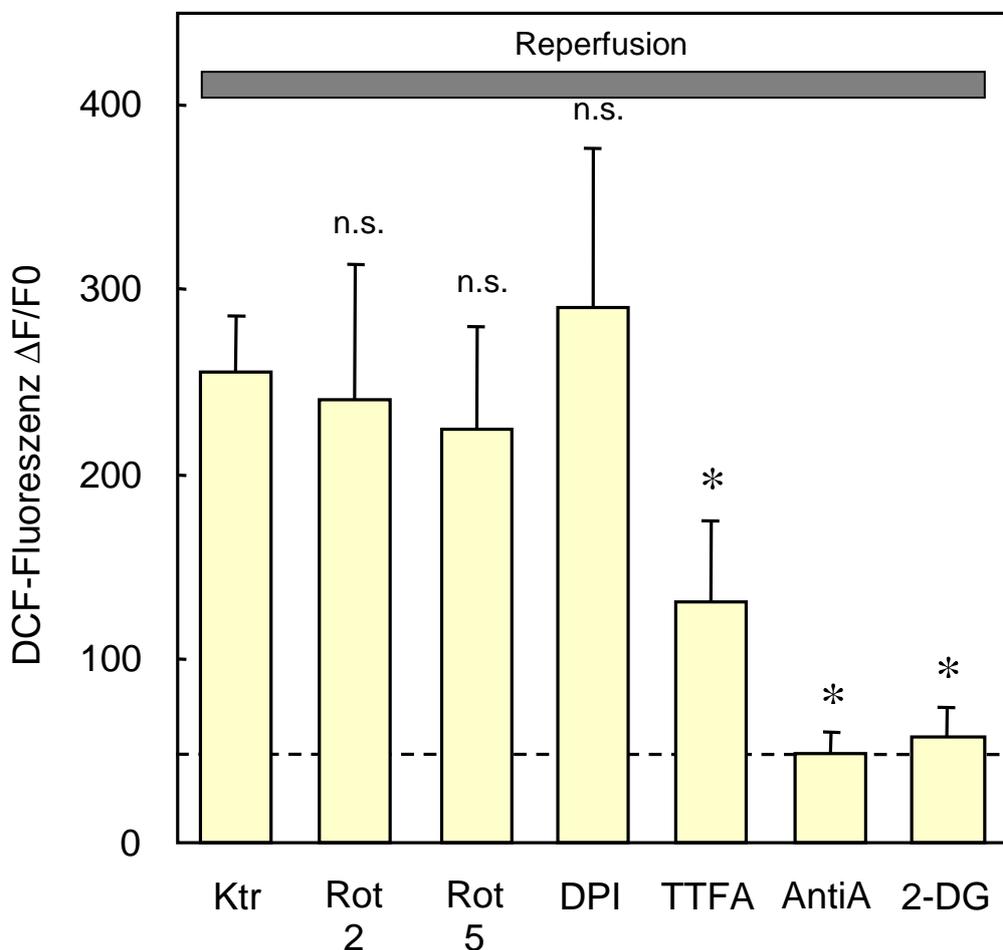


Abb. 8: Messung der Radikalentstehung nach 40 min simulierter Reperfusion durch Darstellung des DCF-Fluoreszenzsignals ( $\Delta F/F_0$ ) nach Hintergrundkorrektur (Zunahme in %, bezogen auf die Ausgangsfluoreszenz) bei Applikation von Rotenon (Rot 2  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ ), DPI (10  $\mu\text{M}$ ), TTFA (40  $\mu\text{M}$ ), Antimycin A (AntiA 2  $\mu\text{g/ml}$ ) und 2-DG (10 mM). Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* signifikanter Unterschied zur Kontrolle nach Bonferroni (n = 4 Experimente, p < 0,05). Die gestrichelte Linie zeigt den endischämischen Mittelwert.

### **3.6 Mitochondriales Membranpotential $\Delta\Psi_M$ während simulierter Ischämie und Reperfusion**

Die bisherigen Ergebnisse deuten auf die mitochondriale Atmungskette als Quelle der Radikalentstehung während simulierter Reperfusion hin. Da mitochondriale Atmung und mitochondriales Membranpotential (MMP) eng gekoppelt sind, sollte das MMP an den intakten Endothelzellen unter Ischämie-/Reperusionsbedingungen qualitativ mittels des Fluoreszenzindikators JC-1 ermittelt werden. Dabei korreliert eine Abnahme des JC-1-Quotienten mit einer Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials.

Während der simulierten Ischämie über 40 min konnte eine kontinuierliche Abnahme in der Kinetik des JC-1-Quotienten gemessen werden, was einer Depolarisation von MMP entspricht (Abb. 9). Mit Einsetzen der Reperfusion kam es innerhalb der ersten 5–10 min zu einem signifikanten Anstieg des JC-1-Signals, was mit einer Repolarisation des MMP gleichbedeutend ist. Jedoch flachte der Anstieg der JC-1-Fluoreszenz im weiteren Verlauf der Reperfusion ab und erreichte auch nach 40 min nicht den Wert wie zu Beginn der Ischämie (Abb. 9). Das ursprüngliche Membranpotential der Endothelzellen stellte sich also nach 40 min Reperfusion nicht wieder her (JC-1 Quotient [r.E.]: Normoxie:  $101,8 \pm 2,8$  vs. Reperfusion:  $84,1 \pm 3,8$ ;  $n = 3$  Experimente;  $p < 0,05$ ). Dennoch liegt dieser Wert signifikant über dem Wert, der bei Zellen gemessen wurde, die einer kontinuierlichen Ischämie über 80 min ausgesetzt waren. (JC-1 Quotient [r.E.]: kontinuierliche Ischämie:  $48,8 \pm 4,4$  vs. Reperfusion:  $84,1 \pm 3,8$ ;  $n = 3$  Experimente;  $p < 0,05$ ).

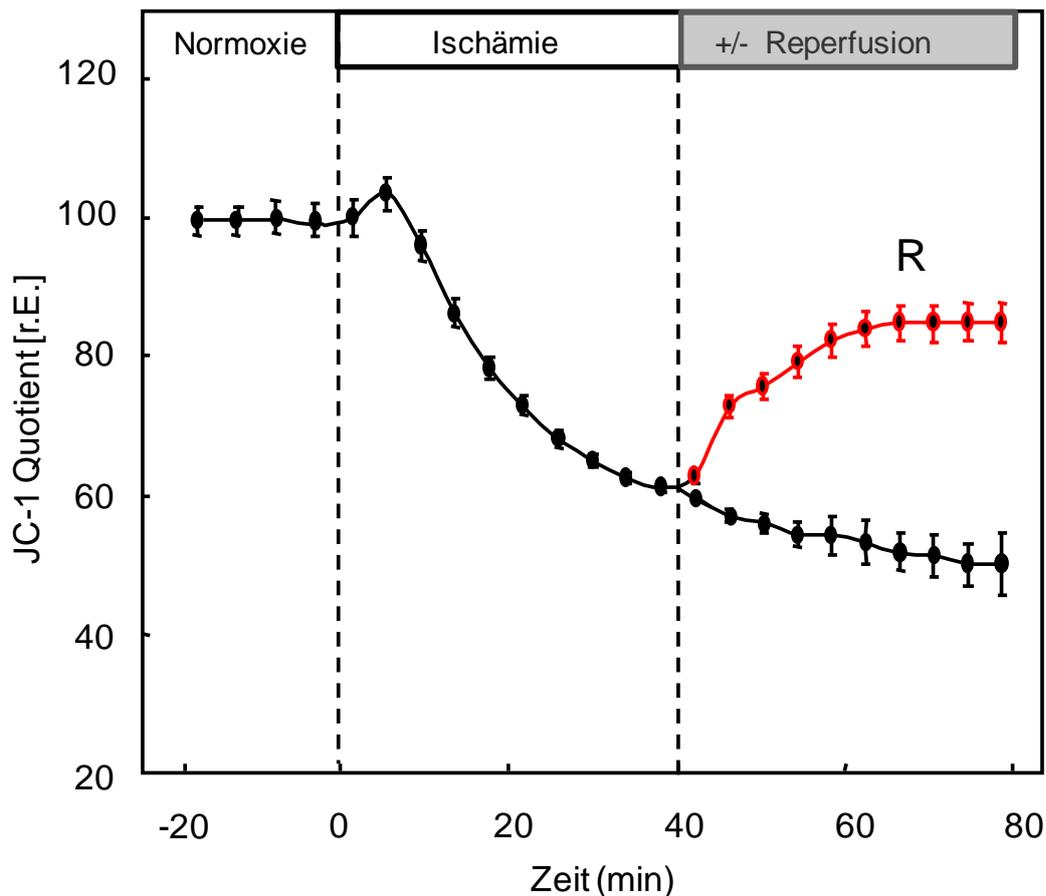


Abb. 9: JC-1 Quotient, dargestellt in relativen Einheiten [r.E.] zur Messung des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_M$ ). Kontinuierliche Ischämie —●— im Vergleich zur 40-minütigen postischämischen Reperfusion (R) —●—. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 Experimenten ( $n = 3$  Experimente,  $p < 0,05$ ).

### 3.7 Beeinflussung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_M$ während simulierter Reperfusion durch Radikalfänger

Im Weiteren sollte untersucht werden, ob unter Ischämie-/Reperfluationsbedingungen ein Zusammenhang zwischen Radikalentstehung und Änderung des mitochondrialen Membranpotentials gezeigt werden kann. Abbildung 10 zeigt die Veränderungen des JC-1-Quotienten im Verlauf der Kontrollexperimente. In Abbildung 11 ist ersichtlich, dass reperfundierte Endothelzellen in Anwesenheit des Radikalfängers Trolox nach 40 min einen signifikant höheren JC-1-Quotienten zeigten als Zellen ohne den Radikalfänger. Das bedeutet, dass der Radikalfänger eine leichte, aber doch signifikante Erholung des Membranpotentials bewirkt. Oligomycin, ein Inhibitor der ATP-Synthase, wurde in Kontrollexperimenten

## Ergebnisse

eingesetzt, um zu demonstrieren, dass die Hemmung der Atmungskette eine Erholung des Membranpotentials in der Reperfusion verhindert.

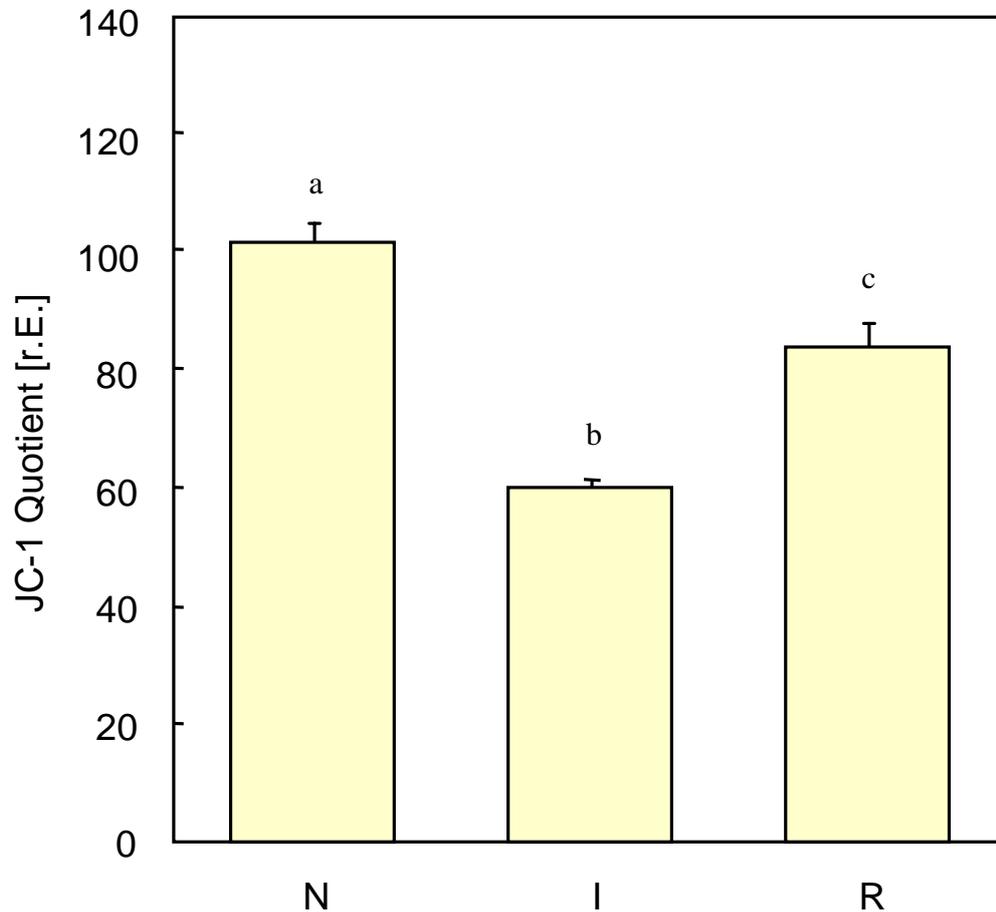


Abb. 10: JC-1 Quotient während Normoxie (N), nach 40 min simulierter Ischämie (I) und nach 40 min simulierter Reperfusion (R). Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM. Gruppen, die mit unterschiedlichen Buchstaben (a, b, c) markiert sind, unterscheiden sich signifikant voneinander (Tukey) ( $n = 5$  Experimente,  $p < 0,05$ ).

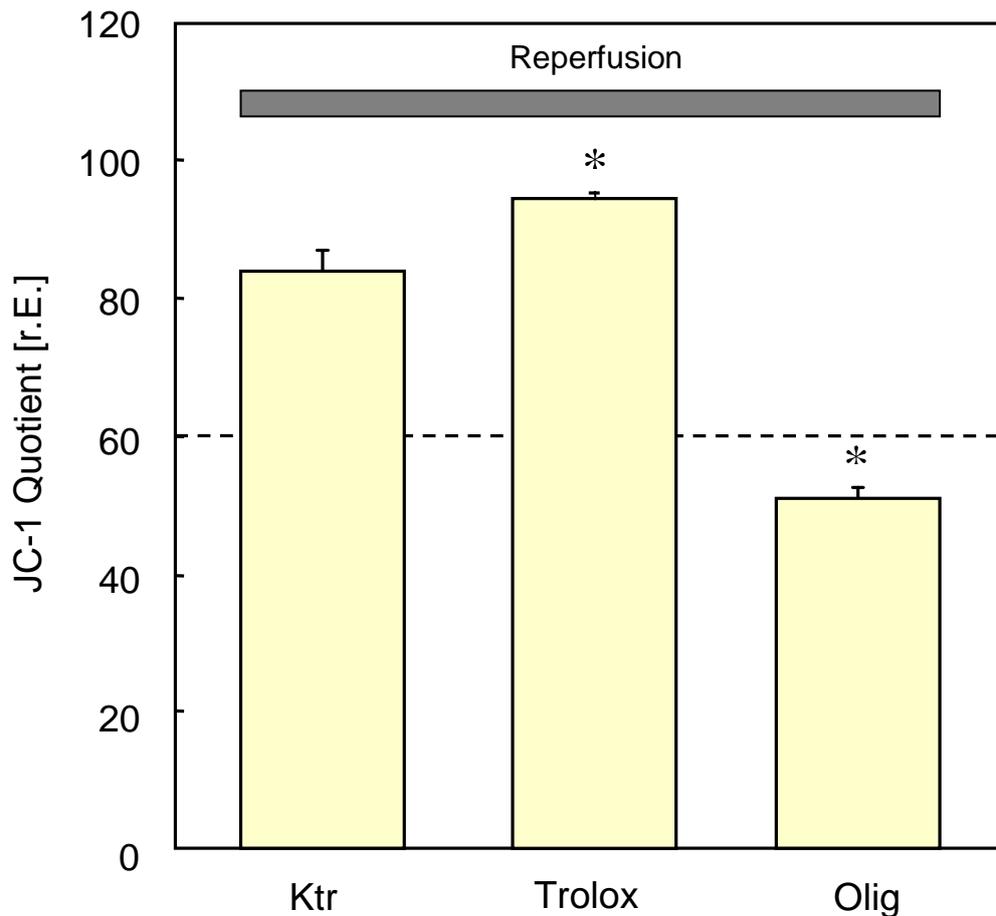


Abb. 11: JC-1 Quotient nach 40 min Reperfusion bei Applikation von Trolox (500  $\mu\text{M}$ ) und Oligomycin (Olig 10  $\mu\text{M}$ ). Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* signifikanter Unterschied zur Kontrolle nach Bonferroni (n = 5 Experimente, p < 0,05). Die gestrichelte Linie zeigt den endischämischen Mittelwert.

### 3.8 Zellulärer ATP-Gehalt während simulierter Ischämie und Reperfusion

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass während der Reperfusion in den Mitochondrien Radikale generiert werden und dass sich das mitochondriale Membranpotential nach Depolarisation in der Ischämie während der Reperfusion teilweise, aber nicht vollständig wiederherstellt. In weiteren Experimenten sollte der ATP-Gehalt der Endothelzellen bestimmt werden, da das mitochondriale Membranpotential für die Energiegewinnung der Zelle von Bedeutung ist. Hierfür wurde die indirekte ATP-Messung mittels Mag-Fura-2 gewählt. Die Mag-Fura-2-Fluoreszenz zeigt einen Anstieg der freien zytosolischen  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration an,

## Ergebnisse

die bei ATP-Zerfall durch Freisetzung von  $Mg^{2+}$  aus einem Komplex mit ATP resultiert. Dabei korreliert ein Anstieg in der Mag-Fura-2-Fluoreszenz mit einem Verlust von ATP.

Im Verlauf der Ischämiephase kam es innerhalb der ersten 20 min zu einem Anstieg in der Mag-Fura-2-Fluoreszenz (Abb. 12), was auf einen ATP-Verlust in der Zelle hindeutet. Im weiteren Verlauf der Ischämie stieg die Fluoreszenz nicht weiter an, sondern erreichte ein Plateau. Dieses Plateau setzte sich bei kontinuierlich fortgeführter Ischämie nahezu fort. Mit Beginn der Reperfusion zeigte sich ein schneller Abfall der Mag-Fura-2-Fluoreszenz, hinweisend auf einen ATP-Anstieg in der Zelle. Allerdings stieg das Signal nach dieser kurzen Phase wieder kontinuierlich an, was auf einen erneuten ATP-Verlust bei fortdauernder Reperfusion hindeutet (Mag-Fura-2 Quotient [r.E.]: Normoxie  $1,00 \pm 0,01$ , Ende der Ischämie  $1,10 \pm 0,01$ , Ende der Reperfusion  $1,12 \pm 0,01$ ,  $n = 3$  Experimente,  $p < 0,05$ ).

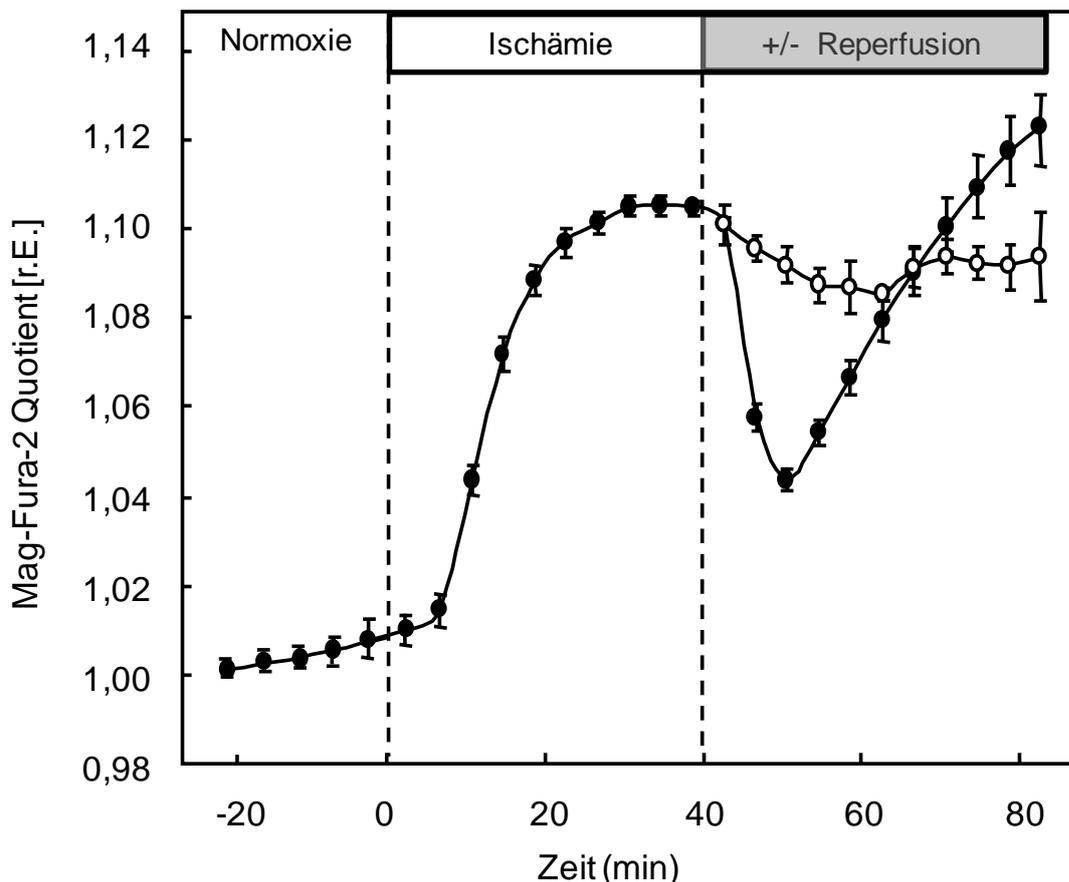


Abb. 12: Mag-Fura-2 Quotient, dargestellt in relativen Einheiten [r.E.] während 40 min postischämischer Reperfusion —●— im Vergleich zu kontinuierlicher Ischämie —○—. Die linke gestrichelte Linie markiert den Beginn der Ischämie. Die rechte gestrichelte Linie markiert den Beginn der Reperfusion. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 Experimenten ( $n = 3$  Experimente,  $p < 0,05$ ).

### **3.9 Beeinflussung des ATP-Gehaltes während simulierter Reperfusion durch Radikalfänger und Inhibitoren der Atmungskette**

Um zu untersuchen, ob ein mitochondrienspezifischer Radikalfänger protektive Effekte auf den ATP-Gehalt der Endothelzelle in der Reperfusion hat, wurde MitoQ mit Beginn der Reperfusion gegeben. Hierbei zeigte sich eine signifikante Reduktion der Mag-Fura-2-Fluoreszenz, was auf einen höheren ATP-Gehalt am Ende der Reperfusion hindeutet (Abb. 13). Hingegen zeigte das inaktive MitoQ-Analogon DTPP erwartungsgemäß keinen Unterschied zur Kontrolle. Die Blockade der Phosphoglucose-Isomerase durch den Inhibitor 2-Desoxyglucose (Abb. 13) diente wie DTPP als Kontrollexperiment und zeigte keine signifikante Reduktion des ATP-Verlustes.

Die Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette Rotenon und DPI (für Komplex I) sowie Antimycin A (für Komplex III) hatten keine signifikante Änderung des Fluoreszenzsignals nach 40 min Reperfusion im Vergleich zur Kontrolle zur Folge. Jedoch bewirkte der Komplex-II-Inhibitor TTFA eine signifikante Reduktion des ATP-Verlustes (Abb. 14).

## Ergebnisse

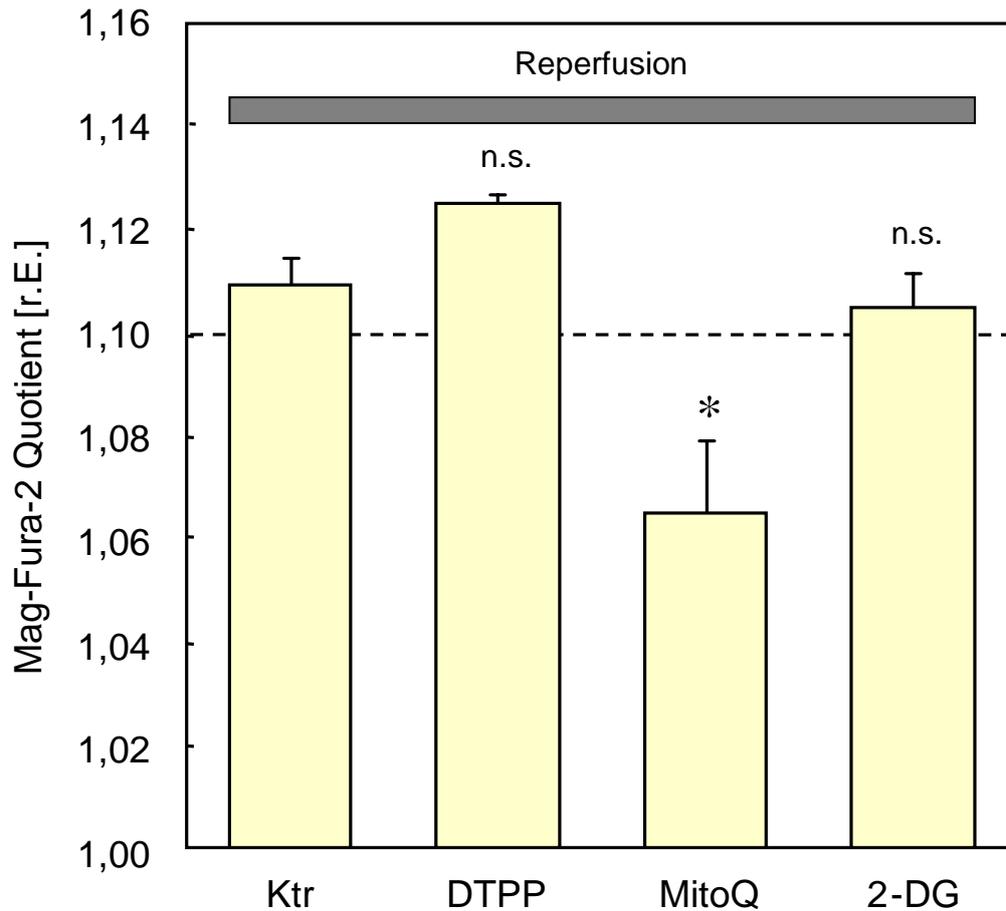


Abb. 13: Mag-Fura-2 Quotient nach 40 min Reperfusion bei Applikation von MitoQ (1  $\mu$ M), seinem inaktiven Analogon DTPP (1  $\mu$ M) und 2-DG (10 mM). Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* signifikanter Unterschied zur Kontrolle nach Bonferroni (n=5 Experimente,  $p < 0,05$ ). Die gestrichelte Linie zeigt den endischämischen Mittelwert.

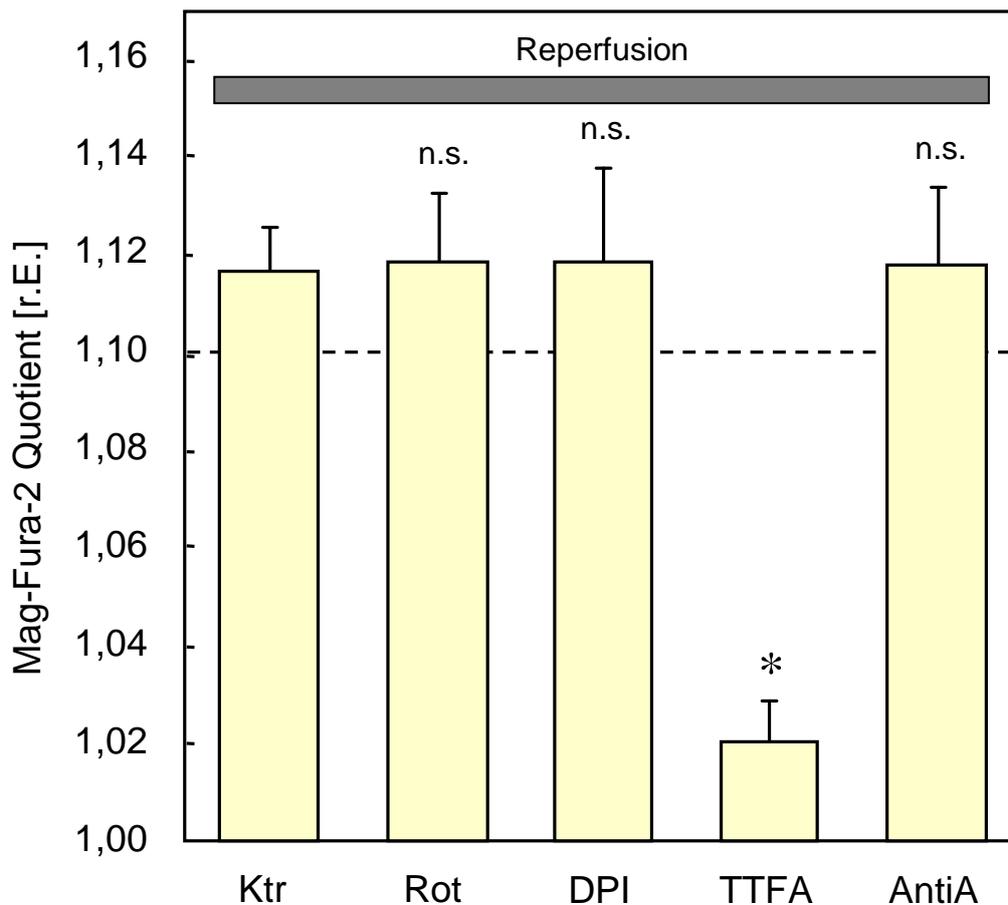


Abb. 14: Wirkung von Rotenon (Rot 5  $\mu\text{M}$ ), DPI (10  $\mu\text{M}$ ), TTFA (40  $\mu\text{M}$ ) und Antimycin A (AntiA 2  $\mu\text{g/ml}$ ) auf den Mag-Fura-2 Quotienten nach 40 min simulierter Reperfusion. Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* signifikanter Unterschied zur Kontrolle nach Bonferroni ( $n = 5$  Experimente,  $p < 0,05$ ). Die gestrichelte Linie zeigt den endischämischen Mittelwert.

### 3.10. Hemmstoffe der Atmungskette beeinflussen den $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel während simulierter Reperfusion

In den Fura-2-Messungen wurden die gleichen Inhibitoren der Atmungskette mit Beginn der simulierten Reperfusion appliziert, außerdem 2-Desoxyglucose als Kontrollexperiment zur Unterbrechung des Substratflusses. Darüber hinaus wurde Atractylosid verwendet (Knight et al. 2002), um eine Beteiligung der ADP/ATP-Translokase an der  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung während simulierter Reperfusion zu testen (hier nicht gezeigt). Die Fura-2-Messungen zeigen, dass allein TTFA (Inhibitor des Komplexes II) zu einer signifikanten Reduktion des  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieges in der Reperfusion führte (Abb. 15). Die Inhibitoren des Komplexes I, Rotenon und

## Ergebnisse

DPI, hatten keine signifikanten Effekte auf das Fura-2-Fluoreszenz-Signal. Auch der Inhibitor der  $F_1F_0$ -ATPase (Komplex V der Atmungskette), Oligomycin, beeinflusste den  $Ca^{2+}$ -Spiegel nicht signifikant. 2-Desoxyglucose bewirkte wie erwartet keine Reduktion des Fura-2-Signals und hatte dagegen einen zusätzlichen  $Ca^{2+}$ -Anstieg zur Folge. Auch der Inhibitor des Komplexes III, Antimycin A, bewirkte einen verstärkten  $Ca^{2+}$ -Anstieg.

Die Hemmung der ADP/ATP-Translokase durch Atractylosid hatte bis zum Ende der Reperfusion keinen signifikanten Effekt auf das Fura-2-Signal (Fura-2 Quotient [r.E.]: Ktr  $1,34 \pm 0,05$  vs. Atractylosid (10  $\mu$ M)  $1,29 \pm 0,07$ ;  $n = 4$  Experimente, n.s.).

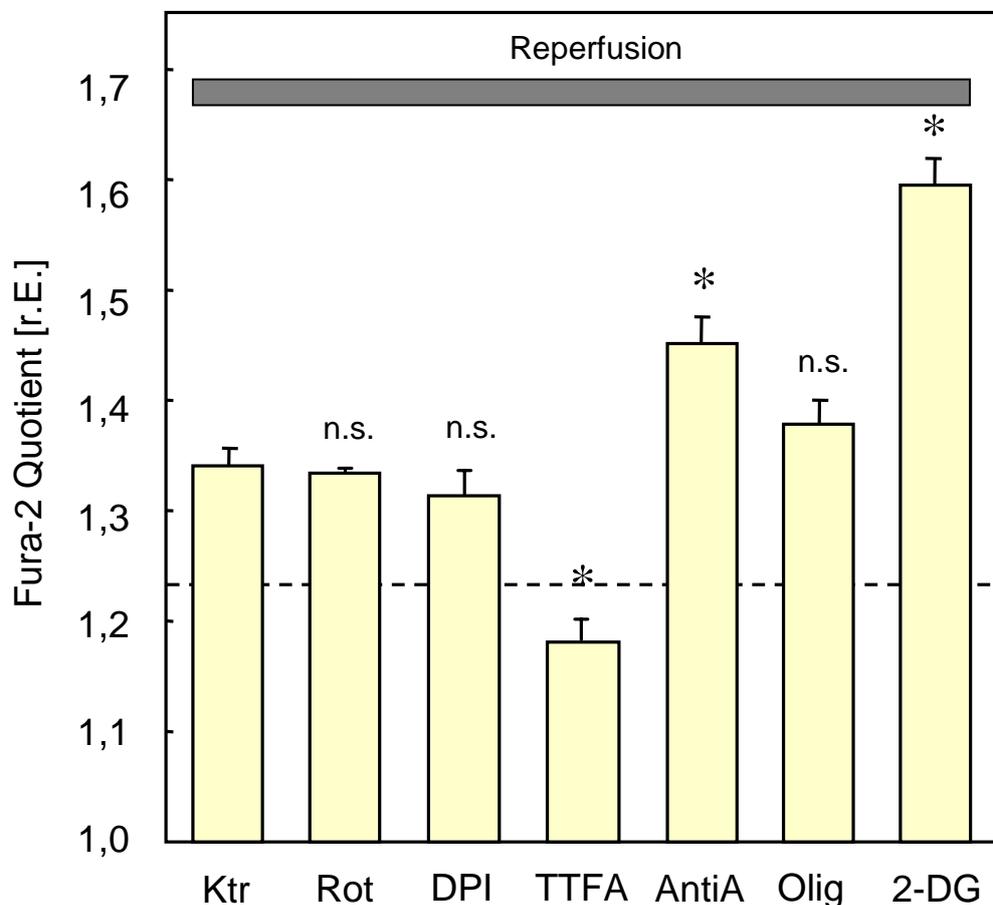


Abb. 15: Fura-2 Quotient nach 40 min simulierter Reperfusion, bei Zugabe von Rotenon (Rot 5  $\mu$ M), DPI (10  $\mu$ M), TTFA (40  $\mu$ M), Antimycin A (AntiA 2  $\mu$ g/ml), Oligomycin (Olig 10  $\mu$ M) und 2-Desoxyglukose (2-DG 10 mM). Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* signifikanter Unterschied zur Kontrolle nach Bonferroni ( $n = 5$  Experimente,  $p < 0,05$ ). Die gestrichelte Linie zeigt den endischämischen Mittelwert.

### **3.11 Zusammenhang zwischen Radikalen und Aktivierung der Phospholipase C**

#### **3.11.1. Wirkung von Inhibitoren der src-Kinasen auf den $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt während simulierter Reperfusion**

Aus früheren Daten der Arbeitsgruppe ist bekannt, dass die PLC zu Beginn der Reperfusion aktiviert wird. Inwieweit Kinasen der src-Familie über Aktivierung der PLC den Reperfusion-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg vermitteln, sollte in der vorliegenden Arbeit mit Fura-2-Messungen näher untersucht werden, um einen Zusammenhang zwischen Radikalbildung und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschüttung aus dem ER herzustellen. Zunächst wurden verschiedene spezifische Inhibitoren der Familie der src-Kinase, PP1, PP2 und SU 6656, mit Beginn der Reperfusion appliziert (Buresi et al. 2002, Tatton et al. 2003, Conde de la Rosa et al. 2006, Austin et al. 2009). Im Vergleich zur Kontrolle konnten alle drei Inhibitoren der src-Kinasen eine signifikante Reduktion des  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels in der Reperfusion bewirken. PP3, das inaktive Analogon von PP2, zeigte erwartungsgemäß keine Veränderung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels (Abb. 16). Damit liegt der Schluss nahe, dass src-Kinasen in den Anstieg des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes während der Reperfusion involviert sind.

## Ergebnisse

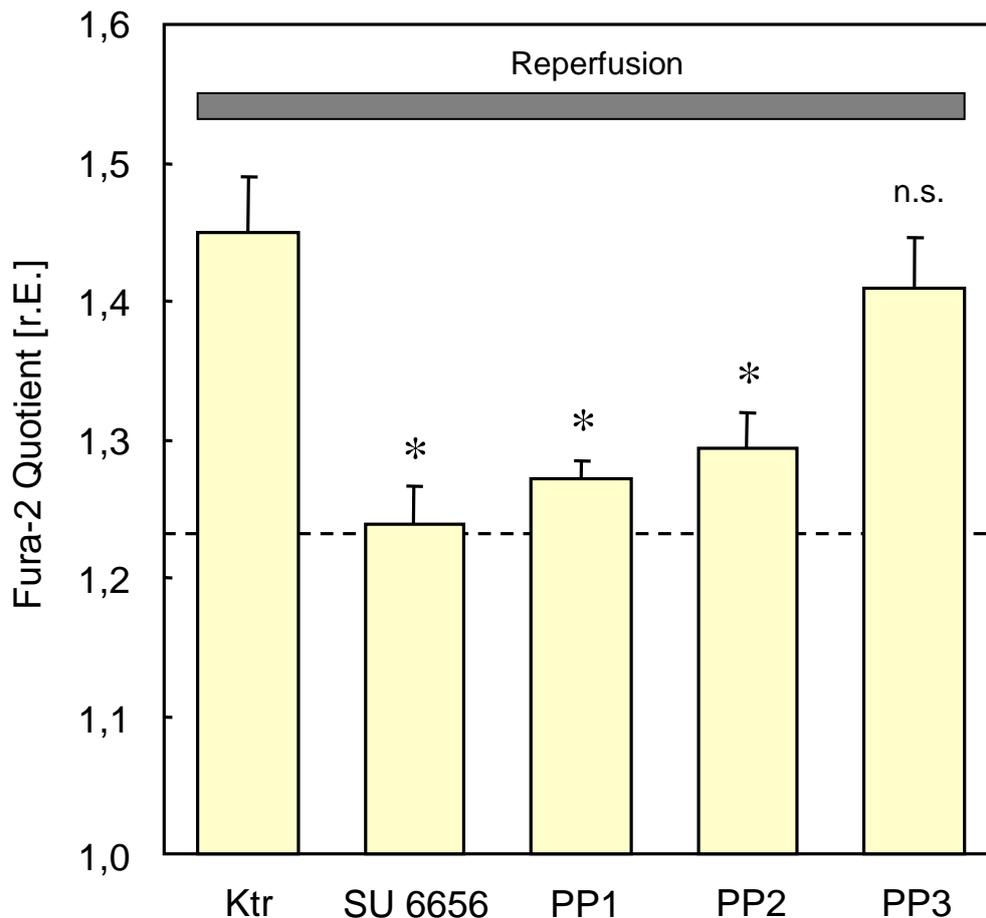


Abb. 16: Fura-2 Quotient nach 40 min simulierter Reperfusion, unter Applikation von SU 6656 (10  $\mu$ M), PP1 (1  $\mu$ M), PP2 (1  $\mu$ M) und PP3 (1  $\mu$ M) mit Beginn der Reperfusion. Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* signifikanter Unterschied zur Kontrolle nach Bonferroni (n = 5 Experimente, p < 0,05). Die gestrichelte Linie zeigt den endischämischen Mittelwert.

### 3.11.2 Aktivierung der PLC $\gamma$ 1 durch Radikale

Da aus der Literatur bekannt ist, dass die PLC $\gamma$ 1 in Anwesenheit von Radikalen phosphoryliert werden kann (Hong et al. 2006), wurde zunächst unter normoxen Bedingungen der Effekt von oxidativem Stress auf die PLC $\gamma$ 1-Phosphorylierung in den Endothelzellen mittels Westernblot untersucht. Dafür wurde das organische Peroxid t-BHP (tert-Butyl Hydroperoxid) verwendet, welches die funktionelle Gruppe des Peroxids enthält und deshalb als Oxidationsmittel eingesetzt wird (Keck 1996, Dumont et al. 2000, 2002). T-BHP ist außerdem bekannt dafür dass es den intrazellulären Glutathion-Spiegel senkt und dadurch zusätzlich den oxidativen Stress der Zelle verstärkt (Unterluggauer et al. 2003). In den Versuchen wurden Endothelzellen für 20 min mit verschiedenen Konzentrationen von

## Ergebnisse

t-BHP (10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M und 200  $\mu$ M) stimuliert und anschließend der Grad der PLC $_{\gamma}$ 1-Phosphorylierung mittels Westernblot analysiert. In der statistischen Auswertung in Abbildung 17 ist ersichtlich, dass es erst bei Konzentrationen von 50  $\mu$ M t-BHP zu einem signifikanten Auftreten der phosphorylierten PLC $_{\gamma}$ 1 (phosphoPLC $_{\gamma}$ 1), bezogen auf das Gesamtprotein der PLC $_{\gamma}$ 1 (gesamtPLC $_{\gamma}$ 1), in der Endothelzelle kam. Bei Konzentrationen von 100  $\mu$ M und 200  $\mu$ M t-BHP zeigte sich unter normoxen Bedingungen eine deutlich sichtbare Bande bei der phosphorylierten Form der PLC $_{\gamma}$ 1 im Gegensatz zu unstimulierten Endothelzellen (Abb. 18).

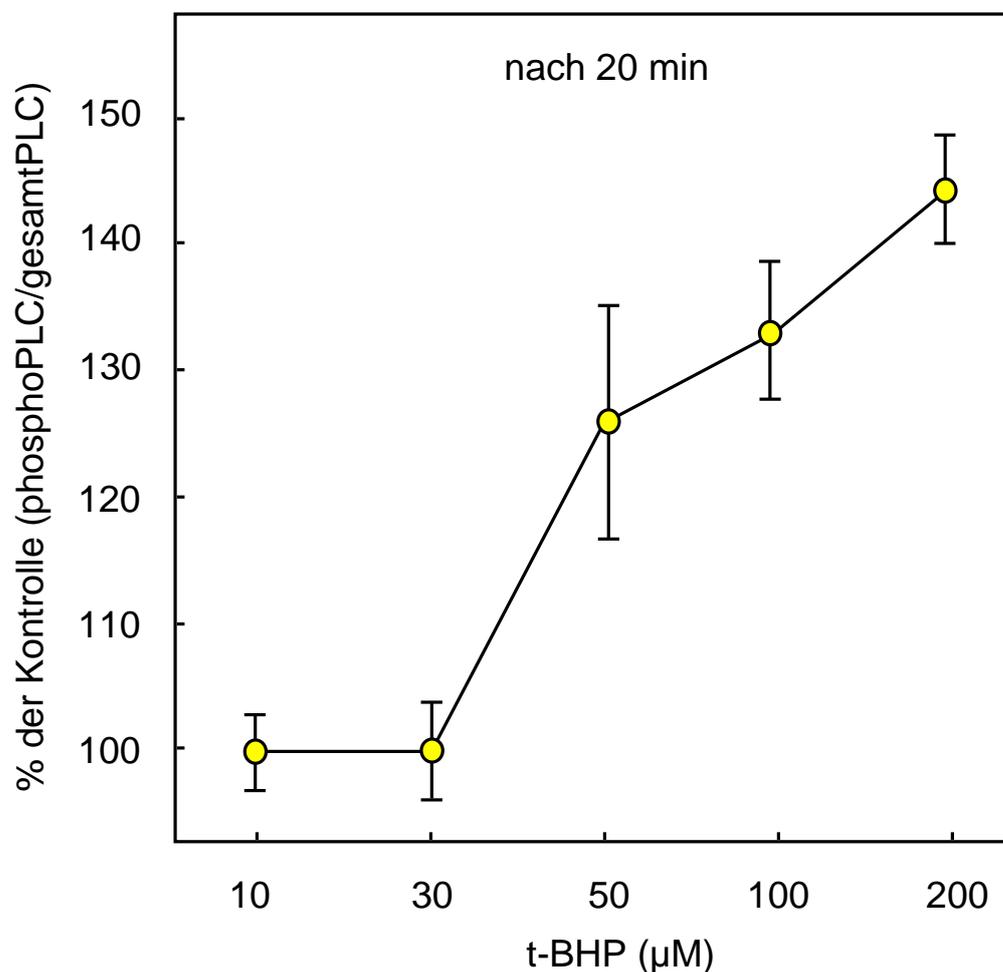


Abb. 17: t-BHP-Konzentrationsreihe und Grad der Phosphorylierung der PLC $_{\gamma}$ 1 in %, bezogen auf das Gesamtprotein PLC $_{\gamma}$ 1 der Kontrolle in Endothelzellen. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SEM, bezogen auf Prozent der Kontrolle (n = 3 Experimente).

## Ergebnisse

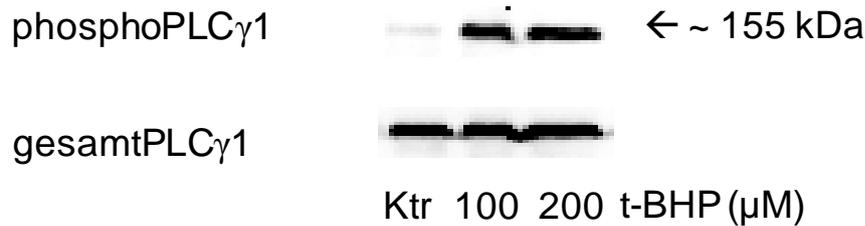


Abb. 18: Westernblot nach t-BHP-Applikation (100  $\mu$ M und 200  $\mu$ M) auf Endothelzellen für 20 min unter normoxen Bedingungen. Deutlich sichtbar unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stimulation ist eine Bande bei der phosphorylierten PLC $\gamma$ 1 (phosphoPLC $\gamma$ 1). Darstellung eines typischen Westernblots aus drei durchgeführten Experimenten.

Im nächsten Schritt wurde nun der Grad der PLC $\gamma$ 1-Phosphorylierung in der simulierten Reperfusion analysiert. Da die bisherigen Untersuchungen zeigen konnten, dass die Radikalproduktion innerhalb der ersten Minuten der simulierten Reperfusion schon deutlich anzusteigen beginnt, wurden die PLC $\gamma$ 1-Phosphorylierung mittels Westernblot nach 5 min der Reperfusion gemessen, um auf molekularer Ebene kurzfristige Effekte darzustellen.

Dabei zeigte sich unter Reperfusionsbedingungen eine deutliche Zunahme in der Phosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 (Abb. 19), die in Anwesenheit der Radikalfänger Trolox, MPG und NAC deutlich reduziert werden konnte. Ebenso führten die src-Kinase-Inhibitoren PP1 und SU 6656 zu einer deutlichen Abnahme der PLC $\gamma$ 1-Phosphorylierung. Der PLC-Inhibitor U73122 diente als Positivkontrolle und hatte einen mit den Radikalfängern vergleichbaren hemmenden Effekt auf die PLC $\gamma$ 1-Phosphorylierung.

Dies zeigt einerseits deutlich, dass src-Kinasen tatsächlich eine Phosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 bewirken. Zusammen mit den Daten aus den Ca<sup>2+</sup>-Messungen in Abb. 16, unter Einsatz der src-Kinase Inhibitoren, kann man nun darauf schließen, dass durch Hemmung der src-Kinasen die Phosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 verhindert und dadurch deutlich weniger Ca<sup>2+</sup> ins Zytosol ausgeschüttet wird.

Andererseits unterstreicht das Ergebnis die Beteiligung der Radikale an der PLC $\gamma$ 1-Aktivierung während der Reperfusion.

Ergebnisse

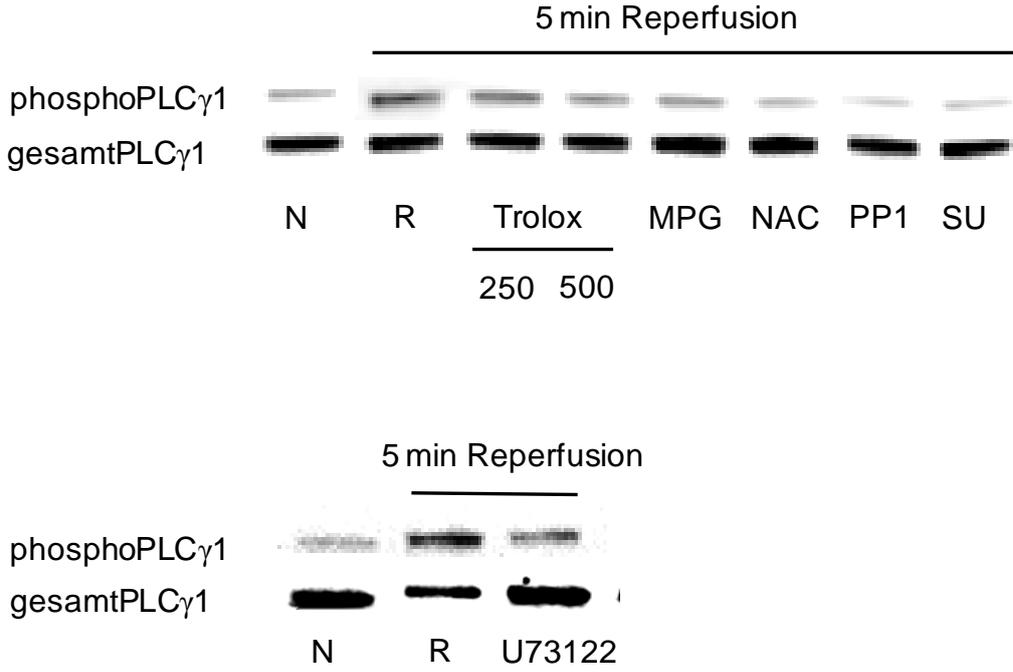


Abb. 19: Westernblot zur Bestimmung der PLC $\gamma$ 1-Phosphorylierung bei Normoxie (N), nach 5-minütiger Reperfusion (R) und nach 5-minütiger Reperfusion unter Applikation der Radikalfänger Trolox (250  $\mu$ M und 500  $\mu$ M), MPG (100  $\mu$ M), NAC (25  $\mu$ M) sowie der src-Kinase Inhibitoren PP1 (1  $\mu$ M) und SU 6656 (SU 10  $\mu$ M). Als Positivkontrolle wurde der PLC-Inhibitor U73122 eingesetzt. Darstellung eines typischen Westernblots aus drei durchgeführten Experimenten.

### 3.12. Effekte auf die interzelluläre Lückenbildung

Parallel zu den  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen wurde die Ausdehnung der interzellulären Lücken planimetrisch bestimmt und wird in den Abb. 20, 21 und 22 prozentual dargestellt. Der endischämische Wert wurde auf 100 % gesetzt und alle folgenden Veränderungen der Lücken hierauf bezogen. Unter Ischämiebedingungen kam es zu einer kontinuierlichen Zunahme der Lückenbildung, die sich unter Reperfusionbedingungen signifikant verstärkte (Abb. 20). Dabei führte die Applikation von MitoQ während der 40-minütigen simulierten Reperfusion zu einer signifikanten Reduktion der Lückenentstehung, wohingegen das inaktive Analogon von MitoQ DTPP keinen Effekt auf die Lückenbildung der Reperfusion zeigte (Abb. 21).

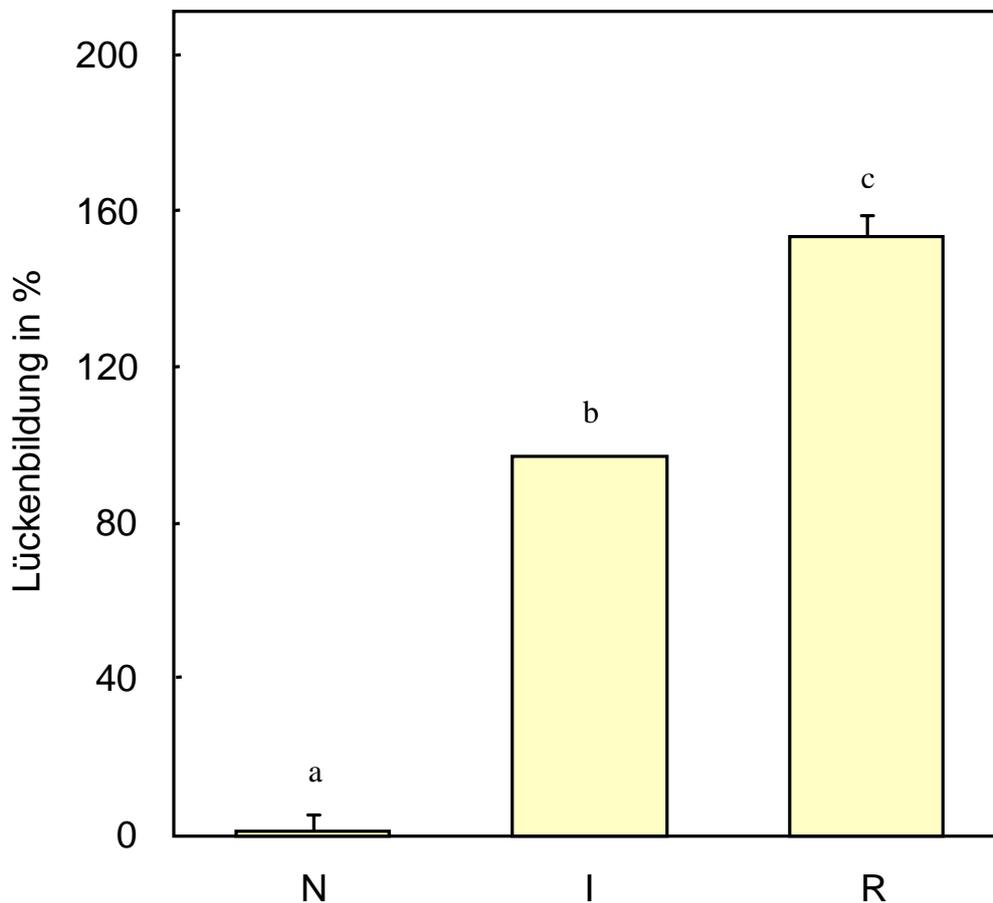


Abb. 20: Darstellung der Zunahme der interzellulären Lückenbildung in % (in Bezug auf die endischämische Lückenbildung, welche auf 100 % gesetzt wurde) während Normoxie (N), nach 40 min simulierter Ischämie (I) und nach 40 min simulierter Reperfusion (R). Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM. Gruppen, die mit unterschiedlichen Buchstaben (a,b,c) markiert sind, unterscheiden sich signifikant voneinander (Tukey). (n = 5 Experimente,  $p < 0,05$ ).

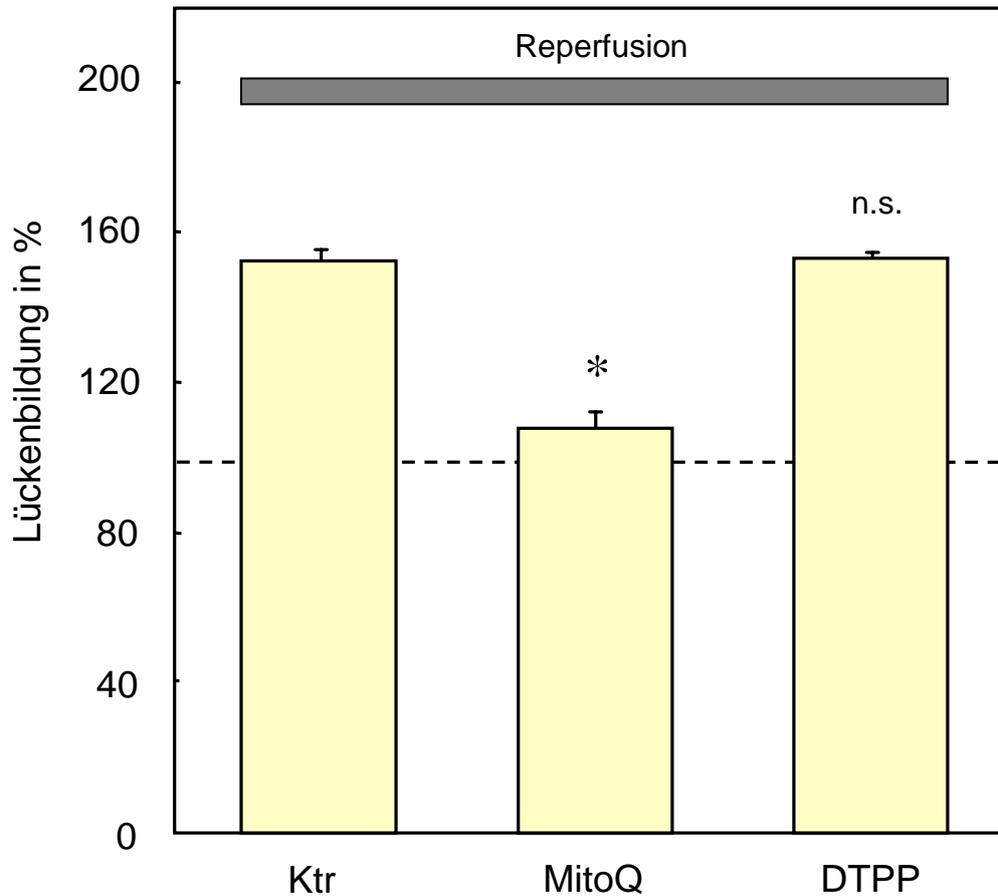


Abb. 21: Darstellung der Zunahme der interzellulären Lückenbildung in % (in Bezug auf die endischämische Lückenbildung, welche auf 100 % gesetzt wurde) bei Applikation von MitoQ (1  $\mu$ M) und DTPP (1  $\mu$ M) nach 40 min Reperfusion. Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* signifikanter Unterschied zur Kontrolle nach Bonferroni. (n = 5 Experimente, p < 0,05). Die gestrichelte Linie zeigt den endischämischen Mittelwert.

Bei den Untersuchungen zur Wirkung der verschiedenen Inhibitoren der Atmungskette auf die interzelluläre Lückenbildung führte TTFA zu einer signifikanten Reduktion (Abb. 23). Auch Oligomycin reduzierte die Entstehung der Lücken, was durch den induzierten ATP-Mangel erklärbar ist. Die anderen Inhibitoren hatten keinen signifikanten Effekt.

## Ergebnisse

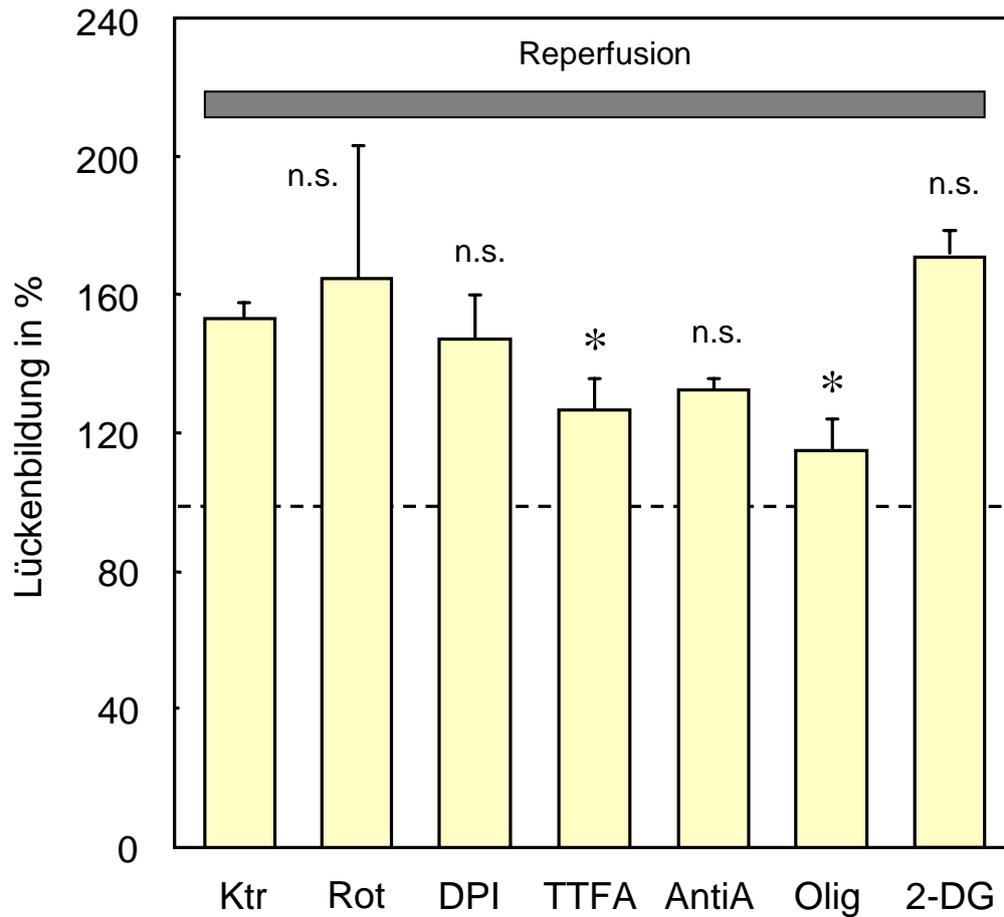


Abb. 22: Zunahme der Interzellulären Lückenbildung in % (in Bezug auf die endischämische Lückenbildung, welche auf 100 % gesetzt wurde) nach 40 min Reperfusion bei Applikation von Rotenon (Rot 5  $\mu$ M), DPI (10  $\mu$ M), TTFA (40  $\mu$ M), Antimycin A (AntiA 2  $\mu$ g), Oligomycin (10  $\mu$ M) und 2-Deoxyglukose (2-DG 10 mM) während der Reperfusion. Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* signifikanter Unterschied zur Kontrolle nach Bonferroni. (n = 3 Experimente, p < 0,05). Die gestrichelte Linie zeigt den endischämischen Mittelwert.

## 4 Diskussion

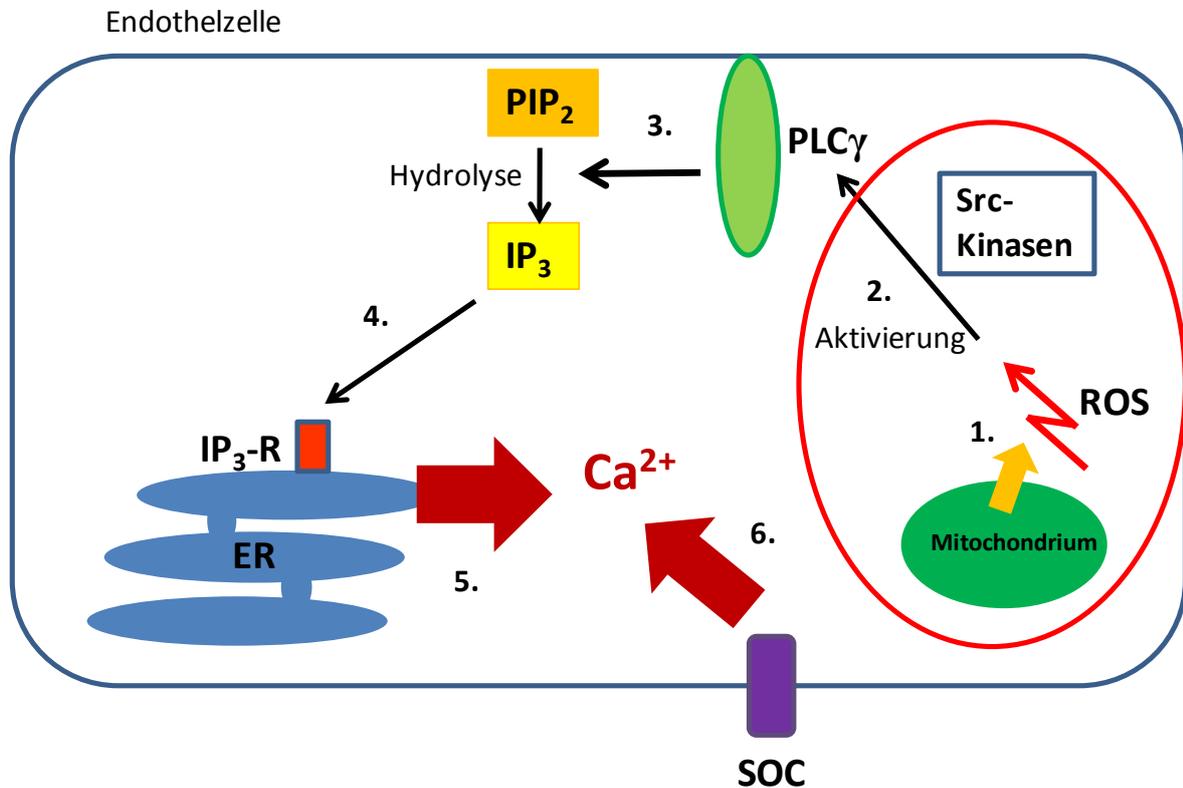
In dieser Arbeit wurden koronare mikrovaskuläre Endothelzellen einer simulierten Ischämie und Reperfusion ausgesetzt, um durch fluoreszenzoptische Methoden und Westernblots verschiedene Messungen in einer dem Myokardinfarkt ähnlichen Situation durchzuführen. Ziel war es, die Beteiligung endothelialer Mitochondrien bei der Auslösung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung während der Reperfusion und der daraus resultierenden Zellschädigungen zu ergründen.

Die Hauptbefunde der vorliegenden Arbeit sind folgende:

1. Die fluoreszenzoptischen Messungen ließen eine Radikalentstehung der koronaren mikrovaskulären Endothelzellen während der Reperfusion erkennen, welche durch verschiedene Radikalfänger reduziert werden konnte. Dabei zeigte der mitochondrienspezifische Radikalfänger MitoQ den größten Effekt. Auch der Inhibitor des Komplexes II der mitochondrialen Atmungskette TTFA bewirkte eine deutliche Reduktion der Radikalentstehung.
2. Der zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg in Endothelzellen während der Reperfusion konnte durch Applikation des mitochondrienspezifischen Radikalfängers MitoQ und durch Hemmung des Komplexes II der Atmungskette reduziert werden.
3. In der Reperfusion fand eine Aktivierung der endothelialen  $\text{PLC}\gamma 1$  statt. Diese Aktivierung ließ sich durch den Einsatz verschiedener Radikalfänger reduzieren.
4. Spezifische src-Kinase-Inhibitoren führten sowohl zu einer Reduktion des  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstiegs als auch zu herabgesetzter  $\text{PLC}\gamma 1$ -Phosphorylierung in der Reperfusion.
5. Im Verlauf der postischämischen Reperfusion fand nach initialer Erholung ein erneut zunehmender ATP-Abfall statt. Dieser Abfall des ATP-Spiegels ließ sich durch MitoQ und TTFA verhindern.

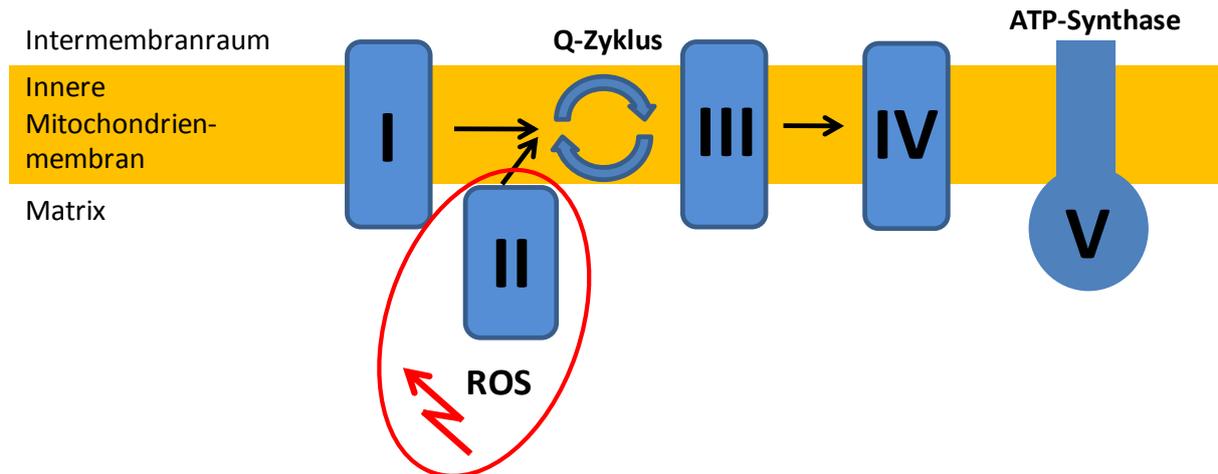
## Diskussion

6. Der mitochondrienspezifische Radikalfänger MitoQ und der Hemmstoff des II. Komplexes der Atmungskette TTFA bewirkten beide eine Reduktion der interzellulären Lückenbildung.



Schema 4.1: Darstellung des Signalweges, der innerhalb einer Endothelzelle während der Reperfusion zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung führt: 1. Radikale (ROS) entstehen im Mitochondrium. 2. ROS führen zur src-Kinase-vermittelten Aktivierung der PLC $\gamma$ . 3. Die phosphorylierte PLC $\gamma$  bewirkt die Hydrolyse von PIP $_2$  zu IP $_3$ . 4. IP $_3$  bindet an IP $_3$ -Rezeptoren (IP $_3$ -R) des Endoplasmatischen Retikulums (ER). 5. Aus dem ER strömt  $\text{Ca}^{2+}$  ins Zytosol. 6. Es folgt der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom von Extrazellulär durch SOC (store-operated channels).

## Diskussion



Schema 4.2: Darstellung der inneren Mitochondrienmembran mit der mitochondrialen Atmungskette. Komplex II stellt in der postischämischen Reperfusion koronarer mikrovaskulärer Endothelzellen eine wichtige Ursache der Radikalentstehung dar.

Es ist bekannt, dass es in der postischämischen Reperfusion koronarer mikrovaskulärer Endothelzellen zu einer Überladung des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  kommt (Allshire et al. 1987, Ladilov et al. 2000, Peters und Piper 2007). Die Quelle dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung ist initial eine Entleerung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher des Endoplasmatischen Retikulums (ER), woran sich  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom von Extrazellulär durch SOC (*store-operated channels*) anschließt. Für diesen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom aus dem ER wird die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) verantwortlich gemacht (Peters und Piper 2007). Die aktivierte PLC führt durch Hydrolyse von Phosphatidyl-inositol-Bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) zur Entstehung von Inositol-Trisphosphat ( $\text{IP}_3$ ), welches an  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren des ER bindet und dort den  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom einleitet. Der daraus resultierende zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg wird allgemein als Auslöser für verschiedene zellschädigende Mechanismen diskutiert, zu denen u. a. die verstärkte interzelluläre Lückenbildung gehört (Curry 1992, Furchgott et al. 1993, Noll et al. 1995, Schäfer et al. 2003). Diese führt zur Erhöhung der endothelialen Permeabilität und wird für die Entstehung von Ödemen verantwortlich gemacht.

In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass in der Reperfusion Radikale entstehen und dass diese Radikale eine Ursache der  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung sind. In den Untersuchungen konnte Komplex II der mitochondrialen Atmungskette dabei als ausschlaggebende Ursache der Radikalentstehung eingegrenzt werden, denn durch Inhibition des Komplexes II der mitochondrialen Atmungskette und durch die Gabe von Radikalfängern konnte eine Reduktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung hervorgerufen werden. Dabei erwies sich der mitochondrienspezifische Radikalfänger MitoQ als sehr wirkungsvoll. Die Ergebnisse deuten

## Diskussion

ferner darauf hin, dass die entstandenen Radikale über eine src-Kinasen-vermittelte Aktivierung der PLC $\gamma$ 1 den Signalweg bis zur Ca<sup>2+</sup>-Ausschüttung aus dem ER in Gang setzen.

Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit deutlich, dass die Entstehung interzellulärer Lücken durch Applikation des Radikalfängers MitoQ und des Inhibitors des Komplexes II der Atmungskette TTFA ebenfalls reduziert werden konnte, was auf eine Kausalkette von mitochondrialer Radikalbildung bis zur Störung der endothelialen Barriere hinweist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden zum Teil durch fluoreszenzoptische Messungen unter Einsatz verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe gewonnen, die für die optische Darstellung verschiedener Zellsignale entwickelt worden sind.

In der vorliegenden Studie wurde die Radikalentstehung mit dem radikalsensitiven Farbstoff H<sub>2</sub>DCFDA untersucht, der hauptsächlich H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> optisch messbar macht (Keston und Brandt 1965). H<sub>2</sub>DCFDA stellt die am häufigsten eingesetzte Technik zur Bestimmung des Redox-Status der Zelle dar, da es Veränderungen extrem sensitiv anzeigt und eine kontinuierliche Beobachtung der Radikalproduktion in der Zelle ermöglicht (Eruslanov und Kusmartsev 2010). Der Einsatz dieses Farbstoffes zur Radikalmessung ist allerdings nicht ganz unumstritten, da H<sub>2</sub>DCFDA z. B. bei zu starker Lichtexposition selbst Radikale generieren und damit zu einer Fehlinterpretation der Messdaten führen kann (LeBel et al. 1992, Rota et al. 1999). Bei den eigenen Untersuchungen wurden deshalb in Vorversuchen verschiedene Bedingungen wie Belichtungsdauer, Belichtungsintervall, Lichtintensität und normoxischer pH-Wert variiert, um die Zuverlässigkeit der Messergebnisse der über 2 h dauernden Experimente mit H<sub>2</sub>DCFDA in den Endothelzellen zu evaluieren. Da die gewählten Messbedingungen zu keinem Anstieg der DCF-Fluoreszenz führten (Abb. 2.6, S. 30), kann in der vorliegenden Arbeit davon ausgegangen werden, dass es sich bei den erhobenen Daten nicht um Artefakte handelt. Untermauert werden diese Ergebnisse dadurch, dass die gemessene DCF-Fluoreszenz in der Reperfusion nicht nur durch Radikalfänger, sondern auch durch Inhibitoren spezifischer zellulärer Signalwege wie TTFA und Antimycin A inhibiert wurden (Abb. 8, S. 46). Dies wäre bei einer durch H<sub>2</sub>DCFDA selbst induzierten Radikalproduktion nicht zu erwarten. Zusätzlich werden die mit dem speziellen H<sub>2</sub>DCFDA-Messprotokoll erhobenen Daten dieser Arbeit dadurch unterstützt, dass der mitochondrienspezifische Radikalfänger MitoQ zu einer signifikanten Reduktion im Fluoreszenzsignal geführt hat, was bei einer unspezifischen Radikalproduktion des Farbstoffes selbst ebenfalls nicht zu erwarten wäre (Abb. 6, S. 44). Dennoch muss man

## Diskussion

kritisch anmerken, dass, obwohl der Farbstoff hauptsächlich  $\text{H}_2\text{O}_2$  nachweist, eine genaue Aussage über die gemessene Radikalspezies in den Untersuchungen mit  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  nicht möglich ist. Der Grund dafür ist, dass auch Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) als Produkt bei gleichzeitigem Auftreten von Nitritoxid ( $\text{NO}$ ) und Superoxid ( $\text{O}_2^-$ ) DCF oxidieren kann (Kooy et al. 1997, Wang und Joseph 1999). Auch  $\text{NO}$  allein kann durch Oxidation einen Anstieg des DCF-Signals bewirken. Allerdings sind dafür sehr hohe Konzentrationen nötig (Wang und Joseph 1999). Deshalb wären hier weitere Studien sinnvoll, um eine genaue Differenzierung aller möglicherweise vorhanden Entstehungswege von ROS bis zum Endprodukt  $\text{H}_2\text{O}_2$  genauer zu analysieren.

Für die ATP-Messungen wurde der Farbstoff Mag-Fura-2 eingesetzt. Dieser ermöglicht eine indirekte Messung des ATP-Spiegels der Zelle, indem er den freien  $\text{Mg}^{2+}$ -Gehalt der Zelle anzeigt. Bei ATP-Hydrolyse wird das ansonsten mit ATP komplexierte  $\text{Mg}^{2+}$  freigesetzt und dadurch messbar (Bowers et al. 1992). Im Vergleich zu anderen Methoden ermöglicht der Farbstoff darüber hinaus eine Beobachtung des ATP-Spiegels in intakten Zellen über einen längeren Zeitraum, auch unter sauerstofffreien Bedingungen. Mag-Fura-2-Veränderungen korrelieren außerdem unter bestimmten Bedingungen eng mit den ATP-Werten in Luziferase-Assays (Bernstein et al. 2006).

Auch über diese indirekte Form der ATP-Bestimmung muss man methodenkritische Anmerkungen machen. Mag-Fura-2 ist nämlich nicht ausschließlich zur  $\text{Mg}^{2+}$ -Messung geeignet, sondern zeigt auch  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen über  $5 \mu\text{M}$  an (Hofer und Machen 1993). Die Sensitivität des Farbstoffes für  $\text{Mg}^{2+}$  ist jedoch um einiges höher als für  $\text{Ca}^{2+}$ , so dass die nötige  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration innerhalb der Endothelzellen in den vorliegenden Versuchen nicht ausreicht, um eine deutliche Veränderung des Signales zu bewirken.

Um die Aussagekraft der gewonnenen Daten zu unterstreichen, wurden Kontrollexperimente durchgeführt. Bei diesen Experimenten wurden Substanzen eingesetzt, deren Wirkungen bekannt sind und von denen bestimmte Veränderungen des Fluoreszenzsignals erwartet werden konnten. So wurden in den ATP- und  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen z. B. auch DTPP, das inaktive Analogon von MitoQ getestet, welches im Vergleich zur aktiven Substanz keine Veränderung des Signals bewirkte (Abb. 7, 13, S. 45, 53). 2-DG diente bei der Radikalmessung ebenfalls als Kontrollexperiment und bestätigte, dass eine Unterbrechung des Substratflusses und damit der Radikalentstehung gleichzeitig zu reduzierter Fluoreszenz führt. Einzelne Ergebnisse sind zwar durch die Schwächen der jeweiligen Methode angreifbar, es ergibt sich jedoch durch

Bezug vieler Ergebnisse verschiedener Methoden zueinander ein durchgängiges und durchaus belastbares Gesamtergebnis.

### **4.1 Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) mitochondrialer Herkunft während der Reperfusion**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass koronare mikrovaskuläre Endothelzellen aus dem Rattenherzen mit Beginn der simulierten Reperfusion ROS produzieren (Abb. 2, S. 39). Dies stimmt mit einer Studie an HUVEC (humanen Endothelzellen aus Umbilikalvenen) und humanen koronaren Endothelzellen überein, die nach 4 h Hypoxie, gefolgt von 18 h Reperfusion ebenfalls Radikalproduktion nachweisen konnte (Dhar-Mascareno et al. 2005). In der zitierten Studie wird jedoch nicht geklärt, an welcher Stelle die ROS generiert werden. Allerdings wurde gezeigt, dass die mit Vitamin C reperfundierten Endothelzellen weniger Apoptosen aufwiesen (Dhar-Mascareno et al. 2005). Auch eine genaue Differenzierung zwischen der Radikalproduktion während der Ischämie und der Reperfusion, so wie es bei den Experimenten der vorliegenden Studie möglich war, erfolgte in der genannten Studie nicht. Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit an EC der Ratte gezeigt werden, dass die Radikalproduktion insbesondere in der Reperfusion stattfindet und dass die entstandenen ROS mit großer Wahrscheinlichkeit aus den Mitochondrien stammen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zu der in-vitro gemessenen Radikalentstehung bestätigen Literaturdaten, die in-vivo bei I/R-Untersuchungen an Ratten- und Hundeherzen an narkotisierten Tieren erhoben wurden (Laude et al. 2001, Bolli 1988). Allerdings wurden auch bei den genannten In-vivo-Untersuchungen keine genauen Aussagen über die Lokalisation der Radikalentstehung gemacht. Jedoch bewirkte im Fall der In-vivo-Experimente an der Ratte ein unspezifischer Radikalfänger eine Reduktion der auftretenden Endothelschäden in der Reperfusion (Kaeffer et al. 1997). Darüber hinaus konnte bei einem koronaren Verschlussmodell am postischämischen Myokard des Hundes in einer anderen Untersuchung mit Hilfe der EPR (Elektron-paramagnetische Resonanz) die Entstehung von Radikalen im postischämischen Myokard gemessen werden, ohne jedoch eine Lokalisation zuzulassen (Bolli 1988). Diese In-vivo-Studien bestätigen die In-vivo-Relevanz der in dieser Studie erhobenen In-vitro-Daten.

Schon 1990 stellten Arroyo und Mitarbeiter in Experimenten an bovinen arteriellen Endothelzellen der Lunge fest, dass diese im Verlauf einer 60-minütigen Reperfusion nach

## Diskussion

einer 45-minütigen Phase der Anoxie Superoxid-Anionen ( $O_2^-$ ) produzieren, die daraufhin zu Zellschädigungen führen. Dabei wurde vermutet, dass einerseits die endotheliale Xanthin-Oxidase ROS generiert, andererseits aber auch eine bis dahin nicht identifizierte externe Radikalproduktion existiert (Arroyo et al. 1990). Es wird beschrieben, dass in Gefäßen während der postischämischen Reperfusion eine Entzündungsreaktion stattfindet (Gourdin et al. 2009), die durch Aktivierung des Komplementsystems sowie polymorphkerniger Neutrophiler entsteht und bei der es zu einer massiven Produktion freier Radikale kommen kann. In dieser Veröffentlichung wird die NADPH-Oxidase der neutrophilen Granulozyten und die endotheliale Xanthin-Oxidase als die wichtigsten Quellen der Superoxid ( $O_2^-$ )-Entstehung angesehen, wobei  $O_2^-$  durch die Superoxid-Dismutase dann in  $H_2O_2$  umgewandelt wird, woraus im Anschluss Hydroxyl-Radikale ( $\bullet OH$ ) entstehen. Dieser oxidative Stress soll dann u. a. für die Apoptosen im Bereich der Gefäße und des Parenchyms verantwortlich sein (Gourdin et al. 2009). Untersuchungen an HUVEC identifizierten als Quelle der Radikalentstehung in der Reoxygenation die endotheliale Xanthin-Oxidase, wobei die Aktivität der endothelialen NADPH-Oxidase nach einer achtstündigen Hypoxie reduziert war (Sohn et al. 2003).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen verschiedener Veröffentlichungen, welche die Radikalentstehung in-vitro der neutrophilen oder endothelialen NADPH-Oxidase oder der Xanthin-Oxidase zuordnen (Arroyo et al. 1990, Walder et al. 1997, Sohn et al. 2003, Gourdin et al. 2009), wurden in der hier vorgelegten Arbeit die endothelialen Mitochondrien als Ursprung der ROS-Produktion identifiziert, deren Radikalproduktion durch den mitochondrienspezifischen Radikalfänger MitoQ signifikant reduziert werden konnte (Abb. 6, S. 44). In den durchgeführten Untersuchungen wurde durch Inhibition der zellulären NADPH-Oxidase keine Veränderung der Radikalproduktion festgestellt, was darauf hindeutet, dass die endotheliale NADPH-Oxidase nicht der Ort der Radikalentstehung ist. Eine Beteiligung der neutrophilen NADPH-Oxidase kann in dem Versuchsaufbau ausgeschlossen werden, da in dieser Studie nur isolierte Endothelzellen untersucht wurden. Im Fokus der durchgeführten Experimente stand die Eingrenzung der möglichen Ursache der Radikalentstehung während der simulierten Reperfusion. Da MitoQ einen eindeutigen Hinweis auf die Mitochondrien als Radikalquellen gab, stand die Xanthin-Oxidase nicht im Mittelpunkt der Untersuchungen. Die Bedeutung der Mitochondrien als wichtige therapeutische Ansatzpunkte wird zusätzlich dadurch unterstrichen, dass in einer anderen Studie mit Ratten durch zweiwöchige Verabreichung des mitochondrienspezifischen Radikalfängers MitoQ eine Reduktion der Zellschäden nach I/R-Experimenten beobachtet werden konnte (Adlam et al. 2005).

### **4.2 Entstehung von ROS in der mitochondrialen Atmungskette in Komplex II und III, nicht Komplex I**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit identifizierten Komplex II und Komplex III der mitochondrialen Atmungskette als Ort der Radikalproduktion in der Reperfusion kardialer Endothelzellen. Komplex II wird in der Literatur eher selten als mögliche Quelle der ROS-Produktion in Betracht gezogen (Jezek und Hlavata 2005). Demgegenüber wird Komplex III unter normoxen Bedingungen bei isolierten Mitochondrien boviner aortaler Endothelzellen und isolierten Mitochondrien des Rattenherzens sehr wohl als Quelle der ROS genannt (O'Malley et al. 2006, Chen et al. 2003).

Studien an isolierten Mitochondrien boviner Endothelzellen der Aorta haben gezeigt, dass unter normoxen Bedingungen Komplex I der Atmungskette einer der wichtigsten Orte der Radikalentstehung ist (Adam-Vizi und Chinopoulos 2006, O'Malley et al. 2006). Zu berücksichtigen ist, dass bei den genannten Literaturstellen diese größtenteils an isolierten Mitochondrien unter normoxen Bedingungen durchgeführt wurden und damit nicht prinzipiell auf Daten übertragbar sind, die wie in der vorliegenden Studie an intakten Zellen und zudem während Reperfusionsbedingungen untersucht wurden. In-vivo-Untersuchungen am reperfundierten Kaninchenherzen ließen zwar einen Zusammenhang zwischen Radikalproduktion und dem Elektronenfluss innerhalb der mitochondrialen Atmungskette vermuten, jedoch ohne diesen Zusammenhang direkt zu untersuchen (Ambrosio et al. 1993). In der genannten Studie wurde zwar auch, wie an den bovinen Endothelzellen, Komplex I als mögliche Quelle angenommen, durch die Untersuchungen am Gesamtorgan war aber keine Zuordnung zum generierenden Zelltyp möglich. Es ist zu vermuten, dass hier hauptsächlich die Reaktion der Kardiomyozyten gemessen wurde, denn Studien an isolierten Kardiomyozyten zeigen, dass die NADH-Dehydrogenase des Komplexes I eine wichtige Radikalquelle bei diesem Zelltyp ist (Ide et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit führten Inhibitoren des Komplexes I zu keiner Veränderung des DCF-Signals koronarer mikrovaskulärer Endothelzellen in der Reperfusion (Abb. 8, S. 46). Dies lässt darauf schließen, dass dieser Teil der Atmungskette bei Endothelzellen in der Reperfusion nicht der Ort der Radikalentstehung ist und dass sich dieser Zelltyp anders als Kardiomyozyten verhält. In Endothelzellen hingegen konnte in der vorliegenden Studie die Hemmung der Komplexe II und III der mitochondrialen Atmungskette die Radikalentstehung in der Reperfusion signifikant reduzieren (Abb. 8, S. 46). Untermuert werden die eigenen Daten dadurch, dass in der einzigen vergleichbaren in der Literatur zugänglichen Studie an intakten Endothelzellen

## Diskussion

(HUVEC) in der Reoxygenation ebenfalls eine Reduktion der Radikalentstehung durch Inhibition des Komplexes III festgestellt wurde (Therade-Matharan et al. 2004). In der genannten Studie zeigte allerdings die Inhibition der Komplexe I und II keine Effekte, weshalb diese Komplexe nicht als Ort der Radikalentstehung angesehen wurden (Therade-Matharan et al. 2004). Dieser Unterschied hinsichtlich der Komplexe I und II zu den eigenen Daten könnte mehrere Ursachen haben. Erstens liegen methodische Unterschiede vor. So wurde in der genannten Studie eine zweistündige Hypoxie bei einem Sauerstoffpartialdruck von 20 mmHg durchgeführt. Zweitens wurde in der HUVEC-Studie keine Azidose simuliert, die aber in-vivo bei einer Ischämie auftritt. Drittens wurden in der Studie von Therade-Matharan keine Primärzellen, sondern Passagen eingesetzt. Es ist seit längerem bekannt, dass sich die Zellcharakteristika bei Passagen im Vergleich zu primären Zellen z. T. erheblich in der Zellkultur verändern (Gimbrone et al. 1974). Die Endothelzellen in der vorliegenden Arbeit hingegen entstammen direkt der Primärkultur und entsprechen daher eher In-vivo-Bedingungen.

Komplex II als mögliche Quelle der ROS-Produktion wird eher selten beschrieben (Jezek und Hlavata 2005). So gibt es Untersuchungen an Endothelzellen muriner Lungengefäße, bei denen der mitochondriale Komplex II der Atmungskette unter hypoxischen Bedingungen ROS generiert (Paddenberg et al. 2003). Bisher gibt es in der zugänglichen Literatur allerdings keine Berichte über die Radikalentstehung im zweiten Komplex der Atmungskette während der Reoxygenation. In der vorliegenden Arbeit wird deshalb erstmals der Hinweis gegeben, dass Komplex II der mitochondrialen Atmungskette in koronaren mikrovaskulären Endothelzellen der Ratte als hauptsächliche Ursache der gemessenen Radikalentstehung während der simulierten Reperfusion angesehen werden kann.

Die Bedeutung der in der vorliegenden Studie gewonnenen Erkenntnisse ist bisher nicht abschließend geklärt. Es gibt zwei Theorien über die Beteiligung der Succinat-Q-Oxidoreduktase (Komplex II) an einer Radikalentstehung innerhalb der Zelle. Einerseits existiert die Vermutung, dass es unter bestimmten Voraussetzungen zu einem rückwärts laufenden Elektronenfluss von reduziertem Ubiquinol auf Komplex I kommen kann, der innerhalb des ersten Komplexes zu einem hohen Superoxidaufkommen führt und von Komplex II aufrecht erhalten wird (Muller et al. 2008). Andererseits existiert die Hypothese, dass Radikale in der postischämischen Phase durch eine Verbindung zwischen Komplex II und III im Succinat-Cytochrom-C-Reduktase-Komplex über Ubisemiquinon entstehen und durch Inhibition des Komplexes II reduziert werden (Miki et al. 1992, Liu et al. 2010). Beide

## Diskussion

Theorien werden dadurch unterstützt, dass Gabe von Succinat zu isolierten Mitochondrien des Rattenherzens in der Reperfusion einen Anstieg der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion bewirkt, da Succinat als Substrat des Komplexes II zum Anstieg der Aktivität führt (Turrens et al. 1985, Petrosillo et al. 2003). Um genau zu klären, welche der beiden Vermutungen zutrifft, wären weitere Untersuchungen notwendig, bei denen die Aktivität des Komplexes II während der Reperfusion z. B. durch Zugabe des Substrates Succinat gesteigert wird. Die Untersuchungen mit Succinat gestalten sich an ganzen Endothelzellen allerdings problematisch, da Succinat vermutlich nicht ohne Weiteres in die Zelle gelangt. In der Literatur werden für Endothelzellen keine Transporter für Succinat beschrieben, wie es z. B. bei Bakterien der Fall ist (Gutowski et al. 1975). Ziel weiterer Untersuchungen könnte außerdem sein, die Quelle der Sauerstoffradikale innerhalb des Enzymkomplexes der Succinat-Q-Oxidoreduktase genauer zu ermitteln. In einer Studie an isolierten Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae* konnte festgestellt werden, dass die  $\text{O}_2^-$ -Entstehung hauptsächlich bei Blockade der Elektronenübertragung von Komplex II auf Ubichinon stattfindet, wenn gleichzeitig die Oxidation von Succinat zu Fumarat an anderer Stelle im Enzymkomplex weiterhin ablaufen kann (Schwall et al. 2012). Dabei wären Untersuchungen mit dem Substrat Malonat im Vergleich zu TTFA sinnvoll, denn die beiden Hemmstoffe besitzen verschiedene Ansatzpunkte innerhalb des Komplexes II. Malonat inhibiert die Oxidation von Succinat zu Fumarat, während TTFA den Elektronentransfer auf Ubichinon hemmt (Schwall et al. 2012). Malonat bereitet bei Untersuchungen an intakten Endothelzellen jedoch ähnliche Probleme wie Succinat, weshalb dieser Stoff in Studien bisher nur an isolierten Mitochondrien eingesetzt wurde. TTFA führte in der zitierten Studie an isolierten Mitochondrien durch die beschriebene Wirkungsweise zu vermehrter Radikalproduktion. Dass sich die Zellorganellen der vorliegenden Arbeit noch in einer intakten Endothelzelle befanden, könnte die Ursache für diese andere Wirkungsweise von TTFA im Vergleich zu der zitierten Studie sein.

Über Antimycin A, wie es sowohl in der genannten Studie an HUVEC als auch in der vorliegenden Arbeit zur Inhibition des Komplexes III der mitochondrialen Atmungskette eingesetzt wurde, ist bekannt, dass die Substanz u. a. durch erhöhte Produktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  selbst Zellschäden oder den Zelltod induzieren kann (Chen 2003, Piskernik et al. 2008). In der vorliegenden Arbeit und auch in anderen Untersuchungen konnte dies hingegen nicht beobachtet werden (Therade-Matharan et al. 2004, Paradies et al. 2000). Deshalb scheint die Radikalentstehung bei Applikation von Antimycin A nicht generell aufzutreten, sondern hängt vermutlich auch von den vorhandenen Substraten ab (Liu et al. 2010).

### 4.3 Radikale und $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung in der simulierten Reperfusion

In dieser Studie stieg das zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$  in der Reperfusion weiter an, ähnlich wie es schon in früheren Veröffentlichungen beschrieben wurde (Allshire et al. 1987, Ladilov et al. 2000, Schäfer et al. 2003, Peters und Piper 2007). Bei Kardiomyozyten üben die NHE- und NCX-Austauscher großen Einfluss auf den cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel während der Reperfusion aus (Schäfer et al. 2000). Bei Kardiomyozyten kann deshalb der zusätzliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg in der Anfangsphase der Reperfusion durch eine fortgeführte Azidose verringert werden (Ladilov et al. 1995). Im Gegensatz dazu spielt dieser Mechanismus bei koronaren mikrovaskulären Endothelzellen der Ratte keine Rolle (Peters und Piper 2007). Bei kardialen Endothelzellen beruht dieser Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes einerseits auf einer Aktivierung der Phospholipase C (PLC), die über  $\text{IP}_3$  die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Endoplasmatischen Retikulum induziert (Peters und Piper 2007). Andererseits wird hierdurch der Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  durch *store-operated channels* (SOC) getriggert (Peters und Piper 2007). In der vorliegenden Studie wurde der Mechanismus untersucht, der die Aktivierung der PLC verursacht. Radikalfänger wie Trolox, Mercaptopropionylglycin (MPG) und N-Acetylcystein (NAC) konnten in der simulierten Reperfusion den  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg verhindern (Abb. 5, S. 42). Untermauert wurden diese Ergebnisse dadurch, dass auch der Einsatz des mitochondrienspezifischen Radikalfängers MitoQ im Gegensatz zu seinem inaktiven Analogon DTPP in den Fura-2-Messungen eine weitere  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung verhinderte (Abb. 7, S. 45). Damit konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass bei kardialen Endothelzellen in der Reperfusion Radikale entstehen, die aus den Mitochondrien stammen und die den  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg mitverursachen.

Ein Zusammenhang zwischen Radikalentstehung und  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg ist in der Literatur bei verschiedenen Zellen beschrieben. Beispielsweise zeigen Untersuchungen an kortikalen Astrozyten der Ratte, dass die Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  über eine Aktivierung der PLC zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg führt (Hong et al. 2006). Außerdem ist in der Literatur für verschiedene Zelltypen, z. B. in Nierenzellen (Ueda et al. 1992), Zellen des Myometriums (Masumoto et al. 1990) und in Zellen der Ovarien (Cantoni et al. 1989) beschrieben, dass oxidativer Stress das  $\text{Ca}^{2+}$ -Gleichgewicht verschieben kann und dass Radikalbildung und  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg parallel auftreten. Unter normoxen Bedingungen wird auch bei koronaren porzinen Endothelzellen und HUVEC durch die Applikation von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{O}_2^-$  ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg beschrieben (Kimura et al. 1992, Dreher und Junod 1995). Dabei wird vermutet, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase durch die Interaktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit  $\text{O}_2^-$  und wahrscheinlich durch die Bildung von Hydroxyl-

## Diskussion

Radikalen ( $\bullet\text{OH}$ ) beeinflusst wird (Dreher und Junod 1995). Allerdings ist ein Zusammenhang zwischen mitochondrialer Radikalentstehung und  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung unter Bedingungen der Reperfusion bisher in der Literatur nicht zu finden. Dies konnte mit der vorliegenden Studie gezeigt werden.

Bei der Verwendung von Radikalfängern ist immer zu berücksichtigen, dass auch unspezifische Reaktionen auftreten können (Bogdanova et al. 2006). Beispielsweise werden für den Radikalfänger Tiron unspezifische Effekte auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel beschrieben (Gosh et al. 2002), da Tiron nicht durch Radikalbindung den  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel senkt, sondern durch Chelatbildung selbst  $\text{Ca}^{2+}$  binden kann und damit unspezifische Eigeneffekte hat, die unabhängig von einer Radikalbindung auftreten. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb verschiedene antioxidative Substanzen eingesetzt, um eine Fehlinterpretation der Ergebnisse durch unspezifische Nebeneffekte der Radikalfänger auf den Messparameter  $\text{Ca}^{2+}$  zu umgehen. Eingesetzt wurden die Radikalfänger Trolox, Mercaptopropionylglycin (MPG) und N-Acetylcystein (NAC). Alle drei Radikalfänger setzen an unterschiedlichen Mechanismen an, Radikale in der Zelle zu binden (Kelly 1998, Abdo et al. 2003, Wongmekiat et al. 2007). Neben diesen drei Radikalfängern konnten mit dem mitochondrienspezifischen Radikalfänger MitoQ übereinstimmende Ergebnisse erzielt werden, was bestätigt, dass die gemessenen Effekte auf das  $\text{Ca}^{2+}$  tatsächlich aufgrund der Entstehung von Radikalen hervorgerufen werden. Ein ähnlicher Mechanismus wurde bei Untersuchungen an Kardiomyozyten gezeigt, bei denen durch den Einsatz von NAC und MPG in Ischämie-/Reperfusionsexperimenten ein abgemilderter Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels bewirkt werden konnte, was eine Verbesserung der Herzfunktion zur Folge hatte (Saini-Chohan und Dhalla 2009).

Außerdem konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Hemmung des Komplexes II der Atmungskette mit der Substanz TTFA nicht nur die Radikalentstehung senkt, sondern auch zu einem reduzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg führt (Abb. 7, S. 45). Antimycin A, das zwar die Radikalentstehung in den  $\text{H}_2\text{DCFDA}$ -Experimenten reduzierte, hatte hier einen eher negativen Effekt (Abb. 15, S. 55). Es führte bei Applikation während der simulierten Reperfusion zu einem zusätzlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg. Der zusätzliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg könnte darauf hindeuten, dass Antimycin A zu einer Zellschädigung geführt hat, wie es auch an isolierten Mitochondrien beobachtet werden konnte (Piskernik et al. 2008). In der Literatur gibt es Hinweise, dass der durch Antimycin A induzierte Zelltod in einer humanen Zelllinie nicht durch vermehrte Produktion von Radikalen erklärt werden kann, sondern durch Anhäufung

## Diskussion

von NO, verstärkter Aktivierung der Poly (ADP-ribose)-Polymerase (PARP) und Translokation des Apoptose-induzierenden Faktors (AIF) ausgelöst wird (Ogita et al. 2009). Die Inhibition der NADPH-Oxidase durch Apocynin führte in dieser Studie zu keiner Beeinflussung des Fura-Signals (Abb. 7, S. 45). Dies unterstützt die Vermutung, dass die NADPH-Oxidase bei der Radikalentstehung unter diesen Bedingungen keine wichtige Rolle spielt. An HUVEC konnte die Aktivität und damit die  $O_2^-$ -Produktion der intrazellulären Xanthin-Oxidase durch eine Fortführung der Azidose in der Reperfusion reduziert werden. Dabei zeigte sich auch ein geringerer Anstieg des intrazellulären  $Ca^{2+}$  (Geeraerts et al. 1991). In der vorliegenden Studie wurden keine weiteren Untersuchungen in Bezug auf die Xanthin-Oxidase durchgeführt. Es besteht trotzdem die Möglichkeit, dass diese einen gewissen Anteil an der Radikalbildung in der Reperfusion der Endothelzellen hat, was in weiteren Studien untersucht werden könnte. Allerdings führte eine fortgeführte Azidose in der Reperfusion in den Fura-Messungen der vorliegenden Arbeit und auch in früheren Studien zu keiner signifikanten Reduktion des  $Ca^{2+}$ -Anstieges (Ladilov et al. 2000), weshalb davon ausgegangen werden kann, dass sich koronare Endothelzellen dabei von HUVEC unterscheiden.

### 4.4 Aktivierung der PLC durch Radikale

Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der PLC $\gamma$ 1-vermittelte Signalweg der  $Ca^{2+}$ -Freisetzung durch die Einwirkung von Radikalen während der simulierten Reperfusion in Gang gesetzt wird und dass Kinasen der src-Familie an diesem Prozess beteiligt sind.

In koronaren mikrovaskulären Endothelzellen findet während simulierter Reperfusion eine  $Ca^{2+}$ -Ausschüttung aus dem Endoplasmatischen Retikulum über IP<sub>3</sub>-abhängige Kanäle statt (Peters und Piper 2007). Dieser Prozess wird von einer aktivierten PLC $\gamma$ 1 vermittelt, die dann den Signalweg bis zur  $Ca^{2+}$ -Ausschüttung in Gang setzt (Berridge 1993, Munaron 2006). Von Untersuchungen an kortikalen Astrozyten ist bereits bekannt, dass es durch die Einwirkung von Radikalen zur Aktivierung der PLC und zu vermehrter  $Ca^{2+}$ -Freisetzung kommt (Hong et al. 2006).

Um den Effekt von Radikalen auf die PLC der Endothelzellen in Westernblots zu untersuchen, wurde das organische Peroxid t-BHP (*tert*-Butyl-Hydroperoxid) verwendet, da an murinen embryonalen Fibroblasten durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine Phosphorylierung herbeigeführt

## Diskussion

werden konnte und t-BHP durch die funktionelle Gruppe des Peroxids eine vergleichbare oxidative Funktion besitzt (Keck 1996, Wang et al. 2001, Dumont et al. 2000, 2002). Auch an Kardiomyozyten der Ratte und an humanen glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) wurde die Wirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die Phosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 untersucht (Wang et al. 2001, Mangat et al. 2006, Bai et al. 2002, Gonzales-Pacheco et al. 2002). Dabei schwankt die eingesetzte Konzentration von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zwischen 50  $\mu$ M bei Kardiomyozyten und 1 mM bei Fibroblasten (Mangat et al. 2006, Bai et al. 2002). Der Grund für die hohen Schwankungen könnte einerseits die Empfindlichkeit der unterschiedlichen Zelltypen sein, andererseits aber auch, ob der Zellkultur Serum zugesetzt worden ist oder nicht. So wurden z. B. bei Kardiomyozyten ab einer Konzentration von 100  $\mu$ M Zellschäden beobachtet (Mangat et al. 2006), während diese Konzentration bei anderen Zelltypen noch keine signifikante Zunahme der PLC-Phosphorylierung bewirken konnte. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb eine Dosis-Wirkungskurve für t-BHP angefertigt, bei der eine optimale Konzentration des t-BHP von 100–150  $\mu$ M für Experimente an koronaren mikrovaskulären Endothelzellen ermittelt wurde (Abb. 17, S. 58).

In der vorliegenden Studie wird deutlich, dass die PLC $\gamma$ 1 koronarer mikrovaskulärer Endothelzellen durch 20-minütige t-BHP-Applikation tatsächlich aktivierbar ist (Abb. 18, S. 59), wie es bisher nur an anderen Zelltypen beschrieben wurde (Wang et al. 2001). Durch die Zunahme der PLC $\gamma$ 1-Phosphorylierung nach 5-minütiger Reoxygenation und da sich diese Phosphorylierung durch die Radikalfänger MPG, NAC und Trolox inhibieren ließ (Abb. 19, S. 60), wird in der vorliegenden Studie erstmals gezeigt, dass koronare mikrovaskuläre Endothelzellen in der Reoxygenation Radikale produzieren, die eine Aktivierung der PLC $\gamma$ 1 bewirken. Dieser Effekt wurde auch an kortikalen Astrozyten der Ratte durch den Einfluss von NAC beobachtet (Hong et al. 2006). Außerdem kann dadurch die Theorie bestätigt werden, dass in Endothelzellen die Radikalentstehung schon innerhalb der ersten Minuten der Reoxygenation stattfindet (Hashimoto et al. 1994).

### **4.5 Bedeutung der src-Kinasen**

In der Literatur ist bekannt, dass Protein-Tyrosin-Kinasen mit der PLC $\gamma$  assoziieren und deren Phosphorylierung steuern (Ullrich und Schlessinger 1990, Cantley et al. 1991, Nakanashi et al. 1993). Eine Studie an Fibroblasten belegt außerdem, dass src-Kinasen bei Einwirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Phosphorylierung von PLC $\gamma$ 1 in Gang setzen (Wang et al. 2001).

## Diskussion

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit reduzierten zwei src-Kinase-Inhibitoren (PP1, SU6656) die Phosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 koronarer mikrovaskulärer Endothelzellen in der Reoxygenation (Abb. 18, S. 59). Durch dieses Ergebnis wird deshalb erstmals an diesem Zelltyp eine Verbindung zwischen src-Kinasen und der Aktivierung der PLC $\gamma$ 1 in der Reoxygenation gezeigt.

Bei den Ca<sup>2+</sup>-Messungen der vorliegenden Arbeit wird darüber hinaus deutlich, dass auch die Ca<sup>2+</sup>-Überladung der Endothelzellen in der Reperfusion von src-Kinasen abhängig ist, da diese durch src-Kinase-Inhibitoren (PP1, PP2, SU6656) deutlich reduziert wurde (Abb. 16, S. 57).

Src-Kinasen scheinen also die Vermittler zwischen ROS und der PLC $\gamma$ 1 zu sein, welche dann in aktivierter Form den zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Anstieg bewirkt.

ROS können jedoch neben dem bereits beschriebenen Signalweg über src-Kinasen bis zur Ca<sup>2+</sup>-Ausschüttung noch andere Zellfunktionen in Gang setzen. So wurde in einer Studie festgestellt, dass die PLC $\gamma$ 1 nach oxidativem Stress eine wichtige Aufgabe hinsichtlich der Regulierung der Überlebensstrategie der Zelle übernimmt (Wang et al. 2001). Es ist außerdem bekannt, dass src-Kinasen in Endothelzellen eine vermittelnde Rolle zwischen VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und der Aktivierung der G6PD (Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase) einnehmen (Pan et al. 2009). Die G6PD liefert z. B. Baustoffe für die Biosynthese von Nukleinsäuren (Jain et al. 2003). Dadurch könnten das Wachstum und die Teilung der Zellen begünstigt werden. So führt Ischämie/Reperfusion z. B. auch an der Retina der Ratte über den Tyrosin-Kinase-Signalweg zu erhöhter Proliferation (Hayashi et al. 1996). Es wäre also möglich, dass Radikale über die src-Kinasen-gesteuerte PLC $\gamma$ 1-Aktivierung einen zellulären Mechanismus in Gang setzen, der das Überleben der Zellen sichern soll, indem er Zellteilung induziert.

### **4.6 Einfluss von Ischämie-/Reperfusionsexperimenten auf den Energiestatus der Endothelzellen**

In den ATP-Messungen der vorliegenden Arbeit wird deutlich, dass die postischämische Reperfusion nach einer anfänglichen Erholungsphase zu starkem ATP-Verlust führt, obwohl die Zellen wieder mit Glukose versorgt werden.

Obwohl von Endothelzellen bekannt ist, dass sie ihren Energiegehalt bei Sauerstoffmangel relativ lange durch anaeroben Abbau von Glukose in der Glykolyse decken können, kam es in der Anoxie der vorliegenden Studie zu einem ATP-Verlust (Abb. 12, S. 51) (Mertens et al.

## Diskussion

1990, Watanabe et al. 1991). Eine Erklärung dafür könnte die zunehmende Azidifizierung durch Anhäufung von Laktat sein, die zu einer Hemmung der Glykolyse und damit zu ATP-Mangel führt (Mertens et al. 1990, Watanabe et al. 1991, Culic et al 1997).

Mit Beginn der Reperfusion folgte zwar eine kurze, fast vollständige Erholung des ATP-Spiegels, danach sank dieser jedoch zunehmend wieder ab (Abb. 12, S. 51). Diese Beobachtung zeigt, dass bei Endothelzellen trotz der umfassenden Energieversorgung über Glykolyse und den Hexose-Monophosphatweg in der Reperfusion eine Art von *Paradox* wie bei Kardiomyozyten existiert (Buderus et al. 1989, Krützfeldt et al. 1990, Culic et al. 1997).

Eine Ursache des ATP-Verlustes in der Reperfusion könnte die Erhöhung der Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran durch die Öffnung eines Megakanals (mPTP) sein (Lemasters et al. 1997, Ly et al. 2003). Da die erhöhte Permeabilität zur Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials führt, findet eine Entkopplung der ATP-Produktion in der Atmungskette statt, was im weiteren Verlauf zu ATP-Hydrolyse durch die  $F_1F_0$ -ATPase führt (Nieminen et al. 1994, Lemasters et al. 1997). Allerdings wird als Ursache für die Öffnung des Megakanals in der Studie an Hepatozyten hauptsächlich die Erhöhung des pH-Wertes in der Reperfusion gesehen, weshalb auch vom „pH-Paradox“ gesprochen wird (Lemasters et al. 1997). In früheren Untersuchungen an koronaren mikrovaskulären Endothelzellen wurde jedoch festgestellt, dass die pH-Wert-Erhöhung nicht die Ursache für Reperfusionsschäden ist (Ladilov et al. 2000). Passend dazu zeigten auch Vorversuche zur ATP-Messung der vorliegenden Arbeit bei fortgeführter Azidose trotzdem den beschriebenen ATP-Verlust in der Reperfusion (nicht gezeigt). Auch findet in der Reperfusion keine fortgesetzte Depolarisation, sondern eine deutliche Erholung des mitochondrialen Membranpotentials statt (s. 4.7.). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass bei diesem Zelltyp noch andere Auslöser für den ATP-Abfall vorliegen müssen. Dies wäre z. B. eine Unterbrechung der Glykolyse durch Radikale, was im Verlauf der Reperfusion zu ATP-Mangel führt und möglicherweise ebenfalls eine zusätzliche ATP-Hydrolyse durch die  $F_1F_0$ -ATPase zur Folge hat.

Dass tatsächlich Radikale einen Einfluss auf den zellulären ATP-Gehalt haben, wird durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt, da der Verlust durch den Radikalfänger MitoQ verhindert werden konnte (Abb. 13, S. 53). Auch der Hemmstoff des zweiten Komplexes der Atmungskette führte zu einem signifikant geringeren ATP-Abfall (Abb. 14, S. 54). Dies unterstützt die Theorie, dass dieser Komplex zu einem großen Teil für die Radikalproduktion verantwortlich ist. Dass der Einsatz eines Inhibitors der mitochondrialen Atmungskette nicht grundsätzlich den ATP-Abfall beschleunigt kann in diesem Fall dadurch erklärt werden, dass

trotz der Inhibition des Komplexes II weiterhin ungehindert Elektronen von Komplex I auf Komplex III übertragen werden können. Durch diesen Umweg kann die ATP-Produktion weiterhin fortgeführt werden (Lehninger, Nelson, Cox 1994, Berg et al. 2002, Cecchini 2003). Antimycin A verursachte hingegen durch Blockade des Komplexes III einen beschleunigten ATP-Verlust. Da Antimycin A außerdem zu verstärktem  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg führte (Abb. 15, S. 55), könnte dies möglicherweise für einen toxischen Effekt des Inhibitors sprechen.

### **4.7 Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_M$ durch simulierte Ischämie und Reperfusion**

Die JC-1-Messungen dieser Arbeit zeigen, dass das mitochondriale Membranpotential  $\Delta\Psi_M$  in der Ischämie abfällt und sich in der Reperfusion nicht ausreichend erholt. Der Grund für die unzureichende Repolarisierung liegt vermutlich in der Entstehung von Radikalen während der postischämischen Reperfusion.

Während der anoxischen Phase des Experimentes kam es zu einem kontinuierlichen Abfall der JC-1-Kinetik (Abb. 9, S. 48), was einer Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials entspricht und auch bei Messungen am isolierten Herzen und an Kardiomyozyten mit dem Farbstoff Safranin und TMRE beschrieben wird (Ylitalo et al. 2000, Levraut et al. 2003). Mit Beginn der Reperfusion stieg das Potential kurzfristig stark, danach flacher wieder an. Diese Repolarisation erreichte jedoch nicht den ursprünglichen Ausgangswert (Abb. 10, S. 49). Ähnliche Beobachtungen wurden auch an Kardiomyozyten beschrieben, bei denen sich das mitochondriale Membranpotential nach erfolgter Depolarisation in der Ischämie in der Reperfusion nicht vollständig wiederherstellte (Levraut et al. 2003). Dies deutet darauf hin, dass die Reperfusion dem mitochondrialen Membranpotential entweder keine ausreichende Erholung ermöglicht oder dass die mitochondriale Membran während der ischämischen Phase möglicherweise irreversibel geschädigt wurde. In den Experimenten wurde jedoch durch Zugabe des unspezifischen Radikalfängers Trolox eine signifikant stärkere Repolarisation beobachtet, was gegen eine irreversible Schädigung der Mitochondrienmembran spricht (Abb. 11, S. 50). Das verdeutlicht die Rolle der Radikale als schädigender Einfluss auf das mitochondriale Membranpotential während der Reperfusion. Unterstützt wird die Beobachtung durch eine Studie an Hepatozyten, in der Radikalfänger Depolarisation und Zelltod verhindern konnten (Nieminen et al. 1997). Eine andere Arbeitsgruppe machte in Untersuchungen an isolierten

## Diskussion

Kardiomyozyten deutlich, dass es in der Reperfusion einen Zusammenhang zwischen der Öffnung des mPTP, der Entstehung von Radikalen und der auftretenden Depolarisation gibt (Hausenloy et al. 2003). Nach dieser Studie entstehen Radikale in Kardiomyozyten allerdings erst nach Öffnung des Megakanals. Anhand der vorliegenden Ergebnisse an koronaren mikrovaskulären Endothelzellen kann nicht beurteilt werden, ob mPTP der Auslöser der Radikalproduktion ist, da dieser nicht genauer betrachtet wurde. Bei Untersuchungen an Kardiomyozyten konnten Depolarisation und Zellschädigung während der Reperfusion allerdings nicht durch Inhibition der Öffnung des mPTP verhindert werden (Levrant et al. 2003). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit an Endothelzellen zeigen vielmehr, dass die Verschiebung des mitochondrialen Membranpotentials in der Anoxie zu einem gewissen Grad reversibel ist und dass Radikale die Erholung des mitochondrialen Membranpotentials deutlich unterdrücken, was durch den Radikalfänger Trolox verhindert werden kann. Dies kann durch Untersuchungen an Kardiomyozyten ebenfalls bestätigt werden, da die Depolarisation auch an diesem Zelltyp durch den Einsatz verschiedener Radikalfänger unterdrückt werden konnte. Die Ursache für die Depolarisation wird in Kardiomyozyten der Radikalproduktion während der Ischämie in der Atmungskette zugeschrieben. Die Radikale werden dabei für eine Schädigung der inneren Mitochondrienmembran durch oxidative Prozesse verantwortlich gemacht, welche einen Verlust der Zellintegrität und eingeschränkte Repolarisation des Membranpotentials in der Repolarisation zur Folge hat (Levrant et al. 2003). Die protektive Wirkung der Radikalfänger in der Studie an Kardiomyozyten wird jedoch hauptsächlich ihrer Funktion während der Ischämie zugesprochen, da sie nur dann Wirkung zeigten, wenn sie schon in dieser Phase verabreicht wurden. An den vorliegenden Ergebnissen an Endothelzellen bewirkte der Radikalfänger hingegen auch allein in der Reperfusion eine verstärkte Repolarisation des Membranpotentials. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Radikalentstehung in Endothelzellen zu einem anderen Zeitpunkt stattfindet als in Kardiomyozyten und dass die Verabreichung von Radikalfängern in der Reperfusion in diesem Zelltyp noch protektive Wirkung entfalten kann.

Oligomycin blockierte die teilweise Wiederherstellung des mitochondrialen Membranpotentials in der Reperfusion komplett (Abb. 11, S. 50). Dies lässt sich dadurch erklären, dass der Inhibitor der  $F_1F_0$ -ATPase (Komplex V) nicht nur den Protonenfluss innerhalb des Enzyms in die Mitochondriale Matrix verhindert, sondern dadurch auch zum Erliegen der restlichen Atmungskette führt, welche durch entgegengesetzte Protonenpumpen maßgeblich am Aufbau des mitochondrialen Membranpotentials beteiligt ist (Lehninger, Nelson, Cox 1994). Verschiedene andere Inhibitoren der Atmungskette, wie DPI, TTFA oder

Antimycin A, ebenso der mitochondrienspezifische Radikalfänger MitoQ, führten durch ihre Eigenfluoreszenz bei den Messungen des JC-1-Signals zu Interferenzen und konnten deshalb leider nicht beurteilt werden. Ein weiterer Schritt wären deshalb Untersuchungen des mitochondrialen Membranpotentials mit Hilfe anderer Methoden und der genannten Substanzen.

### **4.8 Einfluss der simulierten Reperfusion auf die interzelluläre Lückenbildung**

An den Messungen der interzellulären Lücken dieser Studie wird deutlich, dass es einen Zusammenhang zwischen der vermehrten Radikalentstehung in der simulierten Reperfusion und Zunahme der interzellulären Zwischenräume gibt.

Dabei induziert wahrscheinlich der erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel und die Wiederversorgung der Zellen mit Energie die Aktivierung des kontraktile Apparates der Endothelzellen. Dieser bewirkt eine Vergrößerung der interzellulären Lücken (Watanabe et al. 1991, Noll et al. 1995, Schäfer et al. 2003). Auch in den optischen Messungen der vorliegenden Arbeit vergrößerten sich die interzellulären Lücken in der Reperfusion deutlich (Abb. 20, S. 61). Durch Applikation des Radikalfängers MitoQ und des Inhibitors des Komplexes II der mitochondrialen Atmungskette reduzierte sich die Lückenbildung signifikant (Abb. 21, 22, S. 62, 63). Anhand dieser Ergebnisse lässt sich zwar keine direkte Wirkung von Radikalen auf den kontraktile Apparat der Zellen nachweisen. Es wird jedoch die Theorie unterstützt, dass ROS wahrscheinlich über einen Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels zu vermehrter interzellulärer Lückenbildung führen. Vergrößerte interzelluläre Zwischenräume gehen mit gesteigerter Permeabilität und Ödembildung einher und führen dadurch zu Organschäden (Garcia-Dorado et al. 1992). Die verringerte Lückenbildung könnte also bedeuten, dass die Verhinderung übermäßiger Radikalproduktion in der Reperfusion einen schützenden Effekt auf das Organ hat.

Auch Oligomycin hatte bei Applikation mit Beginn der Reperfusion eine reduzierte Lückenbildung zur Folge (Abb. 22, S. 63). Dieser Effekt lässt sich allerdings eher dadurch erklären, dass Oligomycin zu absolutem Energiemangel der Zelle führt, weshalb auch die Aktivierung des kontraktile Apparates nicht mehr möglich ist (Wysolmerski und Lagunoff 1988).

### **4.9 Therapieansätze:**

Die Tatsache, dass Radikale eine der Hauptursachen der Ischämie-/Reperfusionsschäden sein könnten, war schon des Öfteren ein Anlass für Studien, bei denen der Einfluss von Radikalfängern auf die Situation der Ischämie und Reperfusion untersucht wurde (Bolli 1988, Michiels et al. 1992, Ambrosio et al. 1993, Kaeffer et al. 1997, Dhar-Mascareno et al. 2005). In einer Studie konnte z. B. eine schützende Wirkung von erhöhtem intrazellulären Vitamin C während der Hypoxie und Reperfusion beobachtet werden (Dhar-Mascareno et al. 2005). In einigen anderen Untersuchungen wurde kein positiver Effekt der Radikalfänger festgestellt (Jeroudi et al. 1994). Die Ursache für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte einerseits der untersuchte Zelltyp (z.B. Herzmuskelzelle oder Endothelzelle), die verabreichte Dosis, andererseits aber auch der biochemische Ansatzpunkt des Radikalfängers sein. Da Radikale für die Zelle teilweise wichtige Funktionen einnehmen, kann eine komplette Inhibition der Radikalproduktion auch negative Folgen haben (Lum und Roebuck 2001, Griendling und FitzGerald 2003). Um die Wirkung eines Therapeutikums zu optimieren, ist es deshalb sehr wichtig, den Ursprung einer Erkrankung möglichst direkt zu beeinflussen. So kann das in dieser Studie eingesetzte MitoQ beispielsweise durch seine Struktur gezielt gegen mitochondriale Schädigung wirken (Kelso et al. 2001, Tauskela 2007). In Ischämie-/Reperfusionsexperimenten mit Ratten konnte es bei oraler Verabreichung die kardiale Dysfunktion signifikant reduzieren (Adlam et al. 2005). Das spricht dafür, dass wichtige Zellfunktionen dadurch nicht beeinträchtigt worden sind. Ob in diesen Studien eine direkte Wirkung von MitoQ auf den Zelltyp der Herzmuskelzelle oder der Endothelzelle im Vordergrund gestanden hat, ist aber offen. Die Substanz wird außerdem als oral verabreichter Radikalfänger in klinischen Studien als Therapeutikum gegen Alzheimer und Parkinson getestet (Tauskela 2007). Insgesamt stehen also Radikalfänger wie MitoQ nach wie vor im Fokus weiterer Untersuchungen gerade im Bereich der postischämischen Reperfusion, da sich dadurch möglicherweise auch auf anderen Gebieten neue Therapiemöglichkeiten eröffnen.

### **4.10 Stellenwert des Myokardinfarktes in der Tiermedizin**

Infarktverursachende Herz-Kreislauf-Erkrankungen des Menschen werden durch die Anwesenheit mehrerer Risikofaktoren begünstigt. Diese unter dem Begriff *Metabolisches Syndrom* oder *Wohlstandssyndrom* zusammengefassten Faktoren sind Übergewicht, veränderte Blutfettwerte, erhöhter Blutdruck, erhöhter Nüchtern-Blutzucker und Diabetes

## Diskussion

mellitus (Hoppichler 2004). Eine Krankheit, die mit dem Metabolischen Syndrom in Zusammenhang steht, ist die Arteriosklerose. Ablagerungen und veränderte Kollagen- und Proteoglykangehalte der Gefäßwände führen dabei zu verdickten und verhärteten Arterienwänden, was u. a. Gefäßverengungen, Ischämie, Thrombose, Herzinfarkt, Schlaganfall oder plötzlichen Tod zur Folge haben kann (Just 1994, Gebbers 2007). Beim Menschen ist Arteriosklerose deshalb die häufigste Ursache für Myokard- und Zerebralinfarkte. Trotz ähnlicher Risikofaktoren, v. a. in der Heimtierhaltung, nimmt diese Erkrankung in der Tiermedizin keinen vergleichbaren Stellenwert ein, jedoch wird v. a. bei Tieren, die ihr natürliches Alter erreichen, Arteriosklerose mit Lumeneinengungen, ischämischer Hypoxie und Thrombenbildung beschrieben (Meurer und Wolf 2006). Bei älteren Pferden z. B. sind häufig Aorta und Arteria carotis betroffen, während bei älteren Rindern zusätzlich auch die Uterusarterie sklerotische Gefäßwandveränderungen aufweist und dadurch zur Unfruchtbarkeit führen kann. Darüber hinaus wird die Erkrankung bei Vögeln und Hunden beschrieben (Detweiler et al. 1968, Liu et al. 1986, Johnson 2005, Glaus 2006, Meurer und Wolf 2006). Herzinfarkte hingegen werden bei den populärsten Heimtieren Hund und Katze eher selten beschrieben und treten meist nur in Zusammenhang mit anderen Erkrankungen auf (Driehuys et al. 1998). Bei Hunden kann die stärkere Kollateralversorgung des Herzens in den meisten Fällen größere Schäden durch Infarkte verhindern (Hearse und Sutherland 2000). Das Schweineherz hingegen hat eine ähnliche Gefäßversorgung wie das Menschenherz, weshalb das Schwein in der kardiovaskulären Forschung einen wichtigen Stellenwert hat (Hearse und Sutherland 2000). Außerhalb der Versuchstierkunde haben Schweine und deren Herz-Kreislauf-System aufgrund der geringen Lebenserwartung der lebensmittelliefernden Tiere bisher kaum Beachtung gefunden. Da in den letzten Jahren jedoch auch die Schweinehaltung als Heimtier regen Zuspruch findet und die Lebenserwartung dieser Liebhabertiere deutlich höher liegt, könnte die Frage der Herzinfarkttherapie bei älteren Schweinen in Zukunft häufiger auftreten. Größere Bedeutung haben in der Tiermedizin allerdings Gefäßverschlüsse anderer Organe, die durch Thrombembolien hervorgerufen werden können. Ein Beispiel wäre hier die Therapie von Thrombembolien im Bereich der Hintergliedmaßen der Katze. Da Haustiere eine immer höhere Lebenserwartung haben und ihre Besitzer ihnen immer bessere tiermedizinische Versorgung ermöglichen, spielt in Zukunft voraussichtlich auch in der Tiermedizin die Therapie von Organschäden, die durch Ischämie/Reperfusion verursacht werden, eine Rolle.

### 5 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen,

- ob es in der postischämischen Reperfusion koronarer mikrovaskulärer Endothelzellen zur Radikalproduktion kommt,
- an welchem Ort innerhalb der Endothelzelle Radikale produziert werden,
- ob ROS zur Aktivierung der PLC $\gamma$  führen und ob dadurch der Signalweg bis zur Ca<sup>2+</sup>-Ausschüttung in Gang gesetzt wird,
- ob src-Kinasen in die PLC $\gamma$ -Aktivierung involviert sind,
- wie sich das mitochondriale Membranpotential in der postischämischen Reperfusion verhält und ob Radikale darauf Einfluss haben,
- ob sich der endotheliale ATP-Gehalt in der postischämischen Reperfusion verändert und ob ROS daran beteiligt sind und
- ob die interzelluläre Lückenbildung durch Verhinderung der Radikalentstehung beeinflusst werden kann.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen:

- In der postischämischen Reperfusion werden ROS generiert.
- Die Radikalbildung findet innerhalb der Mitochondrien statt und wird durch Komplex II der mitochondrialen Atmungskette verursacht.
- ROS sind in der Lage, PLC $\gamma$  zu aktivieren und führen außerdem zum Anstieg des zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Gehaltes.
- Src-Kinasen vermitteln die Aktivierung der PLC $\gamma$  und führen dadurch zu Ca<sup>2+</sup>-Ausschüttung.
- Das mitochondriale Membranpotential ist in der Reperfusion weitgehend gestört. Der Radikalfänger Trolox führt aber zu einer deutlichen Erholung.
- ATP fällt im Verlauf der Reperfusion ab. Gezielte Reduktion der Radikalentstehung durch MitoQ und TTFA verhindert den ATP-Verlust.
- Die Reduktion des ROS-Aufkommens durch MitoQ und TTFA vermindert übermäßige interzelluläre Lückenbildung.

## 6 Summary

The aim of the present study was to determine,

- whether postischemic reperfusion of coronary microvascular endothelial cells causes ROS production,
- the localization of ROS-generation in endothelial cells during reperfusion,
- whether ROS lead to PLC $\gamma$  activation initiating Ca<sup>2+</sup>-release,
- whether src-kinases are involved in PLC $\gamma$  activation,
- whether ROS disturb the mitochondrial membrane potential during reperfusion,
- whether ROS are involved in ATP-loss during reperfusion and
- whether intercellular gap formation can be reduced by inhibition of ROS generation.

The main findings of this study are:

- ROS are produced in coronary microvascular endothelial cells during postischemic reperfusion.
- Complex II of mitochondrial respiratory chain is the main cause of ROS generation in reperfusion.
- PLC $\gamma$  is activated by ROS, leading to cytosolic Ca<sup>2+</sup>-overload.
- PLC $\gamma$  activation is mediated by src-kinases.
- Reduced ROS production ameliorates mitochondrial membrane potential in reperfusion.
- Reperfusion causes ATP-loss, which can be prevented by systematic inhibition of ROS generation with MitoQ and TTFA.
- Gap formation in reperfusion is reduced by administration of the targeted scavenger MitoQ and the inhibitor of complex II TTFA.

## 7 Literatur

**Abdo E E, Cunha J E M, Deluca P, Coelho A M M, Bacchella T, Machado M C C**  
Protective effect of N2-mercaptpropionylglycine on rats and dogs liver during ischemia/reperfusion process.

Arg Gastroenterol 2003, 40(3): 177-180

**Adam-Vizi V, Chinopoulos C**

Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species

Trends Pharmacol Sci 2006, 27(12):639-645

**Adlam V, Harrison J C, Porteous C M, James A M, Smith R A J, Murphy M P, Sammut I A**

Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury.

FASEB J 2005, 19(9): 1088-1095

**Allshire A, Piper H M, Cuthbertson K S R, Cobbold P H,**

Cytosolic free calcium in single rat heart cells during anoxia and reoxygenation.

Biochem J, 1987, 244: 381-385

**de Almeida A C, dos Santos Vilela M M, Condino-Neto A, Ximenes V F**

The importance of myeloperoxidase in apocynin-mediated NADPH oxidase inhibition.

ISRN Inflammation, 2012, ID 260453

**Ambrosio G, Zweier J L, Duilio C, Kuppusamy P, Santoro G, Elia P P, Tritto I, Cirillo P, Condorelli M, Chiariello M, Flaherty J T**

Evidence that mitochondrial respiration is a source of potentially toxic oxygen free radicals in intact rabbit hearts subjected to ischemia and reflow.

J Biol Chem, 1993, 268(25):18532-18541

**Arroyo C M, Carmichael A J, Bouscarel B, Liang J H, Weglicki W B**

Endothelial cells as a source of oxygenfree radicals. An ESR study.

Free Rad Res Comms, 1990, 9 (3-6): 287-296

**Austin S A, Sens M A, Combs C K**

Amyloid precursor protein mediates a tyrosine kinase-dependent activation response in endothelial cells.

J Neurosci, 2009, 29(46): 14451-14462

**Bai X-C, Deng F, Liu A-L, Zou Z-P, Wang Y, Ke Z-Y, Ji Q-S, Lou S-Q**

Phospholipase C- $\gamma$ 1 is required for cell survival in oxidative stress by protein kinase C.

Biochem J, 2002, 363, 395-401

**Bassenge E**

Endothelial function in different organs.

Prog Cardiovasc Dis, 1996, 3: pp. 209-228

**Bassingthwaighe J B, Yipintsoi T, Harvey R**

Microvasculature of the dog left ventricular myocardium.

## Literatur

Microvasc Res, 1974, 7: 229-249

**Berg J M, Tymoczko J L, Stryer L**

Biochemie.

Spektrum- Verlag, 2007, 6. Auflage

**Berg J M, Tymoczko J L, Stryer L**

The regulation of cellular respiration is governed primarily by the need for ATP.

Biochemistry. 5th edition. New York: W H Freeman; 2002, Section 18.6

**Bernstein B W, Chen H, Boyle J A, Bamburg J R**

Formation of actin-ADF/cofilin rods transiently retards decline of mitochondrial potential and ATP in stressed neurons.

Am J Physiol Cell Physiol, 2006, 291: 828-839

**Berridge M J**

Inositol triphosphate and calcium signaling.

Nature 1993, 361: 315-325

**Bogdanova A, Grenacher B, Gassmann M, Tavakoli R**

Antioxidants in treatment of ischemia-reperfusion injury: mechanisms revised.

Gesellschaft für Mikrozirkulation und Vaskuläre Biologie e.V. Annual Meeting 2006, P59

**Bolli R**

Oxygen-derived free radicals and postischemic myocardial dysfunction ("stunned myocardium").

J Am Coll Cardiol, 1988; 12: 239-49

**Bootman M D, Collins T J, Peppiatt C M, Prothero L S, MacKenzie L, De Smet P, Travers M, Tovey S T, Seo J T, Berridge M J, Ciccolini F, Lipp P**

Calcium signalling—an overview

Semin Cell Dev Biol, 2001, 12: 3-10

**Borutaite V, Morkuniene R, Brown G C**

Release of cytochrome c from heart mitochondria is induced by high  $Ca^{2+}$  and peroxynitrite and is responsible for  $Ca^{2+}$ -induced inhibition of substrate oxidation

Biochim Biophys Acta, 1999, 1453: 41-48

**Bowers K C, Allshire A P, Cobboldt P H**

Bioluminescent measurement in single cardiomyocytes of sudden cytosolic ATP depletion coincident with rigor.

J Mol Cell Cardiol 1992, 24: 213-218

**Buderus S, Siegmund B, Spahr R, Krützfeldt A, Piper H M**

Resistance of endothelial cells to anoxia-reoxygenation in isolated guinea pig hearts.

Am J Physiol, 1989, H488-H493

## Literatur

**Buresi M C, Buret A G, Hollenberg M D, MacNaughton W K**

Activation of proteinase-activated receptor 1 stimulates epithelial chloride secretion through a unique MAP kinase- and cyclo-oxygenase-dependent pathway.  
The FASEB Journal, 2002, 16(12): 1515-1525

**Cantley L C, Auger K R, Carpenter C, Duckworth B, Graziani A, Kapeller R, Soltoff S**

Oncogenes and signal transduction.  
Cell, 1991, 64: 261-302

**Cantoni O, Sestili P, Cattabeni F, Bellomo G, Pou S, Cohen M, Cerutti P**

Calcium chelator Quin 2 prevents hydrogen-peroxide-induced DNA breakage and cytotoxicity.  
Eur J Biochem, 1989 Vol. 182 (2): 209-212

**Cecchini G**

Function and structure of complex II of the respiratory chain.  
Ann Rev Biochem, 2003, 72: 77-109

**Chandel N S, McClintock D S, Feliciano C E, Wood T M, Melendez J A, Rodriguez A M, Schumacker P T**

Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  during hypoxia. A mechanism of O<sub>2</sub> sensing.  
J Biol Chem, 2000, 275 (33): 25130-25138

**Chen J-X, Zeng H, Lawrence M L, Blackwell T S, Meyrick B**

Angiopoietin-1-induced angiogenesis is modulated by endothelial NADPH oxidase.  
Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006, 291: H1563-H1572

**Chen Q, Vazquez E J, Moghaddas S, Hoppel C L, Lesnefsky E J**

Production of reactive oxygen species by mitochondria. Central role of complex III  
J Biol Chem, 2003, 278 (38): 36027-36031

**Conde de la Rosa L, Vrenken T E, Biust-Homan M, Moshage H**

Oxidative stress induced apoptosis is inhibited by metformin via an ERK and Src dependent in rat hepatocytes.  
Eur J Gastroenterol Hepatol, 2006, 18: A50-A51

**Cotran R S**

New roles for the endothelium in inflammation and immunity.  
Am J Pathol, 1987, 129(3), pp. 407-413

**Culic O, Gruwel M L, Schrader J**

Energy turnover of vascular endothelial cells.  
Am J Physiol Cell Physiol, 1997, 273: C205-C213

**Curry F E**

Modulation of venular microvessel permeability by calcium influx into endothelial cells.  
The FASEB Journal, 1992, 6: 2456-2466

## Literatur

**Detweiler D K, Luginbuhl H, Buchanan J W, Patterson D F**

The natural history of acquired cardiac disability of the dog.  
Ann N Y Acad Sci, 1968, 147: 318-329

**Dhar-Mascareno M, Carcamo J M, Golde D W**

Hypoxia–reoxygenation-induced mitochondrial damage and apoptosis in human endothelial cells are inhibited by vitamin C.  
Free Radic Biol Med, 2005, 38(10): 1311-1322

**Dignan R J, Dyke C M, Abd-Elfattah A S, Lutz H A, Yeh Jr T, Lee K F, Parmar J, Wechsler A S**

Coronary artery endothelial cell and smooth muscle dysfunction after global myocardial ischemia.  
Ann Thorac Surg, 1992, 53: 311-317

**Dreher D, Junod A F**

Differential effects of superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical on intracellular calcium in human endothelial cells.  
J Cell Physiol, 1995, 162(1): 147-153

**Driehuys S, Van Winkle T J, Sammarco C D, Drobatz K J**

Myocardial infarction in dogs and cats: 37 cases (1985-1994).  
J Am Vet Med Assoc, 1998, 15, 213(10): 1444-8

**Dumont P, Burton M, Chen Q M, Gonos E S, Frippiat C, Mazarati J-B, Eliaers F C, Remacle J, Toussaint O**

Introduction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblasts.  
Free Radic Biol & Med, 2000, 28(3): 361-373

**Dumont P, Chainiaux F, Eliaers F, Petropoulou C, Remacle J, Koch-Brandt C, Gonos E S, Toussaint O**

Overexpression of apolipoprotein J in human fibroblasts protects against cytotoxicity and premature senescence induced by ethanol and *tert*-butylhydroperoxide.  
Cell Stress Chaperones, 2002, 7(1): 23-35

**Eruslanov E, Kusmartsev S**

Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry  
Methods Mol Biol, 2010; 594: 57-72

**Ferris C D, Snyder S H**

Inositol 1,4,5-triphosphate – activated calcium channels  
Annu Rev Physiol, 1992, 54:469-488

**Fujiwara N, Abe T, Endoh H, Warashina A, Shimoji K**

Changes in intracellular pH of mouse hippocampal slices responding to hypoxia and/or glucose depletion.  
Brain Res, 1992, 572(1-2): 335-339

## Literatur

**Furchgott RF and Vanhoutte PM.**

Endothelium-derived relaxing and contracting factors.  
FASEB J, 1993: 2007–2018

**Furchgott R F, Zawadzki J V**

The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.  
Nature 1980, 288: 373-376

**Garcia-Dorado D, Theroux P, Duran J M, Solares J, Alonso J, Sanz E, Munoz R, Elizaga J, Botas J, Fernandez-Aviles F, Soriano J, Esteban E**

Selective inhibition of the contractile apparatus. A new approach to modification of infarct size, infarct composition, and infarct geometry during coronary artery occlusion and reperfusion.  
Circulation, 1992, 85(3): 1160-1174

**Garcia-Dorado D, Theroux P, Munoz R, Alonso J, Elizaga J, Fernandez-Aviles F, Botas J, Solares J, Soriano J, Duran J M**

Favorable effects of hyperosmotic reperfusion on myocardial edema and infarct size.  
Am J Physiol, 1992, 262 (1): H17-H22

**Gebbers J-O**

Atherosclerosis, cholesterol, nutrition, and statins – a critical review  
Ger Med Sci, 2007, 5

**Geeraerts M D, Ronveaux-Dupal M F, Lemasters J J, Herman B**

Cytosolic free Ca<sup>2+</sup> and proteolysis in lethal oxidative injury in endothelial cells.  
Am J Physiol, 1991, 261(5/1): C889-96

**Gimbrone M A, Cotran R S, Folkman J**

Human vascular endothelial cells in culture. Growth and DNA synthesis.  
J Cell Biol, 1974, 60: 673-684

**Glaus T**

Herzkrankheiten.

In: Praktikum der Hundeklinik; Suter P.F. und Kohn B., 10. Aufl., Parey im MSV 2006: 522-566

**Gonzalez-Pacheco F R, Caramelo C, Castilla M A, Deudero J J P, Arias J, Yague S, Jimenez S, Bragado R, Alvarez-Arroyo M V**

Mechanism of vascular smooth muscle cells activation by hydrogen peroxide: role of phospholipase C gamma.  
Nephrol Dial Transplant, 2002, 17: 392-398

**Gores G J, Nieminen A-L, Wray B E, Herman B, Lemasters J J**

Intracellular pH during "chemical hypoxia" in cultured rat hepatocytes. Protection by intracellular acidosis against the onset of cell death.  
J Clin Invest, 1989, 83(2): 386-396

## Literatur

**Gosh M, Wang H D, McNeill J R**

Tiron exerts effects unrelated to its role as a scavenger of superoxide anion: effects on calcium binding and vascular responses.

Can J Physiol Pharmacol, 2002, 80(8): 755-760

**Gourdin M J, Bree B, De Kock M**

The impact of ischaemia–reperfusion on the blood vessel

Eur J Anaesthesiol, 2009, 26: 537-547

**Griendling K K, FitzGerald G A**

Oxidative stress and cardiovascular injury. Part I: Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS.

Circulation, 2003, 108: 1912-1916

**Grover G J, Atwal K S, Sleph P G, Wang F L, Monshizadegan H, Monticello T, Green D W**

Excessive ATP hydrolysis in ischemic myocardium by mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase: effect of selective pharmacological inhibition of mitochondrial ATPase hydrolase activity

Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 287: H1747-H1755

**Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY**

A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties.

J Biol Chem, 1985, 260: 3440-50

**Gutowski S J, Rosenberg H**

Succinate uptake and related proton movements in escherichia coli K12.

Biochem J, 1975, 152: 647-654

**Hashimoto Y, Itoh K, Nishida K, Okano T, Miyazawa Y, Okinaga K**

Rapid superoxide production by endothelial cells and their injury upon reperfusion.

J Surg Res, 1994, 57: 693-697

**Hatefi Y**

The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system.

Ann Rev Biochem, 1985, 54: 1015-1069

**Hausenloy D J, Duchen M R, Yellon D M**

Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia–reperfusion injury.

Cardiovasc Res, 2003, 60: 617-625

**Hausenloy D J, Yellon D M**

New directions for protecting the heart against ischemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)- pathway.

Cardiovasc Res, 2004, 61: 448-460

**Hayashi A, Koroma B M, Imai K, de Juan E**

Increase of protein tyrosine phosphorylation in rat retina after ischemia-reperfusion injury.

Invest Ophthalmol Vis Sci, 1996, (37/11): 2146-2154

## Literatur

### **Hearse D J**

Reperfusion of ischemic myocardium.  
J Mol Cell Cardiol, 1977, 9: 605-616

### **Hearse D J, Sutherland F J**

Experimental models for the study of cardiovascular function and disease.  
Pharmacol Res, 2000, 41(6)

### **Hofer A M, Machen T E**

Technique for in situ measurement of calcium in intracellular inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive stores using the fluorescent indicator mag-fura-2.  
Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 2598-2602

### **Hohler B, Holzapfel B, Kummer W**

NADPH oxidase subunits and superoxide production in porcine pulmonary artery endothelial cells.  
Histochem Cell Biol 2000, 114 (1): 29-37

### **Hong J H, Moon S J, Byun H M, Kim M S, Jo H, Bae Y S, Lee S-I, Bootman M D, Roderick H L, Shin D M, Seo J T**

Critical role of phospholipase C $\gamma$ 1 in the generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-evoked [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations in cultured rat cortical astrocytes.  
J Biol Chem, 2006, 281 (19): 13057-13067

### **Hoppichler F**

Das metabolische Syndrom: Epidemiologie und Diagnose.  
Acta Med Austriaca 2004, 31(4): 130-132

### **Horwitz L D, Fennessey P V, Shikes R H, Kong Y**

Marked reduction in myocardial infarct size due to prolonged infusion of an antioxidant during reperfusion.  
Circ, 1994, 89: 1792-1801

### **Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Kang G, Hattori N, Uchida K, Arimura K, Egashira K, Takeshita A**

Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium  
Circ Res, 1999, 85: 357-363

### **Indo H P, Davidson M, Yen H-C, Suenaga S, Tomita K, Nishii T, Higuchi M, Koga Y, Ozawa T, Majima H J**

Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage.  
Mitochondrion, 2007, 7: 106-118

### **Inglede W J, Ohnishi T**

The probable site of action of thenoyltrifluoroacetone on the respiratory chain.  
Biochem J, 1977, 164: 617-620

**Jaffe E A**

Physiologic functions of normal endothelial cells.  
Ann N Y Acad Sci Annals, 1985: 279-291

**Jain M, Brenner D A, Cui L, Lim C C, Wang B, Pimentel D R, Koh S, Sawyer D B, Leopold J A, Handy D E, Loscalzo J, Apstein C S, Liao R**

Glucose-6-phosphate dehydrogenase modulates cytosolic redox status and contractile phenotype in adult cardiomyocytes.  
Circ Res, 2003, 93: e9-e16

**Jeroudi M O, Hartley C J, Bolli R**

Myocardial reperfusion injury: role of oxygen radicals and potential therapy with antioxidants.  
Am J Cardiol, 1994, 73 (6): 2B-7B

**Jezek P, Hlavata L**

Review - Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism  
Int J Biochem Cell Biol, 2005, 37(12): 2478-2503

**Johnson M C**

Hyperlipidemia disorders in dogs.  
Compend Contin Educ Pract Vet 2005, 27: 361-371

**Jornot L, Petersen H, Junod A F**

Differential protective effects of o-phenanthroline and catalase on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage and inhibition of protein synthesis in endothelial cells.  
J Cell Physiol, 1991, 149: 408-413

**Just H**

Das Endothel und Herz-Kreislauf-Erkrankungen.  
Drug Res 1994, 44/I, (3a)

**Just H, Hort W, Zeiher A M**

Arteriosclerosis. New insights into pathogenetic mechanisms and prevention.  
Hrsg. von H. Just, W. Hort, M. Zeiher. Darmstadt: Steinkopff Verlag, New York: Springer-Verlag, 1994: 1-32, 41-128 (Supplement to Basic research in cardiology; Vol. 89, Suppl. 1)

**Kaeffer N, Richard V, Thuillez C**

Delayed coronary endothelial protection 24 hours after preconditioning.  
Circulation, 1997, 96: 2311-2316

**Kaul S, Jayaweera A R**

Coronary and myocardial blood volumes: noninvasive tools to assess the coronary microcirculation?  
Circ, 1997; 96: 719-724.

## Literatur

### **Keck RG**

The use of t-butyl hydroperoxide as a probe for methionine oxidation in proteins.  
Anal Biochem, 1996, 236(1): 56-62

### **Kelly G S**

Clinical applications of N-acetylcysteine.  
Altern Med Rev. 1998, 3(2):114-27

### **Kelso G F, Porteous C M, Coulter C V, Hughes G, Porteous W K, Ledgerwood E C, Smith R A, Murphy M**

Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within Cells.  
J Biol Chem, 2001, 276 (7): 4588–4596

### **Keston A S, Brandt R**

The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide.  
Anal Biochem, 1965, 11: 1-5

### **Kimura M, Maeda K, Hayashi S**

Cytosolic calcium increase in coronary endothelial cells after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure and the inhibitory effect of U78517F.  
Br J Pharmacol, 1992, 107: 488-493

### **Knight G E, Bodin P, De Groat W C, Burnstock G**

ATP is released from guinea pig ureter epithelium on distension.  
Am J Physiol Renal Physiol, 2002, 282: F281-F288

### **Kohn J, Riches P G**

A cellulose acetate immunofixation technique.  
J Immunol Methods, 1978, 20: 325-331

### **Kooy N W, Royall J A, Ischiropoulos H**

Oxidation of 2', 7'-dichlorofluorescein by peroxynitrite  
Free radic res 10/1997, 27(3): 245-54

### **Kowaltowski A J, Vercesi A**

Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress.  
Free Radic Biol Med, 1999, 26(3-4): 463-471

### **Krützfeldt A, Spahr R, Mertens S, Siegmund B, Piper H M**

Metabolism of exogenous substrates by coronary endothelial cells in culture.  
J Mol Cell Cardiol, 1990, 22: 1393-1404

### **Kumaran S, Subathra M, Balu M, Panneerselvam C**

Age-associated decreased activities of mitochondrial electron transport chain complexes in heart and skeletal muscle: role of l-carnitine.  
Chem-Biol Int, 2004, 148: 11-18

## Literatur

**Kyoi S, Otani H, Hamano A, Matsuhisa S, Akita Y, Fujiwara H, Hattori R, Imamura H, Kamihata H, Iwasaka T**

Dystrophin is a possible end-target of ischemic preconditioning against cardiomyocyte oncosis during the early phase of reperfusion.

Cardiovasc Res, 2006, 70: 354-363

**Ladilov Y, Schäfer C, Held A, Schäfer M, Noll T, Piper H M,**

Mechanism of  $Ca^{2+}$  overload in endothelial cells exposed to simulated ischemia.

Cardiovasc Res, 2000, 47 (2): 394-403

**Ladilov Y V, Siegmund B, Piper H M**

Protection of reoxygenated cardiomyocytes against hypercontracture by inhibition of  $Na^+/H^+$  exchange.

Am J Physiol 1995, 268 (4): H1531-H1539

**Lambert A J, Buckingham J A, Boysen H M, Brand M D**

Diphenyliodonium acutely inhibits reactive oxygen species production by mitochondrial complex I during reverse, but not forward electron transport.

Biochim Biophys Acta, 2008, 1777: 397-403

**Laskey R E, Adams D J, Cannell M, Van Breemen C**

Calcium entry-dependent oscillations of cytoplasmic calcium concentration in cultured endothelial cell monolayers.

Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 1690-1694

**Laude K, Thuillez C, Richard V**

Coronary endothelial dysfunction after ischemia and reperfusion: a new therapeutic target?

Braz J Med Biol Res, 2001, 34: 1-7

**LeBel C P, Ischiropoulos H, Bondys S C**

Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress.

Chem Res Toxicol, 1992, 5: 227-231

**Lehninger A L, Nelson D L, Cox M M**

Oxidative Phosphorylierung und Photophosphorylierung.

In: Prinzipien der Biochemie, 2. Auflage, 1994, Herausgeber: H Tschesche, Verlag: Spektrum, S. 627

**Lehninger A L, Nelson D L, Cox M M**

Kopplung der ATP-Synthase an den Elektronenfluss in der Atmungskette.

In: Prinzipien der Biochemie, 2. Auflage, 1994, Herausgeber: H Tschesche, Verlag: Spektrum, S. 641

**Levrant J, Iwase H, Shao Z-H, Vanden Hoek T L, Schumacker P T**

Cell death during ischemia: relationship to mitochondrial depolarization and ROS generation.

Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 284: H549-H558

## Literatur

**Lemasters J J, Nieminen A-L, Qian T, Trost L C, Herman B**

The mitochondrial permeability transition in toxic, hypoxic and reperfusion injury  
Mol Cell Biochem, 1997, 174: 159-165

**Li Q, Altschuld R A, Stokes B T**

Quantitation of intracellular free calcium in single adult cardiomyocytes by fura-2 fluorescence microscopy: calibration of fura-2 ratios.  
Biochem Biophys Res Commun, 1987, 147(1): 120-6.

**Li C, Jackson R M**

Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury.  
Am J Physiol Cell Physiol 2002, 282: C227-C241

**Li J-M, Shah M**

Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology.  
Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2004, 287: R1014-R1030

**Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez J A, Robinson J P**

Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production.  
J Biol Chem, 2003, 278 (10): 8516-8525

**Liu S K, Tilley L P, Taooe J P, Fox P R**

Clinical and pathologic findings in dogs with atherosclerosis: 21 cases (1970-1983).  
J Am Vet Med Assoc, 1986, 189(2): 227-232

**Liu B, Zhu X, Chen C-L, Hu K, Swartz H M, Chen Y-R, He G**

Opening of the mitoKATP channel and decoupling of mitochondrial complex II and III contribute to the suppression of myocardial reperfusion hyperoxygenation.  
Mol Cell Biochem, 2010, 337:25-38

**Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, Randall R J**

Protein measurement with the folin phenol reagent.  
J Biol Chem, 1951, 193: 265-275

**Lum H, Roebuck K A**

Oxidant stress and endothelial cell dysfunction  
Am J Physiol Cell Physiol, 2001, 280: C719-C741

**Ly J D, Grubb D R, Lawen A**

The mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ) in apoptosis; an update.  
Apoptosis 2003, 8: 115-128

**Malli R, Frieden M, Trenker M, Graier W F**

The role of mitochondria for  $Ca^{2+}$  refilling of the endoplasmic reticulum.  
J Biol Chem, 2005, 280, (13): 12114-12122

## Literatur

### **Mangat R, Singal T, Dhalla N S, Tappia P S**

Inhibition of phospholipase C<sub>1</sub> augments the decrease in cardiomyocyte viability by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.  
Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006, 291: H854-H860

### **Masumoto N, Tasaka K, Miyake A, Tanizawa O**

Superoxide anion increases intracellular free calcium in human Myometrial Cells  
J Biol Chem, 1990, Vol. 265(36): 22533-22536

### **Mattiasson G**

Analysis of mitochondrial generation and release of reactive oxygen species.  
Cytometry Part A, 2004, 62A: 89-96

### **Matsumura K, Richmond W J, Schaper J, Becker L C**

Progression of myocardial necrosis during reperfusion of ischemic myocardium.  
Circulation 1998, 97: 795-804

### **Maxwell S R J, Lip G Y H**

Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options.  
Int J Cardiol, 1997, 58: 95-117

### **Mertens S, Noll T, Spahr R, Krützfeldt A, Piper H M**

Energetic response of coronary endothelial cells to hypoxia.  
Am J Physiol, 1990, H689-H694

### **Meurer D G, Wolf S**

Allgemeine Stoffwechselstörungen: Arteriosklerose.  
In: Allgemeine Pathologie, Kompendium für die Veterinärmedizin, 2. Auflage 2006, S. 67

### **Michiels C, Arnould T, Houbion A, Remacle J**

Human umbilical vein endothelial cells submitted to hypoxia-reoxygenation in vitro: Implication of free radicals, xanthine oxidase, and energy deficiency.  
J Cell Physiol, 1992, 153: 53-61

### **Miki T, Yu L, Yu C-A**

Characterization of ubisemiquinone radicals in succinate-ubiquinone reductase  
Arch Biochem Biophys, 1992, 293(1): 61-66

### **Mitchell P**

Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism.  
Nature 1961, 191: 144-148

### **Muller F L, Liu Y, Abdul-Ghani M A, Lustgarten M, Bhattacharya A, Jang Y C, Van Remmen H**

High rates of superoxide production in skeletal-muscle mitochondria respiring on both complex I- and complex II-linked substrates.  
Biochem J, 2008, 409: 491-499

## Literatur

### **Munaron L**

Intracellular calcium, endothelial cells and angiogenesis.  
Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2006, 1: 105-119

### **Nakanishi O, Shibasaki F, Hidaka M, Homma Y, Takenawa T**

Phospholipase C- $\gamma$  associates with viral and cellular src kinases.  
J Biol Chem, 1993, 268 (15): 10754-10759

### **Nieminen A L, Byrne A M, Herman B, Lemasters J J**

Mitochondrial permeability transition in hepatocytes induced by t-BuOOH: NAD(P)H and reactive oxygen species.  
Am J Physiol, 1997: C1286-C1294

### **Nieminen A-L, Saylor A K, Herman B, Lemasters J J**

ATP depletion rather than mitochondrial depolarization mediates hepatocyte killing after metabolic inhibition.  
Am J Physiol, 1994, C67-C74

### **Noll T, Muhs A, Besselmann M, Watanabe H, Piper H M**

Initiation of hyperpermeability in energy-depleted coronary endothelial monolayers.  
Am J Physiol, 1995, H1462-H1470

### **Ogawa S, Gerlach H, Esposito C, Pasagian-Macaulay A, Brett J, Stern D**

Hypoxia modulates the barrier and coagulant function of cultured bovine endothelium.  
J Clin Invest, 1990, 85: 1090-1098

### **Ogita M, Ogita A, Usuki Y, Fujita K, Tanaka T**

Antimycin A-induced cell death depends on AIF translocation through NO production and PARP activation and is not involved in ROS generation, cytochrome c release and caspase-3 activation in HL-60 cells.  
J Antibiot (Tokyo), 2009, 62(3):145-52

### **O'Malley Y, Fink B D, Ross N C, Prisinzano T E, Sivitz W I**

Reactive oxygen and targeted antioxidant administration in endothelial cell mitochondria.  
J Biol Chem, 2006, 281(52): 39766-39775

### **Paddenberg R, Ishaq B, Goldenberg A, Faulhammer P, Rose F, Weissmann N, Braun-Dullaeus R C, Kummer W**

Essential role of complex II of the respiratory chain in hypoxia-induced ROS generation in the pulmonary vasculature.  
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003, 284: L710-L719

### **Pan S, World C J, Kovacs C J, Berk B C**

Glucose 6-phosphate dehydrogenase is regulated through c-src-mediated tyrosine phosphorylation in endothelial cells.  
Arterioscler Thromb Vasc Biol 2009, 29: 895-901

**Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Ruggiero F M**

The effect of reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain on the cytochrome c oxidase activity and on the cardiolipin content in bovine heart submitochondrial particles.

FEBS Letters, 2000, 466: 323-326

**Peters S C, Piper H M**

Reoxygenation-induced  $Ca^{2+}$  rise is mediated via  $Ca^{2+}$  influx and  $Ca^{2+}$  release from the endoplasmic reticulum in cardiac endothelial cells.

Cardiovasc Res, 2007, 73: 164-171

**Peters S C, Reis A, Noll T**

Preparation of endothelial cells from micro- and macrovascular origin.

In: Cell Culture Techniques, 2005: 610-629

**Petrosillo G, Ruggiero F M, Di Venosa N, Paradies G**

Decreased complex III activity in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion: role of reactive oxygen species and cardiolipin.

The FASEB Journal, 2003, 17: 714-716

**Piper H M, Spahr R, Mertens S, Krützfeld A, Watanabe H.**

Micovascular endothelial cells from heart.

In: Piper HM, editor, Cell culture techniques in heart and vessel research,

Heidelberg: Springer, 1990, pp. 158-177

**Piper H M, Garcia-Dorado D, Ovize M**

A fresh look at reperfusion injury.

Cardiovasc Res, 1998, 38: 291-300

**Piskernik C, Haindl S, Behling T, Gerald Z, Kehrer I, Redl H, Kozlov A V**

AntimycinA and lipopolysaccharide cause the leakage of superoxide radicals from rat liver mitochondria.

Biochim Biophys Acta, 2008, 1782(4): 280-285

**Rodney E, Shackelford, Kaufmann W K, Paules R S**

Oxidative Stress and cell cycle checkpoint function

Free Radic Biol & Med, 2000, 28: 1387-1404

**Rota C, Chignell C F, Mason R P**

Evidence for free radical formation during the oxidation of 2-7-Dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2-7-Dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: Possible implications for oxidative stress measurements.

Free Radic Biol & Med, 1999, 27(7/8):873-881

**Saini-Chohan H K, Dhalla N S**

Attenuation of ischemia-reperfusion-induced alterations in intracellular  $Ca^{2+}$  in cardiomyocytes from hearts treated with N-acetylcysteine and N-mercaptopyrionylglycine.

Can J Physiol Pharmacol, 2009, 87(12): 1110-1119

## Literatur

### **Saraste, M**

Oxidative phosphorylation at the fin de siècle.  
Science, 1999, 283 (5407): 1488-1493

### **Sato H, Takeo T, Liu Q, Nakano K, Osanai T, Suga S, Wakui M, Wu J**

Hydrogen peroxide mobilizes  $\text{Ca}^{2+}$  through two distinct mechanisms in rat hepatocytes  
Acta Pharmacol Sin, 2009, 30 (1): 78-89

### **Schäfer C, Ladilov Y V, Siegmund B, Piper H M**

Importance of bicarbonate transport for protection of cardiomyocytes against reoxygenation injury.  
Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000, 278: H1457-H1463

### **Schäfer C, Walther S, Schäfer M, Dieterich L, Kasseckert S, Abdallah Y, Piper HM**

Inhibition of contractile activation reduces reoxygenation-induced endothelial gap formation.  
Cardiovasc Res, 2003, 58(1): 149-55

### **Schäfer M, Bahde D, Bosche B, Ladilov Y, Schäfer C, Piper H M, Noll T**

Modulation of early  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  rise in metabolically inhibited endothelial cells by xestospongine C.  
Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001, 280: H1002-H1010

### **Schinetti M L, Sbarbati R, Scarlattini M**

Superoxide production by human umbilical vein endothelial cells in an anoxia-reoxygenation model.  
Cardiovasc Res, 1989, 23: 76-80

### **Schultz G, Rosenthal W, Hescheler J**

Role of G proteins in calcium channel modulation  
Annu Rev Physiol, 1990, 52: 275-292

### **Schwall C T, Greenwood V L, Alder N N**

The stability and activity of respiratory Complex II is cardiolipin-dependent.  
Biochim Biophys Acta, 2012, doi: 10.1016/j.bbabi.2012.04.015

### **Slot J W, Geuze H J, Freeman B A, Crapo J D**

Intracellular localization of the copper-zinc and manganese superoxide dismutases in rat liver parenchymal cells.  
Lab Invest 1986, 55: 363-371

### **Sohn H Y, Krotz F, Gloe T, Keller M, Theisen K, Klauss V, Pohl U**

Differential regulation of xanthine and NAD(P)H oxidase by hypoxia in human umbilical vein endothelial cells. Role of nitric oxide and adenosine  
Cardiovasc Res, 2003, 58: 638-646

**Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, des Rosiers MH, Patlak XS, Pettigrew KD, Sakurada O, Shinohara M.**

The [<sup>14</sup>C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: Theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J Neurochem* 1977, 28: 897-916

**Spahr R, Krützfeldt A, Mertens S, Siegmund B, Piper H M**

Fatty acids are not an important fuel for coronary microvascular endothelial cells. *Mol Cell Biochem*, 1989, 88 (1-2): 59-64

**Staubesand J**

Bau und Funktion der Blutgefäße.

In: Benninghoff Anatomie. 15. Auflage. Urban & Springer, München 1994

**Suval W D, Durin W N, Borik M P, Hobson R W, Bendersen P B, Ritter A B**

Microvascular transport and endothelial cell alterations preceding skeletal muscle damage in ischemia and reperfusion injury.

*Am J Surg*, 1987, 154: 211-218

**Szadujkis-Szadurska K, Szadujkis-Szadurski R, Szadujkis-Szadurski L, Grzeń G, Stupski M, Matusiak G, Glaza I, Gajdus M**

The role of calcium in modulating the reactivity of the smooth muscle cells during ischemia/reperfusion. Part 2.

*Postepy Hig Med Dosw*, 2010; 64: 195-200

**Tatton L, Morley G M, Chopra, Khwaja A**

The Src-selective kinase inhibitor PP1 also inhibits Kit and Bcr-Abl tyrosine kinases.

*J Biol Chem*. 2003, 278: 4847-4853

**Tauskela J S**

MitoQ – a mitochondria-targeted antioxidant.

*I Drugs* 2007, 10 (6): 399-412

**Therade-Matharan S, Laemmel E, Duranteau J, Vicaut E.**

Reoxygenation after hypoxia and glucose depletion causes reactive oxygen species production by mitochondria in HUVEC.

*Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004, 287: R1037-R1043

**Tran Q-K, Ohashi K, Watanabe H**

Calcium signaling in endothelial cells.

*Cardiovasc Res*, 2000, 48: 13-22

**Trump B F, Berezsky I K**

Calcium-mediated cell injury and cell death.

*The FASEB Journal*, 1995, 9: 219-228

## Literatur

**Turrens J F,**

Mitochondrial formation of reactive oxygen species; Topical Review.  
J Physiol, 2003, 552.2: 335-344

**Turrens J F, Alexandre A, Lehninger A L**

Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria.  
Arch Biochem Biophys, 1985, 237(2): 408-414

**Ueda N, Shah S V**

Role of intracellular calcium in hydrogen peroxide-induced renal tubular cell injury.  
AJP - Renal Physiol, 1992, 263 (2): F214-F221

**Ullrich A, Schlessinger J**

Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity.  
Cell, 1990, 61: 203-212

**Unterluggauer H, Hampel B, Zwerschke W, Jansen-Dürr P**

Senescence-associated cell death of human endothelial cells: the role of oxidative stress.  
Exp Gerontology, 2003, 38: 1149-1160

**Usachev Y M, Marchenko S M, Sage S O**

Cytosolic calcium concentration in resting and stimulated endothelium of excised intact rat aorta.  
J Physiol, 1995, 489.2: 309-317

**Vanden Hoek T L, Quin Y, Wojcik K, Li C-Q, Shao Z-H, Anderson T, Becker L B, Hamann K J**

Reperfusion, not simulated ischemia, initiates intrinsic apoptosis injury in chick cardiomyocytes.  
Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 284: H141-H150

**Walder C E, Green S P, Darbonne W, Mathias J, Rae J, Dinauer M, Curnutte J T, Thomas G R**

Ischemic stroke injury is reduced in mice lacking a functional NADPH oxidase.  
Stroke, 1997, 28: 2252-2258

**Wang H, Joseph J A**

Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader.  
Free Radic Biol& Med, 1999, 27(5/6): 612-616

**Wang X-T, McCullough K D, Wang X-J, Carpenter G, Holbrook N J,**

Oxidative stress-induced phospholipase C- $\gamma$ 1 activation enhances cell survival.  
J Biol Chem, 2001, 276(30/27): 28364-28371

**Watanabe H, Kuhne W, Spahr R, Schwartz P, und Piper H M**

Macromolecule permeability of coronary and aortic endothelial cells under energy depletion.  
Am J Physiol, 1991, 260: H1344-H1352

**Webb R C**

Smooth muscle contraction and relaxation.  
Advan in Physiol Edu, 2003, 27: 201-206

**Wikström M**

Two protons are pumped from the mitochondrial matrix per electron transferred between NADH and ubiquinone.  
FEBS 1984, 169 (2): 300-304

**Wongmekiat O, Thamprasert K, Lumlertgul D**

Renoprotective effect of trolox against ischemia-reperfusion injury in rats.  
Clin Exp Pharmacol Physiol 2007, 34 (8): 753-759

**Wysolmerski R B, Lagunoff D**

Inhibition of endothelial cell retraction by ATP depletion.  
Am J Pathol, 1988, 132 (1)

**Yellon D M, Hausenloy D J**

Myocardial reperfusion injury.  
N Engl J Med 2007, 357: 1121-1135

**Ylitalo K V, Ala-Rämi A, Liimatta E V, Peuhkurinen K J, Hassinen I E**

Intracellular free calcium and mitochondrial membrane potential in ischemia/reperfusion and preconditioning.  
J Mol Cell Cardiol 2000, 32, 1223-1238

**Zhang D X, Zou A-P, Li P-L,**

Ceramide-induced activation of NADPH oxidase and endothelial dysfunction in small coronary arteries.  
Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 284: H605-H612

**Zweier J L, Ruppusamy P, Luty G A**

Measurement of endothelial cell free radical generation: Evidence for a central mechanism of free radical injury in postischemic tissues.  
Proc. Nati. Acad. Sci. USA 1988, 85: 4046-4050

## 8 Anhang

### 8.1 Geräte und Messapparatur, Laborbedarf und eingesetzte Substanzen

#### Gerätebedarf

Analysesoftware TILLvision	Tillvision, Martinsried
CCD Kamera	Bio Rad, Hercules, USA für Western-Blot-Analysen
Dampfdrucktopf	All American, Canada
Deckel für Glasgefäße	Alltrista, USA
Dreiwege-Perfusionshahn SSI 8002-0127	Latek, Eppelheim
Druckminderer 200 bar für Stickstoff	Kayser
Edelstahlkapillare 1/16" x 1,2mm 8020-8033	Latek, Eppelheim
Glasgefäße	All American, Canada
Inverses Mikroskop IX70	Olympus, Hamburg
Lichtquelle: Monochromator Polychrome IV	Tillvision, Gräfelfing
Magnet-Heizrührer	Jahnke und Kunkel, Staufen
Neubauer-Zählkammer	Superior, Marienfeld
Nylonnetz	NeoLab, Heidelberg
Perfusionsheizung	Eigenbau der Werkstatt des Physiologischen Institutes der JLU-Gießen
Perfusionskammer	Eigenbau der Werkstatt des Physiologischen Institutes der JLU-Gießen
pH-Meter	WTW, Weinheim
Rollerpumpe	Gilson – Abimed, Langenfeld
Schläuche für Rollerpumpe	Gilson, Middleton, USA
TILL IMAGO-QE CCD Kamera (1376 x 1040 Pixel)	Tillvision, Gräfelfing
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Wasserdemineralisierungsanlage	Millipore, Eschborn
Zentrifugen	Kendro, Hanau

#### Laborbedarf

Benzonase	Merck KGaA, Darmstadt
Collagenase CLSII	Biochrom AG, Berlin
Deckgläschen #1, Ø 25mm	Menzler Gläser, Schwerte
Deckgläschen Ø 42mm	Saur Laborbedarf, Reutlingen
DL-Cysteine	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

## Anhang

Dulbecco's PBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Douncer	Scherf Praezision GmbH, Meiningen-Dreissigacker
DYNAL® Magnetic Beads	Invitrogen, Karlsruhe
DynaMag™-2	Invitrogen, Karlsruhe
ECL-Entwicklerreagenz - SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
Ethanol	Roth, Karlsruhe
FBS	PAA, Pasching, Österreich
Folin-Ciocalteu'sches Phenolreagenz	Merck, Darmstadt
Invitrolon™ PVDF	Invitrogen, Karlsruhe
Kulturschalen Falcon (3cm, 10cm)	Becton Dickinson, Heidelberg
M199	Biochrom, Berlin
MagicMark™ XP Western Protein Standard	Invitrogen, Karlsruhe
Methanol (>99,9% für HPLC)	Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Milchpulver	Applichem, Darmstadt
NCS	Biochrom AG, Berlin
NuPAGE® Antioxidant	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® MES/MOPS SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® Novex Bis-Tris Gel (4-12 %, 1,5 mm, 10 Wells)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® Reducing Agent (10x)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® Transfer Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Ponceau-S-Lösung	Serva, Heidelberg
PowerEase® 500 Power Supply	Invitrogen, Karlsruhe
Quantity One®	Molecular Dynamics, Krefeld
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (0,5/2 ml)	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Resazurin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen, Karlsruhe
Sigma Phosphatase Cocktail 2	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Stickstoff 5.0	Linde Gas deutschland, Pullach
t-BHP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris	Merck, Darmstadt
Trockenpapier	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Trypsin-EDTA 0,05%	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin	Biochrom AG, Berlin
Tween 20	Amersham, Braunschweig
Xcell SureLock™ Mini-Cell System	Invitrogen, Karlsruhe

## Anhang

XCell II™ Blot Module  
Zellschaber (Typ Falcon)

Invitrogen, Karlsruhe  
Becton Dickinson, Heidelberg

### Eingesetzte Substanzen

#### Bezeichnung

Antimycin A  
Apocynin  
Atractyloside  
Decyl TPP Bromide  
2-Deoxy-D-Glucose  
DPI  
MitoQ®  
N-(2-mercapto-propionyl)glycine  
N-Acetyl-L-cysteine  
Oligomycin A  
Pepstatin  
PP1  
PP2  
PP3  
Rotenon  
SU 6656  
t-BHP  
Thenoyl Trifluoroacetone  
Trolox

#### Hersteller

Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt  
Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt  
Santa Cruz Biotechnology, Inc  
Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
Antipodean Pharmaceuticals  
Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt  
Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
Sigma-Aldrich, Taufkirchen

### Antikörper

Anti-Kaninchen-IgG HRP-gekoppelt  
sc-81 PLCγ1 Antikörper  
Tyr783 Phospho-PLCγ1

Amersham Biosciences, Freiburg  
Santa Cruz Biotechnology, Inc  
CellSignalingTechnology, Danvers, USA

### Fluoreszenzfarbstoffe

Fura-2, AM (*F-1221*)  
JC-1 (*T-3168*)  
Mag-Fura-2, AM (*M-1292*)  
H<sub>2</sub>DCFDA (*10058*)

Invitrogen, Karlsruhe  
Invitrogen, Karlsruhe  
Invitrogen, Karlsruhe  
Biotium, Hayward

## Anhang

### Ansatz der Fluoreszenzfarbstoffe

#### **Fura-2, AM** (MW: 1001.86 g/mol)

fura-2, AM 50 µg

DMSO 30 µl

*Stammlösung (1,6 mM),*

#### **JC-1** (MW: 652.0 g/mol),

JC-1 5 mg

DMSO 1 ml JC-1 Stammlösung 1 (7,7 mM)

JC-1 Stammlösung 1 (7,7 mM) 10 µl

DMSO 50 µl

*Stammlösung 2 (1,5 mM),*

#### **Mag-Fura-2, AM** (MW: 722.57 g/mol)

mag-fura-2, AM 50 µg

DMSO 69,16 µl

*Stammlösung (1,0 mM),*

#### **H<sub>2</sub>DCFDA** (MW: 487,29 g/mol)

H<sub>2</sub>DCFDA 100 mg

DMSO 1,026 ml H<sub>2</sub>DCF-Stammlösung 1 (200 mM)

*Stammlösung 1 (200 mM)* 50 µl

DMSO 950 µl

*Stammlösung 2 (5 mM),*

Alle Stammlösungen wurden bei -20 °C lichtgeschützt gelagert.

## 8.2 Protokoll für die Proteinbestimmung

Lösung 1: Natrium-Kalium-tartrat (NaKC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> · 4H<sub>2</sub>O)

3,3 g in 100 ml Aqua bidest. lösen

Lösung 2: Kupfersulfat (CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O)

1,25 g in 100 ml Aqua bidest. lösen

Lösung 3: Natriumcarbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> wasserfrei)

25 g in 1000 ml Aqua bidest. lösen

Lösung 4: 1 M NaOH

4 g NaOH in 100 ml Aqua bidest. lösen

Lösung 5: Folin-Ciocalteu'sches Phenolreagenz

22,73 ml ad 100 ml Aqua bidest.

## Anhang

### Vorbereitung:

Reagenz A herstellen: 100 µl Lösung 1 + 100 µl Lösung 2 ad 10 ml mit Lösung 3, gut mischen. Proben werden (je nach erwarteten Proteinkonzentrationen) in der Regel 1:5 verdünnt (10 µl Probe + 40 µl aqua bidest)

### Standardreihe:

- BSA abwiegen (10 mg/ml) und Standardreihe erstellen
- 200 µl der BSA-Lösung auf 5 ml mit Aqua bidest. auffüllen (400 µg BSA/ml)

<b>0mg/ml</b>	<b>0,02mg/ml</b>	<b>0,04mg/ml</b>	<b>0,08mg/ml</b>	<b>0,12mg/ml</b>	<b>0,16mg/ml</b>	<b>0,2mg/ml</b>	<b>Konzentration</b>
-	5 µl	10 µl	20 µl	30 µl	40 µl	50 µl	<b>BSA-Lösung</b>
50 µl	45 µl	40 µl	30 µl	20 µl	10 µl	-	<b>Aqua bidest.</b>

### Durchführung:

- 50 µl verdünnte Probe bzw. 50 µl der Standards
- + 50 µl Lösung 4 gut mischen,
  - nach 3 min 400 µl Reagenz A zufügen und gut mischen,
  - 10 min bei Raumtemperatur inkubieren,
  - Zugabe von 100 µl Lösung 5,
  - nochmals gründlich mischen,
  - 30 min bei Raumtemperatur inkubieren,
  - jeweils 200 µl der Probe luftblasenfrei in eine Microtiterplatte pipettieren,
  - am Photometer bei 578 nm messen.

## **8.3 Tierschutzrechtliche Voraussetzungen**

Die im Rahmen dieser Studie eingesetzten Tiere wurden gemäß §4 Abs. 3 TierSchG (Tötung zu wissenschaftlichen Zwecken) eingesetzt und entsprechend den gesetzlichen Bestimmungen am Ende des jeweiligen Kalenderjahres der zuständigen Behörde gemeldet.

## **8.4. Erklärung**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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.

Frankfurt, den 03.04.2013

Jessica Hornung

## 8.5 Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Dr. Piper für die Bereitstellung des Themas und der Möglichkeit zur Durchführung dieser Doktorarbeit an seinem Institut. Ich bin außerdem sehr dankbar, dass er die Betreuung meiner Arbeit auch noch als Rektor der Heinrich – Heine – Universität in Düsseldorf weitergeführt hat. Seine Anregungen und seine hilfreiche Kritik waren für die Anfertigung dieser Dissertation sehr wertvoll.

Besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Peters und bei Herrn Professor Dr. Diener für die intensive Unterstützung und nette Betreuung bedanken, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Es war sehr hilfreich jederzeit bereitwillige wissenschaftliche Ratschläge zu bekommen und offene Fragen diskutieren zu können.

Ferner danke ich allen technischen und akademischen Mitarbeitern des Physiologischen Instituts.

Ich möchte außerdem auch allen anderen danken die mir durch ihre Unterstützung bei der Korrektur der vorliegenden Dissertation oder auf andere Art und Weise eine große Hilfe waren: Meinem Mann Jürgen Hornung, meiner Familie und Freunden.