

***Bedeutung cholinergischer Rezeptorstimulation während der  
Ischämie für die postischämische Erholung und das  
frühe Postinfarktremodeling***

Andreas Westerfeld

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

Gießen 2013



***Bedeutung cholinergere Rezeptorstimulation während der Ischämie für  
die postischämische Erholung und das frühe Postinfarktremodeling***

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

vorgelegt von Andreas Westerfeld  
aus Hadamar

Gießen 2013

Aus dem Institut für Physiologie  
Arbeitsgruppe für Herz - und Kreislaufforschung  
Direktor: Prof. Dr. R. Schulz  
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. K.-D.Schlüter

Gutachter: Prof. Dr. D. Sedding

Tag der Disputation: 30.04.2014

## **Inhalt**

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1. GESCHICHTE DER HERZ- UND KREISLAUFFORSCHUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.2. DIE INNERVATION DES HERZENS</b>	<b>6</b>
<b>1.3. FUNKTION UND AUFBAU MUSKARINERGER UND NIKOTINERGER REZEPTOREN</b>	<b>9</b>
1.3.1. NIKOTINERGE REZEPTOREN	<b>9</b>
1.3.2. MUSKARINERGE REZEPTOREN	<b>10</b>
<b>1.4. MUSKARINERGE REZEPTOREN IM VENTRIKELMYOKARD UND DEREN EFFEKTE AUF DAS HERZ</b>	<b>11</b>
<b>1.5. FRAGESTELLUNG</b>	<b>13</b>
<b>2. MATERIAL</b>	<b>14</b>
<b>2.1. CHEMIKALIEN</b>	<b>14</b>
2.1.1. PRIMER	<b>16</b>
<b>2.2. GERÄTE UND LABORBEDARF</b>	<b>16</b>
2.2.1. ALLGEMEINE VERWENDETE GERÄTE/VERBRAUCHSMATERIALIEN	<b>16</b>
2.2.2. SPEZIELLE VERWENDETE GERÄTE/VERBRAUCHSMATERIALIEN	<b>16</b>
<b>2.3. VERBRAUCHSMATERIAL</b>	<b>18</b>
<b>2.4. TIERBEDARF</b>	<b>18</b>
<b>2.5. EDV</b>	<b>18</b>
<b>3. METHODEN</b>	<b>19</b>
<b>3.1. PERFUSION ISOLIERTER RATTENHERZEN</b>	<b>19</b>
3.1.1. DAS PRINZIP DER PERFUSION ISOLIERTER RATTENMHERZEN NACH O. LANGENDORFF	<b>19</b>
3.1.2. DER GRUNDLEGENDE AUFBAU DER LANGENDORFF-ANLAGE	<b>19</b>
3.1.3. DAS PERFUSAT	<b>20</b>
3.1.4. DIE VERSUCHSTIERE	<b>21</b>
3.1.5. DIE PRÄPARATION	<b>21</b>
3.1.6. DIE KALIBRIERUNG DER MESSAPPARATUR	<b>22</b>

3.1.7. VERSUCHE	22
3.1.7.1. VERSUCHE UNTER FLUSSKONSTANTEN BEDINGUNGEN	22
3.1.8. ERFASSUNG DER PHYSIOLOGISCHEN PARAMETER	23
3.1.9. VERSUCHSPROTOKOLL	24
<b>3.2. ISOLIERUNG VENTRIKULÄRER KARDIOMYOZYTEN AUS ADULTEN RATTEN</b>	<b>25</b>
3.2.1. VERSUCHSTIERE	25
3.2.2. PRÄPARATION VON HERZMUSKELZELLEN ADULTER RATTEN	25
<b>3.3. ZELLKULTUR</b>	<b>27</b>
3.3.1. VOR- UND AUSPLATTIERUNG	27
3.3.2. KURZZEITKULTUREN DER ISOLIERTEN KARDIOMYOZYTEN	27
<b>3.4. MESSUNG VON MYOKARDZELLKONTRAKTIONEN IM ELEKTRISCHEN FELD</b>	<b>28</b>
3.4.1. PROBENVORBEREITUNG	28
3.4.2. ELEKTRISCHE STIMULATION UND STEUERUNG DER MYOKARDZELL- KONTRAKTIONEN	28
3.4.3. AUFBAU DER MESSAPPARATUR	29
3.4.4. MESSPROTOKOLL	32
3.4.5. AUSWERTUNG DER KONTRAKTIONSPARAMETER	33
3.4.6. DARSTELLUNG DER EXPERIMENTIERERERGEBNISSE	33
3.4.7. ZELLERNTE	33
<b>3.5. FURA-2-AM-IMAGING</b>	<b>35</b>
3.5.1. APPARATIVE VORAUSSETZUNGEN	35
3.5.2. VORBEREITUNG DER ZELLEN	35
3.5.3. MESSUNG	36
3.5.4. AUSWERTUNG	36
<b>3.6. GELEKTROPHORETISCHE METHODEN</b>	<b>37</b>
3.6.1. DIE SDS-POLYACRYLAMID-GELEKTROPHORESE	37
3.6.2. WESTERN-BLOT-VERFAHREN	39
3.6.3. IMMUNOLOGISCHE NACHWEISVERFAHREN	40
3.6.2. AUSWERTUNG	42
<b>3.7. REAL TIME PCR IM ICYCLER®</b>	<b>43</b>
3.7.1. RNA-ISOLIERUNG AUS ADULTEN RATTENHERZEN	43

3.7.2. BESTIMMUNG DER RNA-KONZENTRATION	43
3.7.3. cDNA-SYNTHESE	44
3.7.4. REAL-TIME POLYMERASE-KETTEN-REAKTION (REAL-TIME PCR)	44
3.7.4.1. EINFÜHRUNG IN DIE METHODE	44
3.7.4.2. DURCHFÜHRUNG DER METHODE	47
3.7.4.2.1. PRIMERAUSWAHL	47
3.7.4.2.2. REAL-TIME PCR-ANSATZ	48
3.7.4.2.3. PCR-LAUFPROGRAMME	49
3.7.4.2.4. REAL-TIME PCR-AUSWERTUNG	51
<b>3.8. PROTEINBESTIMMUNG IM PERFUSAT</b>	<b>52</b>
3.8.1. DURCHFÜHRUNG DER MESSUNG	52
3.8.2. AUSWERTUNG	52
<b>3.9. STATISTIK</b>	<b>53</b>
<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>54</b>
<b>4.1. UNTERSUCHUNGEN AN ISOLIERT PERFUNDIERTEN RATTENHERZEN</b>	<b>54</b>
4.1.1. WIRKUNG VON CARBACHOL AUF DIE FUNKTIONELLE ERHOLUNG NACH ISCHÄMIE	55
4.1.1.1. POSITIVER EINFLUSS VON CARBACHOL AUF DAS LVDP-RECOVERY	57
4.1.1.2. POSITIVER EINFLUSS VON CARBACHOL AUF DIE LINKSVENTRIKULÄRE ENDDIASTOLISCHEN FUNKTIONSWERT	59
4.1.1.3. EINFLUSS VON CARBACHOL AUF DAS „RATE-PRESSURE-PRODUKT“	60
4.1.2. WIRKUNG VON CARBACHOL AUF DIE INFARKTGRÖßE	61
4.1.3. ISOPRENALIN-ANSPRECHBARKEIT DER MIT CARBACHOL BEHANDELTEN HERZEN	63
<b>4.2. EFFEKT VON CARBACHOL AUF DIE FRÜHE mRNA EXPRESSIONSVERÄNDERUNG IM LINKEN VENTRIKEL</b>	<b>64</b>
<b>4.3. EFFEKT VON CARBACHOL AUF ISOLIERTE POSTISCHÄMISCHE KARDIOMYOZYTEN</b>	<b>66</b>
4.3.1. WIRKUNG VON CARBACHOL AUF DIE LÄNGENSPEZIFISCHE LÄNGEN- ÄNDERUNG ISOLIERTER POSTISCHÄMISCHER KARDIOMYOZYTEN	66
<b>4.5. EINFLUSS VON CARBACHOL AUF DIE SERCA2A- UND PHOSPHOLAMBAN- EXPRESSION</b>	<b>69</b>

<b>5. DISKUSSION</b>	<b>71</b>
<b>5.1. HAUPTBEFUNDE</b>	<b>72</b>
5.1.1. WIRKUNG VON CARBACHOL AUF DAS ÜBERLEBENDE RESTMYOKARD	73
<b>5.2. BEHANDLUNG VON KARDIOMYOZYTEN MIT CARBACHOL FÜHRT ZU EINER     VERBESSERTEN ZELLFUNKTION BEI NIEDRIGEN SCHLAGFREQUENZEN</b>	<b>73</b>
<b>5.3. DIE ROLLE VON CARBACHOL ALS PRÄKONDITIONIERUNGSSTIMULUS</b>	<b>76</b>
<b>5.4. KEIN FUNKTIONELLER POSITIVER EFFEKT BEI DER NUTZUNG VON CARBACHOL     MITTELS PHARMAKOLOGISCHER POSTKONDITIONIERUNG</b>	<b>77</b>
<b>5.3. EINFLUSS VON CARBACHOL AUF DAS POST-INFARKT REMODELLING</b>	<b>77</b>
<b>6. SCHLUSSFOLGERUNG</b>	<b>78</b>
<b>7. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>79</b>
<b>8. SUMMARY</b>	<b>80</b>
<b>9. ABKÜRZUNGEN</b>	<b>81</b>
<b>10. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>84</b>
<b>11. POSTER</b>	<b>90</b>
<b>12. ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION</b>	<b>91</b>
<b>13. DANKSAGUNG</b>	<b>92</b>

## **1. Einleitung**

### **1.1. Geschichte der Herz- und Kreislaufforschung**

Die Anatomie und Physiologie des Herzens interessiert den Menschen seit Anbeginn der Zeit. Ein annähernd genaues Bild des Herzens und des Blutkreislaufes ergab sich aus den zu Beginn des 2. Jahrhunderts durchgeführten Untersuchungen durch den letzten bedeutenden Arzt seiner Epoche, Galenus von Pergamon (um 129-199 n.Chr.). Die Lehre Galens basierte auf dem `Corpus Hippocraticum` des wohl berühmtesten Arztes, Hippokrates von Kos (460-375 v.Chr.). Hippokrates selbst beschäftigte sich nicht mit dem Blutkreislauf, dafür aber mit einem auf Harmonie basierenden Krankheitskonzept (Boenheim, 1957). Nach der Vorstellung von Hippokrates gibt es im Körper vier Säfte: das Blut (sanguis), die gelbe Galle (choley), die schwarze Galle (melancholey) und den Schleim (phlegma). Das Ungleichgewicht dieser Säfte sollte, nach der Theorie des Hippokrates, bei dem Menschen zur Krankheit führen. Galen verknüpfte diese Viersäftelehre mit der Lehre des Empodekles (495 v.Chr. – 435 v. Chr.). Die Lehre von den vier Urstoffen der antiken Medizin entwickelte sich über die Vorstellungen des Philistion von Lokroi, der auf die Bedeutung der vier Elemente im menschlichen Körper einging, zu einem weiteren Bild für die Erklärung von Krankheiten (Longrigg, 1993). So war sich Galen wie auch andere Philosophen zuvor bereits darüber im Klaren, dass sich Blut in unserem Gefäßsystem befindet. Durch seine Vivisektionen an Hunden ergab sich jedoch ein neues physiologisches Bild, welches bis weit in das 17. Jahrhundert galt. So konnte er Erasistratos (305 v.Chr. – 250 v. Chr.) widerlegen, der die Meinung vertrat, dass die Arterien kein Blut aus dem Herzen enthielten. Nach Galens Auffassung stammten alle blutführenden Venen von der Leber, dem Zentrum des venösen Systems und alle blut- und luftführenden Arterien vom Herzen ab. „Dennoch hatte er eine ganz andere Vorstellung von der Pulsation als wir. Danach kontrahierten sich Herz und Arterien gleichzeitig, und Ausdehnung und Zusammenziehen der Arterien waren gesonderte, aktive Bewegungen.“ (Porter, 2003) So floss das Blut in den Venen nach seiner Auffassung in beide Richtungen. Das Vorhandensein von Venenklappen wurde verneint. Eine Blutzirkulation im eigentlichen Sinne konnte somit keine wirkliche Rolle spielen. Diese Erkenntnisse hielt er in seinem Handbuch über den Puls fest. Erst Andreas Vesalius (1514-1564) sollte erkennen, dass Galen niemals einen menschlichen Körper seziiert hatte und daher einige

der Vorstellungen Galens aufgrund der anatomischen Unterschiede zwischen Schwein, Affe und Mensch falsch sind. „Dabei wurde Vesalius von Tag zu Tag deutlicher, dass Galen offenbar keine Menschen, sondern überwiegend Rhesusaffen präpariert hatte. So hatte Galen einen Lendenwirbelfortsatz beschrieben, den der Anatom Vesal nur am Affenskelett finden konnte.“ (Groß und Keil, 2003)

Der arabische Arzt Ibn An Nafis (13. Jahrhundert) bezweifelte bereits früher die Theorien Galens und skizzierte den kleinen Blutkreislauf korrekt in seinen Aufzeichnungen. Allerdings spielten diese für die arabische und spätere Wissenschaft keine Rolle (Rotschuh, 1953).

Dies sieht man auch daran, dass die im Jahre 1315 erfolgte erste dokumentierte Leichenöffnung in Bologna durch Mondino di Luzzi (1275-1326) unter dem Einfluss der Lehre Galens geschah. Mondino di Luzzi veröffentlichte ein Buch, welches zum Standardwerk der Anatomie wurde. Jedoch stützte sich dieses Buch wieder auf die Theorien Galens und enthielt somit die fehlerhaften Schlussfolgerungen aus den Tiersektionen wie zum Beispiel das Herz mit den drei Kammern. Dennoch war dies ein bedeutender Schritt zur Förderung und Weiterentwicklung der anatomischen Untersuchungen an toten Menschen. Bis zu Mondino spielte die Anatomie nur eine untergeordnete Rolle in der medizinischen Ausbildung. So wurden in der Medizinschule in Salerno immer noch Schweine sezirt. Es galt lange Zeit als gesichert, dass dies an der Vormachtstellung der Kirche lag. Jedoch ist die Meinung, dass im Mittelalter das Hantieren mit menschlichen Überresten unbekannt war, durch mindestens zwei Punkte widerlegbar. So wurden die Leichname der gefallenen Kreuzritter so lange gekocht, bis nur noch die Knochen vorhanden waren und das Herz konserviert, um sie dann in der Heimat zu beerdigen. „Zudem waren seit etwa 1250 Autopsien in italienischen, französischen und deutschen Städten gang und gäbe.“ (Porter, 2003)

Wenn man an die menschliche Anatomie denkt, so kommt man an einem wichtigen Vertreter der Renaissance nicht vorbei. Leonardo da Vinci (1452-1519) war ein Universalgelehrter, der jedoch keine medizinische Vorbildung hatte. Trotzdem beschäftigte er sich ausgiebig mit der Anatomie des Menschen. Darüber hinaus ist auch bekannt, dass er tatsächlich menschliche Körper zerlegte, um die anatomischen Strukturen zu ergründen. So schien er bereits Erkenntnisse zum kleinen Blutkreislauf und der Arbeitsweise der Venenklappen erlangt zu haben. Dennoch blieb auch er der Tradition treu und schloss sich der Lehre Galens an. Ganz in seiner Funktion als

Ingenieur erklärte er jedoch als Erster die Herzfunktion als hydrodynamisch-mechanisch, womit er der Physiologie des Herzens schon näher kam.

Die bekannten `Tabulae anatomica sex` des Andries van Wesel, auch Vesalius genannt, sind einige der frühesten anatomischen Darstellungen, die speziell für Studenten angefertigt wurden. Allerdings war Vesalius zu diesem Zeitpunkt noch der Lehre Galens treu, sodass das abgebildete Herz das eines Affen war. Andries van Wesel beurteilte Galens Lehre aufgrund seines eigenen anatomischen Wissens mit der Zeit zunehmend kritischer. Er begann die anatomischen Zeichnungen zu hinterfragen und musste feststellen, dass Galen wohl nur Tiere seziierte. So bestehe der Unterkiefer zum Beispiel nur aus einem Knochen und nicht, wie Galen lehrte, aus zweien. Für ihn war es offensichtlich: „Die Anatomie des Menschen musste man an der Leiche, nicht durch tote Sprache lernen.“ (Porter, 2003)

So begann Vesalius Leichname hingerichteter Krimineller zu sezieren. Das Ergebnis seiner Untersuchungen war das bekannte Werk `De humani corporis fabrica libri septem`, welches erstmals systematisch die Lehre Galens kritisierte und berichtigte. Es konnte der Irrtum ausgeräumt werden, dass das Kammerseptum des Herzens permeabel sei und das Blut nicht durch Kanäle von der rechten in die linke Kammer gelange, wie es Galen lehrte. Dieser Widerspruch ermutigte auch Anatomen wie Realdo Colombo (1515-1559) und William Harvey (1578-1657), weiter an dem Blutkreislauf zu forschen.

Dennoch wurde auch Vesalius durch Realdo Colombo vorgeworfen, dass er seine anatomischen Beschreibungen von Tieren habe, diese aber als die von Menschen ausgebe. Dies fand Colombo vor allem durch seine Vivisektionen heraus. So wurde endgültig die Undurchlässigkeit des Kammerseptums für Blut festgeschrieben. Ebenso konnte auch die Auffassung berichtigt werden, dass in den Lungenvenen nur Luft zirkuliere. Colombo widerlegte hier Vesalius und konnte zeigen, dass der Kontakt von Blut und Luft in der Lunge hergestellt wird und nicht, wie bisher gelehrt, in der linken Herzkammer. Für die Herzphysiologie spielte die Beschreibung und Untersuchung des Herzschlages eine große Rolle. Die Theorien William Harveys stützten sich darauf, dass Colombo die Systole, also die Kontraktion des Herzmuskels als kraftaufwendige Arbeit beschrieb, während die Diastole durch die passive Erschlaffung des Herzmuskels dominiert wird.

Das berühmte Werk `Exercatio anatomica de motu et sanguinis in animalibus` aus dem Jahre 1682 von Wilhelm Harvey erfasst zum ersten Mal korrekt den Kreislauf des Blutes. Den Motor stellt das Herz dar, welches das Blut durch die Lunge und den Körper pumpt. „Denn das ist durch Überlegungen und augenfällige Versuche gesichert, dass das Blut durch die Lunge und das Herz hindurchgeht entsprechend dem Schlag der Kammern [...] Notwendig ist der Schluss, dass das Blut in bestimmter Bewegung kreist [...].“ (Aschoff, 1938)

Als Wegbereiter der modernen Physiologie stützte Harvey seine Ergebnisse auf sorgfältig durchgeführte Tierexperimente. Der Beobachtung des schlagenden Herzens von innen und außen folgte die Unterbindung herznaher Gefäße bei Schlangen und Fischen. Durch Verwendung von Kaltblütern bei den Untersuchungen waren Experimente in Zeitlupe möglich, da deren Herzen langsamer schlagen (Porter, 2003). Bei Harveys durchgeführten Ligaturversuchen am Unterarm des Menschen zog er durch den Ort der Schwellung Schlüsse auf den Blutfluss in dem legierten Gefäß. Die Kreislaufdarstellung Harveys ist jedoch rein mechanisch und enthält keine physikalischen und chemischen Ansatzpunkte. So diente seiner Meinung nach der Herzimpuls ausschließlich der Überwindung der Eigenbewegung des Blutes und der Revitalisierung der Blutkörperchen.

Der Weg der Herzforschung im 17. und 18. Jahrhundert sollte von den philosophischen Spekulationen hin zu wissenschaftlichen Erkenntnissen in der Medizin, gestützt durch Mathematik, Physik und Mechanik führen.

Der Körper des Menschen wurde zunehmend als mechanische Maschine verstanden und die Forschung danach ausgerichtet. Ein Ziel war es aus diesem Grund, medizinisch relevante Messgrößen zu gewinnen, um so bessere Rückschlüsse auf die Arbeitsweise ziehen zu können. So beschäftigte sich zum Beispiel Santorio Santorio (1561-1636) mit dem Puls und der Möglichkeit, diesen zu messen. Zur Bestimmung der Herzarbeit ging Stephan Hales (1677-1761) noch weiter und führte blutige Druckmessungen in Arterien von Pferden mittels eines Steigrohres durch. Die Idee des Herzens als automatisch tätiges Organ verfasste Giovanni Alfonso Borelli (1608-1679) in seinem Buch `De matu animalium` als Erster. Hierzu wandte er die mechanischen Prinzipien auf physiologische Fragestellungen an (Boenheim, 1957).

Obwohl noch keine Erkenntnisse zu dem Reizleistungssystem des Herzens bestanden, beschrieb er es als spontan schlagendes Organ. Ebenfalls die Elastizität der herznahen

Arterien, welche unter Dehnung das Blut des Herzens aufnehmen und dieses durch die Kontraktion ihrer Muskelwände in die Peripherie drücken, hielt er erstmals fest. Die Beschreibung der Windkesselfunktion dieser herznahen Arterien kann somit auf ihn zurückgeführt werden, wenn auch erst Ernst Heinrich (1792-1862) und Wilhelm Eduard Weber (1804-1891) entsprechende Messungen durchführten und den Begriff prägten.

Über die folgenden Jahrhunderte entwickelten sich viele Gegentheorien zu den bisher etablierten Lehrgrundsätzen, was auf die jeweiligen geistigen Strömungen, zum Beispiel in der Romantik, zurückzuführen ist.

Dennoch konnten diese widerlegt und für unser Verständnis maßgebliche Ergebnisse erzielt werden. Beispielhaft sind hier die Beschreibungen von Jean Louis Marie Poiseuille (1799-1869) zu nennen, der mittels eines Hämodynamometers die Grundlagen des Hagen-Poiseuille Gesetzes schaffte, welche für die Medizin im 21. Jahrhundert immer noch eine große Rolle spielten.

Die Grundlagen der Elektrophysiologie und damit für das Verständnis der Erregungsbildung und –ausbreitung im Herzmuskel legte der Italiener Luigi Galvani (1737-1798). Er beschrieb in seinem Buch `De viribus electricitatis in motu musculari`, dass Elektrizität und Muskelbewegung offensichtlich zusammengehören und durch Elektrizität Leben stimuliert werden könnte. Diese Erkenntnisse wurden dann durch andere Wissenschaftler wie Alessandro Volta (1745-1827) aufgegriffen und konkretisiert.

Parallel dazu entwickelte sich das Interesse an der Pathologie von Erkrankungen weiter, sodass im Jahre 1799 Caleb Hillier Parry (1755-1822) seine `Untersuchungen der Symptome und Ursachen der syncope anginosa` (Parry, 1799) herausbrachte.

Der deutsche Pathologe Karl Albert Ludwig Aschoff (1866-1942) beschäftigte sich, neben der Entstehung des Erregungsbildungssystem des Herzens, mit dem pathologischen Aspekt der Angina pectoris und der Arteriosklerose. Die erhöhten Anforderungen an den Blutkreislauf durch einen größeren Sauerstoffbedarf von Warmblütern im Vergleich zu Kaltblütern machte im Laufe der Phylogenese eine anatomische und funktionelle Zweiteilung des Herzens in Vorhöfe und Kammern nötig. Um bei einem solch komplizierten System die Funktionsabläufe in den einzelnen Teilen zu gewährleisten, war ein abgestimmtes Reizleitungssystem notwendig (Habermehl, 1984).

## 1.2. Die Innervation des Herzens

So müssen sich im Rahmen der Herzaktion die Vorhöfe vor der Kammermuskulatur kontrahieren, um einen suffizienten Blutfluss aufrecht zu erhalten. Als übergeordneter Schrittmacher identifizierten Arthur Keith (1866-1955) und Martin Flack (1882-1931) zwischen 1900 und 1910 den Sinusknoten (Flack). Durch die Vorüberlegung über die elektrische Verbindung der Herzmuskelzellen konnte Flack den Sinusknoten erstmals beschreiben (Keith).

Auch wenn die elektrische Ableitung der Zellen im Sinusknoten erst 1952 durch Wolfgang Trautwein (1922-2011) erfolgte, stellte dies einen Meilenstein in der Erforschung der Herzerregung dar (Trautwein und Zink, 1952). Der 3 mm dicke und 10 mm lange Nodus sinuatrialis liegt subepikardial im Sulcus terminalis unterhalb der Einmündung der Vena Cava. Im Knoten findet man zwei Zelltypen. Zum einen die Transitionszellen, welche die P-Zellen mit dem Arbeitsmyokard verbinden. Zum anderen die pacemaker Zellen oder auch P-Zellen, denen die Schrittmacherfunktion zugeordnet wird. Diese Zellen werden durch muskarinerge Acetylcholinrezeptoren (M2) gesteuert. Dabei bewirkt Acetylcholin eine Öffnung der Kaliumkanäle, sogenannter HCN-Kanäle oder 'funny channels', und somit eine Verlängerung der Depolarisationszeit (Benninghoff 2008).

Bereits Otto Loewie (1873-1961), ein Pharmakologe aus Graz, hatte dies vermutet. Während eines nächtlichen Traumes entwickelte er ein entscheidendes Experiment. Durch Straub-Kanülen, an denen er die Froschherzen zur Perfusion befestigte, blieben diese vital. Eines der Herzen wurde mit seinen Nerven, das andere ohne diese aufgehängt. Durch die Straub-Kanülen floss Ringerlösung, die von dem ersten Herz in das zweite Herz überführt wurde. Nach vagaler Reizung des ersten Herzens sank die Schlagfrequenz des zweiten Herzens ab, so, als ob auch dessen Vagus gereizt wurde. Er folgerte daraus, dass die Nerven das Herz nicht direkt beeinflussen, sondern ihrerseits spezifische chemische Substanzen abgeben, die dann an den Zellen wirken (Loewi 1924). Die Vermutung, dass Acetylcholin der Transmitter sei, wurde im Jahre 1933 durch Henry Hallet Dale (1875-1968) und Wilhelm Siegmund Feldberg (1900-1993) bestätigt. Des Weiteren wurden noch andere Stoffe identifiziert, die dann ihrerseits aufgrund ihrer Wirkung auf den Organismus dem sympathischen und parasympathischen Nervensystem zugeordnet wurden (Hodgkin, 1977).

Von dem Sinusknoten ausgehend wird das umliegende Myokard erregt und so die Kontraktion der Vorhofmuskulatur angeregt. Über die Crista terminalis verläuft eine der vielen schnellen Erregungsleitungsbahnen zum Aschoff-Tawara-Knoten. Diese als Thorell- oder Wenkebachbündel beschriebenen Bahnen konnten bisher allerdings nur elektrophysiologisch und nicht anatomisch nachgewiesen werden.

Der Artrioventrikularknoten (AV-Knoten) besteht ebenfalls aus Myokardmuskulatur, welche an der Basis des Kammerseptums im Koch-Dreieck liegt. Seine wesentliche physiologische Aufgabe ist die Verzögerung der Erregungsleitung zwischen Vorhof und Ventrikel um 60-120 Sekunden. Dadurch kann eine ausreichende Entleerung der Vorhöfe in die Ventrikel gewährleistet werden. Somit stellt er den zweiten anatomischen Abschnitt des Erregungsleitungssystems dar. Zwischen dieser und der von Wilhelm His (1831-1904) 1893 entdeckten Struktur finden sich die vier Anuli fibrosi, die das Herzskelett bilden. Durch ihre Bindegewebsstruktur bilden sie für die elektrischen Ströme einen zu großen Widerstand, sodass es nicht zu einer Erregung der Kammer durch die Vorhöfe kommt. Nur durch das His-Bündel im Zusammenspiel mit dem AV-Knoten kann dieses Herzskelett überwunden werden. Im Bereich des Trigonum perforiert das AV-Bündel ausgehend vom Aschoff-Tawara-Knoten das Herzskelett und bildet das His-Bündel (His 1949). Von dort ausgehend ziehen zwei Kammerschenkel in die Ventrikel. Der annähernd fächerförmige, linke Kammerschenkel teilt sich nach seinem nahezu senkrechten Abgang aus dem His-Bündel in drei Faszikel auf, die ihrerseits die umliegende Kammermuskulatur erregen. Im Gegensatz dazu teilt sich der rechte Schenkel nicht auf.

Diese Erkenntnisse wurden vor allem durch die Entwicklung und Anwendung des Elektrokardiogramms (EKG) am Menschen durch Willem Einthoven (1860-1927) gefördert. Durch das EKG konnten die elektrischen Vorgänge am Herzen sichtbar gemacht werden.

Im Ventrikelmyokard von Huftieren konnten 1839 durch den Breslauer Anatom Jan Evangelista Purkyně (1787-1869) „subendokardiale, knorpelähnliche Zellen“ nachgewiesen werden. Als Purkinje-Fasern findet man solche auch im menschlichen Myokard. Die Fasern sind beim Menschen allerdings myofibrillenreicher und durch die Connexine 40 und 43 besonders leitfähig.

Diese Fakten beschrieben die beiden Wissenschaftler Eyster und Meek in einigen Werken wie “Experiments on the origin and propagation of the impulse in the heart -

the point of primary negativity in the mammalian heart and the spread of negativity to other regions”, in denen sie die komplette Erregungsübertragung im Herzen beschreiben (Eyster and Meek, 1914).

Durch dieses Erregungsleitungssystem und dem übergeordneten Schrittmacher, dem Sinusknoten, hat das Herz einen Grundrhythmus, der sich jedoch nicht an die hämodynamischen Erfordernisse in Ruhe oder bei körperlicher Anstrengung anpasst. Durch sogenannte Herznerven können die Schlagfrequenz (chronotrope Wirkung), Kraftentfaltung (inotrope Wirkung), Erregungsleitung (dromotrope Wirkung) und Erregbarkeit (bathmotrope Wirkung) beeinflusst werden.

Die beiden Systeme, die diese Einflussnahme steuern, sind das sympathische und parasympathische Nervensystem. Der Sympathikus bildet die Nervi cardiaci cervicalis superior, medius und inferior aus. Diese projizieren ihre postganglionären Fasern auf den Sinusknoten, AV-Knoten, Purkinje-Faser-Bündel und Myokard der Vorhöfe und Ventrikel (Benninghoff, 2008). So bewirkt der Sympathikus am Herz eine Erhöhung der Schlagfrequenz, Kontraktionskraft, Erregungsleitung und Erregbarkeit. Im Gegensatz dazu erfolgt die Einflussnahme des Parasympathikus durch den linken und rechten Nervus Vagus. Beide haben negativ chronotrope, dromotrope und bathmotrope Effekte am Herzen.

So steht der Sinusknoten als Schrittmacher des Herzens in Ruhe unter dem hemmenden Einfluss des Nervus Vagus (Vagotonus). In den durchgeführten Experimenten (Otto Leowie et al., 1924) führte eine Durchtrennung des rechten Herzvagus zu einer Frequenzsteigerung.

Der zweite funktionell wichtige Angriffspunkt des Nervus Vagus ist der AV-Knoten. [...] Acetylcholin [führt] am AV-Knoten zu einer Verminderung der Anstiegssteilheit im Aktionspotenzial, d. h. zu einer zusätzlichen Verzögerung der Erregungsausbreitung von den Vorhöfen auf die Ventrikel [...] (Klinke und Bauer, 2005).

So kann es bei einer sehr starken Stimulation der beiden Nervi Vagi zu einer vollständigen Blockierung der Überleitung von den Vorhöfen auf den AV-Knoten kommen. Ein kurzfristiger Herzstillstand ist die Folge, welcher bis zum Einsetzen eines untergeordneten Schrittmacherzentrums, z. B. den Purkinje-Faden, besteht.

Die derzeit gültige Lehrmeinung besagt, dass das Muskelgewebe des Herzens nicht durch cholinerge Rezeptoren stimuliert werden kann (Klinke und Silbernagel, 2005). Ebenso wird ein parasympathisches postganglionäres Nervenfasersystem

ausgeschlossen. Der Parasympathikus habe seinen dominierenden Einfluss auf der Ebene der Vorhöfe und nicht wie der Sympathikus auch im Ventrikel.

### **1.3. Funktion und Aufbau muskarinerger und nikotinerger Rezeptoren**

Neue Untersuchungen zeigten, dass das Herzendothel und die Kardiomyozyten verschiedene cholinerge Rezeptoren, die dem Parasympathikus zugeordnet werden, an ihrer Oberfläche exprimieren (Doods et al. 1989; Hosey et al., 1992, Sterin-Borda et al., 1995; Macklin et al., 1998; Moccia et al., 2004). Es gibt zwei cholinerge Rezeptortypen: die muskarinergen und nikotinergeren Rezeptoren.

#### **2.1.1. Nikotinerge Rezeptoren**

Dieser membranständige nikotinschen Acetylcholinrezeptor findet sich in verschiedenen Bereichen des Nervensystems und der motorischen Endplatten. Der Rezeptor gehört zu der Gruppe der ligandengesteuerten Ionenkanälen. Nicht nur Acetylcholin (ACh) ruft eine Aktivierung hervor, sondern auch Nikotin. Daher werden auch alle Substanzen, die an diesen Rezeptor binden, als nikotinerger klassifiziert (Macklin et al., 1998).

Diese Rezeptorgruppe ist schon länger genauer untersucht worden. Dies geschah vor allem im Bereich der neuromuskulären Endplatte. Hier werden zwei ACh-Moleküle benötigt, die an den Rezeptor binden, um den Ionenkanal zu öffnen. In seiner Funktionsweise ist er damit mit dem ionotropen Serotonin-(5-HT<sub>3</sub>)-Rezeptor, dem Glycin- und GABA<sub>A</sub>-Rezeptor verwandt.

Sein Aufbau ist durch die zylindrischen Transmembranproteine geprägt. Diese bestehen aus fünf Untereinheiten (2x  $\alpha$ 1-,  $\beta$ 1-,  $\gamma$ -,  $\delta$ -Untereinheit), welche jeweils viermal die Zellmembran durchziehen. Genauere genetische Sequenzierungen haben ergeben, dass die  $\alpha$ -Untereinheit sogar aus acht Untertypen besteht, welche einfach durchnummeriert wurden. Durch diese Vielzahl von Untereinheiten, die jeweils immer einen Rezeptor bilden können, ergeben sich viele verschiedene Rezeptorisoforamen. Diese zeichnen sich durch unterschiedliche pharmakokinetische Eigenschaften und eine spezifische Verteilung im Körper aus. Vereinfacht kann von einem Neuronen- oder einem Muskeltyp gesprochen werden, je nach der Lage des Rezeptors (Shepherd, 2004).

### 2.1.2. Muskarinerge Rezeptoren

Die muskarinischen Acetylcholinrezeptoren gehören zu der Gruppe der G-Proteingekoppelten Rezeptoren. Wie auch bei den nikotinergen Rezeptoren kann auch der muskarinerge Rezeptor nicht nur durch Acetylcholin aktiviert werden, sondern auch durch Muskarin (Hosey et al., 1992).

Der Aufbau des aus 400-500 Aminosäuren bestehenden Rezeptors unterscheidet sich völlig von dem des nikotinergen Rezeptors. Die Aminosäurekette durchspannt die Zellmembran mit sieben Transmembrandomänen, wobei das aminoternale Ende extrazellulär und das carboxyterminale Ende intrazellulär liegt. Intrazellulär ist der Rezeptor an ein Guanosin triphosphat- (GTP)- bindendes Protein gekoppelt. Dieses ist für die Signaltransduktion verantwortlich und gibt dem Rezeptor den Namen G-Proteingekoppelter Rezeptor (Numa 1989).

Ebenso wie auch bei den nikotinergen Rezeptoren findet man bei den muskarinergen verschiedene Isoformen mit einer unterschiedlichen Pharmakokinetik, die von  $M_1$  bis  $M_5$  durchnummeriert wurden.

Im ersten Schritt der Aktivierung der muskarinergen Rezeptoren wird über ein G-Protein die membranständige Phospholipase C (PLC) aktiviert. Dieses Enzym spaltet von dem Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $PIP_2$ ), das ein Bestandteil der Zellmembran ist, das Inositoltrisphosphat ( $IP_3$ ) ab. Dieses diffundiert dann in das Cytoplasma, während das Diacylglycerin (DAG) in der Zellmembran verbleibt. Das freigesetzte  $IP_3$  bewirkt nun die Entleerung von  $Ca^{2+}$  aus dem endoplasmatischen Retikulum, wodurch eine Vielzahl von biochemischen Prozessen gestartet wird. Durch Anlagerung der Proteinkinase C unter Mitwirkung von  $Ca^{2+}$  wird die katalytische Domäne des Enzyms aktiviert. Das ATP kann nun Zellproteine phosphorylieren. Dies startet weitere Mechanismen in der Zelle. Diese beiden Systeme können sowohl unabhängig als auch sich gegenseitig verstärkend arbeiten.

Dieser Reaktionsweg weicht allerdings bei den für uns wichtigen  $M_2$ -Rezeptoren im Herzen ab. Zwei mögliche Reaktionswege können bisher unterschieden werden:

Erstens wird durch ein inhibitorische  $G_i$ -Protein die Adenylcyclase inhibiert und damit der Spiegel des Cykloadenosinmonophosphates (cAMP) gesenkt. Dies bewirkt einen hemmenden Einfluss auf den HCN-Kanal („funny channel“). Dieser Ionenkanal beeinflusst den  $Na^+$ -Einwärtsstrom am Anfang der Depolarisation. Er hat damit einen wichtigen Einfluss auf den Schrittmacherstrom (Peralta et al., 1987).

Zweitens aktiviert dieser Rezeptor ein G-Protein, das den rezeptorgesteuerten Kaliumkanal (G protein activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel; GIRK) aktiviert, wodurch eine größere Anzahl an K<sup>+</sup> aus der Zelle herausströmen. Dies hat wiederum eine Hyperpolarisation der Zelle zur Folge. Das Ruhepotential wird somit negativer, stabiler und entfernt sich weiter von dem Schwellenpotential. Die Zelle ist dann schwerer depolarisierbar (Sterin-Borda et al., 1995).

Diese Erkenntnisse warfen jedoch weitere Fragen auf: Warum exprimieren Endothel und Herzmuskelzellen des Ventrikel ebenfalls solche Rezeptoren, wenn diese gar nicht parasympathisch innerviert sind? Wie können diese Rezeptoren dort aktiviert werden und was bewirkt diese Aktivierung genau?

#### **1.4. Muskarinerge Rezeptoren im Ventrikelmyokard und deren Effekte auf das Herz**

In den vergangenen Jahren wurde zunehmend ein nicht-neuronales System in vielen Geweben beschrieben (Wessler and Kirkpatrick, 2008). Dies gelang durch den Nachweis des Vesikulären-Acetylcholin-Transporters (VAChT) in den unterschiedlichen Geweben. So konnte gezeigt werden, dass Herzmyozyten und mikrovasculäre Gefäße des Herzens von Ratten regelrecht mit VAChT-innerviert sind. Schäfer et al. vermuteten sogar: „Visualization of cholinergic terminal fields of the heart reveals dense cholinergic innervation of the ventricles, suggesting a greater functional and, possibly, clinical significance for the parasympathetic nervous system in control of ventricular function than previously envisaged“ (Schäfer et al., 1998).

Dennoch ist nur sehr wenig über die Freisetzung des nicht-neuronalen Acetylcholins aus den Herzzellen bekannt. Durch eine 60-minütige Ischämie des Herzens bei narkotisierten Katzen konnte ein erhöhter interstitieller ACh-Spiegel in dem ischämischen Myocard nachgewiesen werden (Kawada et al., 2000). Weiterhin konnte belegt werden, dass diese Ergebnisse auch bei isolierten Rattenherzen zu erzielen seien, da dort ebenso wenig eine vagale Innervation bestehe, wie bei den durch Kawada durchgeführten Experimenten mit den beschriebenen Ergebnissen. Des Weiteren wurde auf den positiven Effekt von Präkonditionieren für das interstitielle ACh-Niveau hingewiesen. Nachdem bereits Dawson und Dawson 2000 auf die Rolle des Präkonditionieren für den Körper und das Herz hingewiesen hatten, konnte Kawada

2001 durch das Präkonditionieren mit Phenylbiguaniden den Betzold-Jarisch-Reflex des Herzens imitieren und so eine erhöhte ACh-Konzentration in dem Kardiomyozyten messen (Kawada et al., 2002).

Seit 2005 ist bekannt, dass auch Acetylcholin eine solche präkonditionierende Wirkung auf das Herz während einer Ischämie hat. Dabei greift Acetylcholin nach Critz et al. in die komplexen intrazellularen Mechanismen ein. Vor allem sind hier die EGF-Rezeptoren, PI 3-Kinasen, Proteinkinase B und eNOS zu nennen, die einen Einfluss auf das Präkonditionieren mit Acetylcholin haben. Um diese Signaltransduktionswege zu aktivieren, muss eine gewisse Ischämiegröße überschritten werden, da es sonst zu keiner bzw. einer zu geringen Aktivierung kommt.

Aufgrund der Beobachtung, dass Acetylcholin während einer Ischämie freigegeben wird und sich die relative Menge durch ein vorangegangenes Präkonditionieren um ein Vielfaches erhöhen lässt, kann auch ein positiver Effekt bei postischämischen Herzen vermutet werden. Dabei würde sich der positive Effekt nicht nur auf die Infarktgröße beschränken lassen, sondern auch ein besseres post-ischämisches Recovery des vitalen Myokards bedeuten.

Im Zeitalter von immer älter werdenden Patienten hätte diese Wirkung einen zusätzlichen Nutzen. Neuere Forschungen konnten nämlich zeigen, dass mit zunehmendem Alter die cholinerge Hypersensibilität im Bereich der Koronarien, des Herzenergiehaushaltes und der kontraktilen Funktion zunimmt (Su and Narayanan, 1993). Leider werden in vielen Versuchsprotokollen keine älteren Tiere für die Präkonditionierungsexperimente verwendet, dabei könnte eine genauere Betrachtung der Effekte der cholinergen Stimulation nach Infarkt auch einen Einblick in alterungsrelevante Veränderungen in der Signaltransduktion geben. Weitere Erkenntnisse in diesem Bereich könnten also helfen, diese Patienten besser zu versorgen.

## 1.5. Fragestellung

Aus diesem Grund haben wir uns mit dem Parasympathomimetikum Carbachol, einem Strukturanalogon des Acetylcholins, beschäftigt und dessen Wirkung auf Post-Ischämische Herzen untersucht. Dabei spielte für uns eine große Rolle, dass Carbachol durch die Acetylcholinesterase nicht abgebaut werden kann.

So haben wir uns mit der Frage nach der

**Bedeutung cholinergischer Rezeptorstimulation während der Ischämie für die postischämische Erholung und das frühe Postinfarktremodeling**

beschäftigt.

Wir wollen damit zeigen, dass es möglich ist, die niedrigere Herzfunktion der Kardiomyozyten nach Infarkt durch eine cholinerge Rezeptorstimulation während der Ischämie auszugleichen.

Diese vorangestellten Überlegungen führten zu den hier im Detail bearbeiteten Fragestellungen:

1. Hat Carbachol einen positiven Einfluss auf die postischämische Herzfunktion adulter Rattenherzen?
2. Falls Aussage 1 korrekt: Beruht dies auf einer Reduzierung der Infarktgröße durch die Behandlung mit Carbachol?
3. Falls Aussage 1 korrekt: Welche Signalwege könnten für die positive, postischämische Herzfunktion verantwortlich sein?

## 2. Material

### 2.1. Chemikalien

6-Aminohexansäure	Merck, Darmstadt
Acrylamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose	qbiogene, Heidelberg
Albumin	Sigma, Taufkirchen
Ammoniumpersulfat	Serva, Heidelberg
5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat	Applichem, Darmstadt
8-bromo-cGMP	Sigma, Taufkirchen
Benzonase	Merck, Darmstadt
Bisacrylamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin	Roche Diagnostics, Mannheim
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
Calciumchlorid Dihydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Chlorophorm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Collagenase, Typ CLS II	Biochrom, Berlin
Cytosin- $\beta$ -Arabinofuranosid	Sigma, Taufkirchen
0,1 M Dithiotreitol	Invitrogen, Karlsruhe
Diethylether	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
EDTA-Natriumsalz	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol	Riedel de Haën, Seelze
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Fluka Marker 69813	Sigma, Taufkirchen
FURA-2 AM	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Gentamycin	Invitrogen, Karlsruhe
Glucose-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycin	Applichem, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
HEPES	Roche Diagnostics, Mannheim
Hydroxymethylfurylbenzylindazol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

L-Nitro-Arginin	Sigma, Taufkirchen
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Mercaptopropandiol	Merck-Suchard, Hohenbrunn
Methanol	Riedel de Haen, Seelze
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
MTT Tetrazolium	Sigma, Taufkirchen
dNucleotid Solution	Invitrogen, Karlsruhe
N-Acetyl-3-mercapto-D-valine	Sigma, Taufkirchen
Natriumvanadat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ortho-Phosphorsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
10x PCR Buffer minus Mg	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Roti Blotpuffer A und K	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
rRNAsin-RNase Inhibitor	Promega, Mannheim
iQTM SYBR® Green Supermix	Bio-Rad, München
Saccharose	Merck, Darmstadt
S-Nitroso-N-Acetylpenicillamin	Merck Bioscience GmbH
Sodiumdodecylsulfat	Merck, Darmstadt
TaqDNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Taurin	Sigma, Taufkirchen
Tetramethylethylenediamin	Sigma, Taufkirchen
Tris/HCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
TRIZOL-Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
W-1 (Detergenz)	Invitrogen, Karlsruhe

Alle übrigen Salze und Chemikalien wurden in der höchsten erhältlichen Qualität bei den Firmen Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roche Diagnostics (Mannheim), Calbiochem und Sigma (Taufkirchen) bezogen und verwendet.

Alle Chemikalien wurden nach Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt. Für Lösungen, Medien und Puffer wurde aqua bidest. als Lösungsmittel verwendet, falls dies nicht anders angegeben wurde.

### **2.1.1. Primer**

Alle eingesetzten Primer stammen von der Firma Invitrogen, Karlsruhe.

## **2.2. Geräte und Laborbedarf**

### **2.2.1. Allgemeine verwendete Geräte/Verbrauchsmaterialien**

aqua bidest.-Anlage	Millipore, Eschborn
Glasware	Schott, Mainz
Laborwaage	Sartorius AG, Göttingen
Magnet-Heizrührer	Jahnke & Kunkel, Staufen
Mischer/Schüttler	Heidolph, Kelheim
pH-Meter	WTW, Weilheim
Porzellanmörser	Fisher Scientifics, Schwerte
Techne Dri-Block® DB.2D	Techne AG, Burkhardtsdorf
Wasserbad (Typ: Julabo U3)	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Zellschaber Typ Falcon 3087	Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifugen	Kendro, Hanau

### **2.2.2. Spezielle verwendete Geräte/Verbrauchsmaterialien**

Langendorff-Apparatur	Eigenbau, Werkstatt physiologisches Institut, Giessen
Perfusionsheizung	Eigenbau
Brutschrank (Typ: Cytoperm)	Kendro, Hanau
Gewebehacker	Harvard Apparatus, March - Hugstetten

Nylonnetz (Porengröße 200 µm)	NeoLab, Heidelberg
Präparationsbesteck	Aeskulap, Heidelberg
Primaria Kulturschalen Falcon Typ 3803	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilbank (Typ: Lamin Air® HBB 2472)	Kendro, Hanau
Inverses Mikroskop Diaphot	TMD, Nikon, Düßeldorf
AR-Cation Measurement System	Spex Industries, Grasbrun
Photomultiplier	Spex Industries, Grasbrun
IBM PC / AT-based data Analyse System	Spex Industries, Grasbrun Modell DM3000CM
Videokamera	Sony, Frankfurt
Videoprinter	Sony, Frankfurt
iCycler	BioRad, München
Thermo Cycler	Techne Cyclogen
Spectrophotometer Ultrospec 2000	Pharmacia Biotech
Mikrotiterplatten-Photometer	Dynatech, Denkendorf
Elektroblotkammer	Biometra, Göttingen
Filterpapier	Biotec. Fischer, Reiskirchen
Hamiltonspritze (50 µl)	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Hoefel-Elektrophoresekammer (SE 600)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hoefel-Glasplatte	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hoefel-Plattenklemme	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hoefel-Profilformer	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hoefel-Spacer	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Immobilon P	Millipore, Eschborn
Netzgerät (Typ Biometra)	Biometrische Analytik, Göttingen

### **2.3. Verbrauchsmaterial**

Latexballon Größe 5	Harvard Apparatus, Qbiogene GmbH, Heidelberg
Leinen Operationszwirn Et. Nr. 40	Gruschwitz, Neu - Ulm
Pipettenspitzen	Eppendorf – Netheler – Hinz, Hamburg
Reaktionsgefäße (0,5/ 1,5/ 2,0 ml)	Eppendorf – Netheler – Hinz, Hamburg

### **2.4. Tierbedarf**

Standarddiät	Altromin, Lage - Lippe
Tiereinstreu Granulat	Altromin, Lage – Lippe

### **2.5. EDV**

Flachbettscanner Typ: Scan jet 4c	Hewlett Packard, Eschborn
Image-Quant®	Molecular Dynamics, Krefeld
Chart v4.2 Power Lab®	AD Instruments
Microsoft Excel® 2007	Microsoft Corp., USA
Microsoft Power Point® 2007	Microsoft Corp., USA
Microsoft Windows® 2007	Microsoft Corp., USA
Microsoft Word® 2007	Microsoft Corp., USA
SPSS 15.0 für Statistik	SPSS Inc., USA
Citavi	Swiss Academic Software

### **3. Methoden**

#### **3.1. Perfusion isolierter Rattenherzen**

##### **3.1.1. Das Prinzip der Perfusion isolierter Rattenherzen nach O. Langendorff**

Im Jahre 1895 entwickelte der Physiologe Oskar Langendorff (1853-1908) eine Methode zur physiologischen Untersuchung isolierter, schlagender Säugetierherzen. Bei diesem Prinzip wird das Herz retrograd über den Aortenstumpf perfundiert. Der daraus resultierende Perfusionsdruck verursacht den Verschluss der Aortenklappe, wie es auch unter physiologischen Bedingungen am Herzen in situ zu beobachten ist. Da durch den Verschluss das Perfusat nicht in den linken Ventrikel abfließen kann, wird es in die oberhalb der Aortenklappe liegenden Koronararterien umgeleitet. Dies wiederum sorgt für eine regelrechte Versorgung des Myokards. Bei intaktem Reizleitungssystem fängt das Herzpräparat unter diesen Bedingungen wieder spontan an zu schlagen. Das infundierte Perfusat fließt über den im rechten Vorhof liegenden Sinus Coronarius wieder ab. Bei diesem Prinzip bleiben die Ventrikel weitgehend leer (Döring und Dehnert 1985).

##### **3.1.2. Der grundlegende Aufbau der Langendorff-Anlage**

Die Langendorff-Anlage besteht aus einer geschlossenen Kammer, die über einen Warmwasserkreislauf auf 37°C aufgeheizt wird. Aus einem Reservoir gelangt das mit Carbogen-Sauerstoff begaste Perfusat durch einen Wärmetauscher, der dieses auf 37°C bringt, über eine Perfusionskanüle aus Edelstahl ( $\emptyset$  innen 1,8 mm; außen 3,0 mm) in die Herzen. Über eine Hahnenbank besteht die Möglichkeit, unterschiedliche Perfusate aus den verschiedenen Reservoiren zu zuführen. Zur Vermeidung von Lufteinschlüssen in den Herzen befindet sich über den Edelstahlkanülen eine Blasenfalle, über die bei Bedarf entlüftet werden kann. Das Perfusat wird, nachdem es die Herzen passiert hat, durch einen Trichter aufgefangen.

Dieses Prinzip wird als offene Perfusion bezeichnet, da das Perfusat nach der Passage verworfen wird.

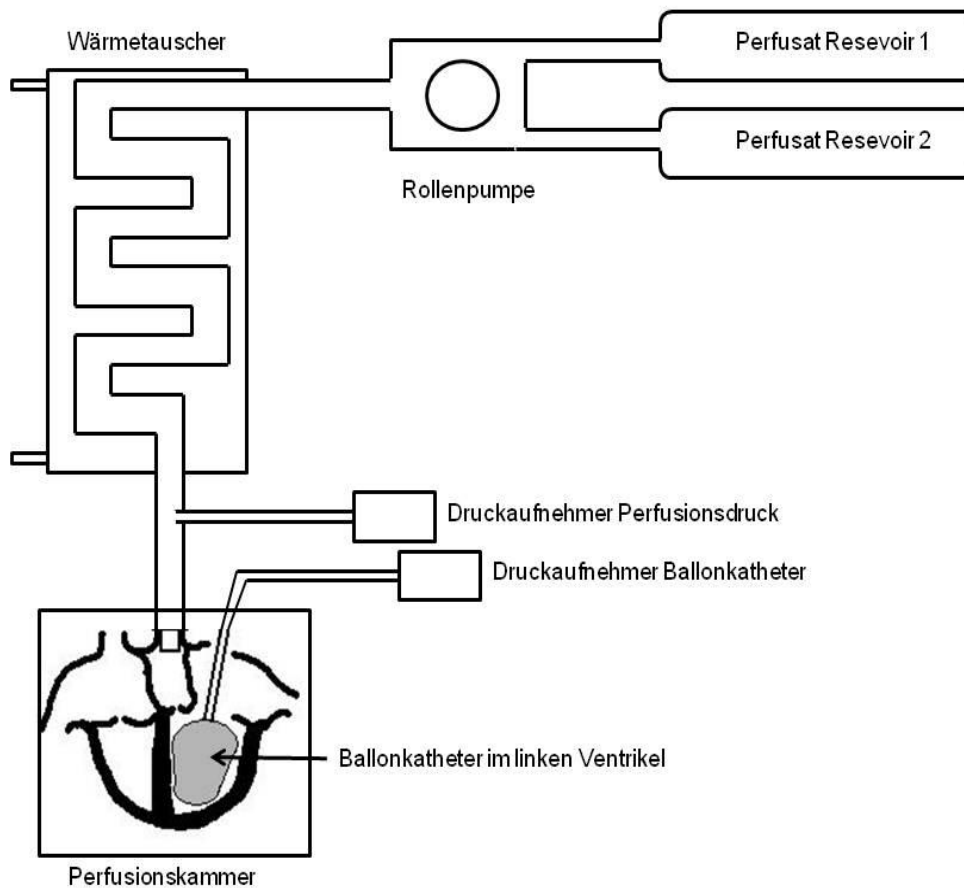


Abb. 3.1.: Aufbau der Langendorffanlage

Zur Messung der physiologischen Parameter sind der Latexballon, der in den linken Ventrikel eingebracht wird und die Perfusionskanüle mit einem Druckaufnehmer verbunden. Die gemessenen Daten werden über einen Computer protokolliert. Aufgezeichnet wird der Perfusionsdruck (PerfP) auch als diastolischer Aortendruck bezeichnet, der linksventrikuläre systolische (SysP) und der linksventrikuläre diastolische Druck (DiasP) sowie die Herzfrequenz (HF).

Die verwendete Langendorffanlage ist so konzipiert, dass zwei Herzen parallel untersucht werden können.

### 3.1.3. Das Perfusat

Bei dem hier verwendeten Perfusat handelt es sich um einen modifizierten Krebs-Henseleit Puffer. Durch die Begasung mit Carbogen (95% Sauerstoff und 5% Kohlenstoffdioxid) stellt sich bei 37°C ein pH von 7,4 ein. Die Referenzzusammensetzung lautet:

NaCl	140mM
KCl	2,7mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,4mM
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	1,0mM
Glucose	5,0mM
CaCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O	1,8mM
NaHCO <sub>3</sub>	24mM

#### **3.1.4. Die Versuchstiere**

Bei den Versuchstieren handelt es sich um drei bis vier Monate alte, ca. 220 ± 20g (Schwankungsbreite) schwere weibliche Wistar – Hannover – Ratten. Die Tiere wurden im Tierstall des Physiologischen Instituts der Justus – Liebig - Universität nach den Richtlinien der „Principles of Laboratory animal care“ (National Institutes of Health 1985) und in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz gehalten. Die Haltung der Tiere wurde durch die lokalen Tierschutzbeauftragten überwacht. Wasser und Standardfutter (Altromin®) standen den Tieren ad libidum zur Verfügung.

#### **3.1.5. Die Präparation**

Nachdem die Ratten durch eine Diethylethernarkose in einen Zustand tiefer Bewusstlosigkeit versetzt und dieser Zustand mittels des Cornealreflexes und des Muskeltonus überprüft wurde, wurden die Tiere durch Genickbruch getötet. Nach dem Eröffnen des Abdomens und dem Abtrennen des Zwerchfells konnte das Herz – Lungen – Paket entnommen werden. Dabei war darauf zu achten, dass ein möglichst langes Stück Aorta am Herz verblieb und die kleinen Abgänge des Aortenbogens nicht rissen. Die entnommenen Organe wurden möglichst schnell in eine Petrischale mit physiologischer 4-5°C Kochsalzlösung gegeben, um die Stoffwechselprozesse des Herzens zu verringern und eine Ischämie zu verhindern. Unter diesen Bedingungen konnten nun die Lungenflügel abgetrennt und die Aorta dargestellt werden. Dazu wurde diese in Höhe des Aortenbogens vorsichtig vom Thymus freipräpariert und Reste des Ösophagus, der Trachea und der Lungenvenen/ -arterien entfernt. Nach dem Absetzen

des Aortenbogens in der Höhe des Abgangs der linken Arteria Carotis Communis konnte das Herz an der Perfusionskanüle mit einer Krokodilklemme befestigt werden. Es folgte die endgültige Befestigung mit Operationszwirn (Nr. 40), wobei auf eine richtige Lage der Perfusionskanüle geachtet werden musste, damit die Funktion der Aortenklappe nicht beeinflusst und die Coronararterien gut perfundiert werden konnten. Seit dem Anhängen des Herzens an die Kanüle wurde dieses bereits mit erwärmten und begasten Standardpuffer versorgt. Zu Beginn betrug die Flussrate 2,5ml/min und wurde während der Stabilisierungsphase auf einen Fluss eingestellt, der einem Perfusionsdruck von 50mmHg entspricht. Nach der Darstellung des linken Vorhofs konnte der Latexballon (Gr. 5) in den linken Ventrikel eingeführt werden. Es folgte die Durchführung der Experimente (Münzel et al., 2011).

### **3.1.6. Die Kalibrierung der Messapparatur**

An jedem Versuchstag wurde die Anlage auf den Umgebungsdruck kalibriert, um Messfehler auszuschließen. Dazu wurden zuerst die mit den Druckaufnehmern verbundenen Leitungen von Luftblasen befreit, indem mit Aqua. bidest die Schläuche gespült wurden. Anschließend folgte die Kalibrierung auf den Umgebungsluftdruck als Normalnull. Durch ein erhöht gelagertes Gefäß, das mit einem Schlauchsystem mit dem System verbunden war, wurde der Wert 100mmHg Wassersäule vorgegeben.

### **3.1.7. Versuche**

#### **3.1.7.1. Versuche unter flusskonstanten Bedingungen**

Eine Änderung des Coronarengewidstandes durch Kontraktion der glatten Muskulatur der Coronararterien hat eine umgekehrt proportionale Änderung des coronaren Perfusionsdruckes (CPP) zur Folge (Döring und Dehnert, 1985).

*Perfusionsdruck  $\approx$  Gefäßwiderstand/ Perfusatfluss (konstant)*

Bei der hier angewandten flusskonstanten Perfusion wurde der coronare Perfusatfluss durch die zwischengeschaltete Rollenpumpe nach Erreichen des angestrebten Perfusatsdruckes in der Stabilisierungsphase den gesamten Versuch konstant gehalten.

In der Stabilisierungsphase wurde die Flussrate langsam so angepasst, dass diese einem Perfusionsdruck von 50mmHg entsprach. Ebenso wurde durch eine Erhöhung der

Füllung in dem Latexballon der diastolische Druck auf 10-12mmHg gebracht. Dies ist der physiologische diastolische Druck des Herzens in situ.

Der Perfusionsdruck von 50mmHg entspricht nicht dem physiologischen Druck, welchem das Herz in situ ausgesetzt ist. Allerdings wäre ein Perfusionsdruck von 70-90mmHg für das isolierte Herz zu hoch gewesen. Aus drei Gründen wurde ein Perfusionsdruck von 50 mmHg gewählt. Zum einen ist der Strömungswiderstand der Standardperfusionslösung um etwa 50% geringer als der von Vollblut oder Plasma, daher wäre der Fluss bei physiologischem Perfusionsdruck auch doppelt so hoch. Zum anderen könnte durch die unphysiologische dauernde Belastung die Aortenklappe dem Druck nicht standhalten. Zuletzt würde ein höherer Perfusionsdruck die Entstehung von Gewebsödemen aufgrund des fehlenden kolloidosmotischen Druckes noch zusätzlich forcieren. Durch ständiges Anpassen der Fluss- und Druckverhältnisse erreichten die gemessenen Herzparameter ein stabiles Plateau und der Versuch konnte gestartet werden.

Jetzt konnte je nach Protokoll dem Herzen unterschiedliche Substanzen, die dem Perfusat gelöst waren, zugeführt werden.

### **3.1.8. Erfassung der physiologischen Parameter**

Bei den durchgeführten Versuchen wurden standardmäßig fünf physiologische Parameter erfasst: Der Perfusatfluss, der Perfusionsdruck, die Herzfrequenz und der systolische sowie der diastolische Druck. Der Perfusatfluss konnte an dem Flowmeter abgelesen werden. Durch ein mit Aqua. bidest. gefülltes Kathetersystem, welches oberhalb der Perfusionskanüle mit dieser in Verbindung stand, konnte an einem Druckaufnehmer der Perfusionsdruck abgegriffen werden. Ähnlich funktionierte auch die Messung der linksventrikulären Drücke und der Herzfrequenz. Der ebenfalls mit aqua bidest. gefüllte Latexballon (Gr.5) war ebenfalls mit einem Druckaufnehmer verbunden. Wie bereits oben erwähnt, wurde der Ballon durch Füllen auf einen Grundwert von 10-12mmHg gebracht und während des restlichen Versuches das Volumen konstant gehalten. Die gemessenen Impulse der Druckaufnehmer wurden durch einen Analog-Digital-Wandler transformiert und an einen PC übermittelt. Dieser errechnete aus den Daten dann auch die Herzfrequenz. Ein weiterer errechneter Wert ist der linksventrikulär entwickelte Druck (LVDP), der der Differenz aus systolischem und diastolischem Druck entspricht.

### 3.1.9. Versuchsprotokoll

Alle durchgeführten Versuche an der Langendorffapparatur hatten den gleichen groben Versuchsablauf. Nach der Stabilisierungsphase folgte eine Perfusionsphase, an die sich nach einer Auswaschphase eine Ischämiephase anschloss. Die Reperfusion wurde mit einer Perfusion von Isoprenalin abgeschlossen. Als Zeitpunkt Null wurde der Beginn der Ischämie gewertet. Zum Vergleich wurde jeweils ein Kontroll- und ein behandeltes Herz in der Langendorffapparatur untersucht.

Folgende Versuchsgruppen wurden in dieser Arbeit untersucht:

	Stabilisierungsphase	Einwaschen	Auswaschen	Ischämie	Reperfusion	Isoprenalin
<b>Kontrolle</b>				45min	120min	3min
<b>Carbachol 100pM (0min auswaschen)</b>		3min		45min	120min	3min
<b>Carbachol 100nM (0min auswaschen)</b>		3min		45min	120min	3min
<b>Carbachol 100nM (3min auswaschen)</b>		3min	3min	45min	120min	3min
<b>Carbachol 100nM (5min auswaschen)</b>		5min	5min	45min	120min	3min
	Stabilisierungsphase	Ischämie	Einwaschen	Reperfusion	Isoprenalin	
<b>IPoC Postconditioning</b>		45min	3min	120min		
<b>PPoC Postconditioning +Isoprenalin (Iso)</b>		45min	3min	120min	3min	

### 3.2. Isolierung ventrikulärer Kardiomyozyten aus adulten Ratten

#### 3.2.1. Versuchstiere

Die Herzmuskelzellen für den Versuch wurden aus adulten weiblichen Wistar-Ratten (Lebendgewicht 250-300g) isoliert. Die aus dem Tierstall des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen stammenden Tiere erhielten freien Zugang zu Nahrung (Standardfutter Altromin) und Wasser (siehe 3.1.4.).

#### 3.2.2. Präparation von Herzmuskelzellen adulter Ratten

Die gesamte Präparation und Isolierung der Kardiomyozyten erfolgte wie bereits zuvor durch Schlüter und Schreiber im Jahre 2005 beschrieben. Die hierzu verwendete spezielle Perfusionsanlage wurde zu Beginn mit Aqua. bidest gespült und luftblasenfrei mit Powellmedium befüllt.

Nach der Durchführung eines Standardversuchs (3.1.) an der Langendorff-Perfusions-Anlage wurde das Herz an eine Einzelherzperfuionsanlage überführt. Dabei wurde auf Blasenfreiheit geachtet. Nach einer sicheren Befestigung an der Perfusionsanlage erfolgte die Perfusion mit insgesamt 50ml Powellmedium. Dazu wurden 5ml Powellmedium mit 25mg Kollagenase (chargenabhängig) und 12,5 $\mu$ l CaCl<sub>2</sub> vermischt und zu den 45ml Powellmedium in der Einzelherzperfuionsanlage gegeben.

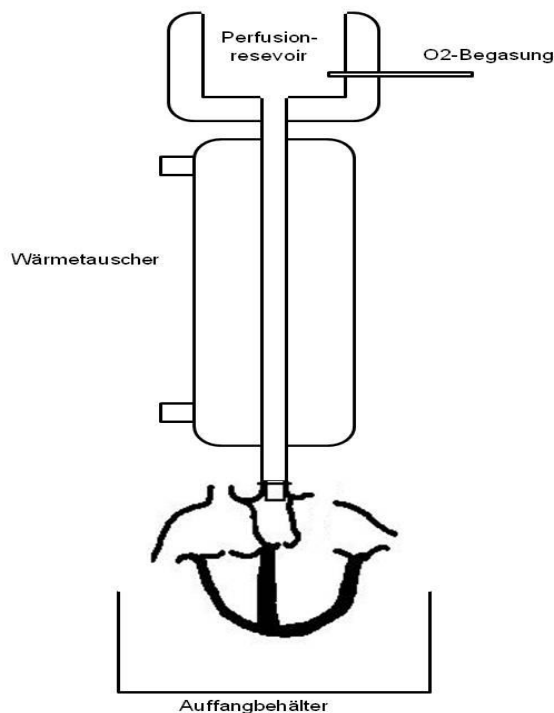


Abb. 3.2.: Aufbau Perfusionsanlage

Kollagenase-Puffer:

Powell-Medium	5,0ml
Kollagenase	25,0mg (chargenabhängig)
Kalzium-Stammlösung	12,5µl
CaCl <sub>2</sub>	100mM

Nach Ablauf der 25 Minuten wurden die Vorhöfe sowie die Aorta ascendens entfernt, die Ventrikel aufgetrennt und mittels eines Gewebhackers (Schnittabstand 0,7mm) in zwei Ebenen mechanisch zerkleinert. Der entstandene Gewebebrei wurde anschließend für fünf Minuten bei 37°C mit 12ml Kollagenase-Puffer unter ständiger Carbogen-Begasung nachverdaut. Zur Unterstützung der Separierung der einzelnen Zellen wurde die Suspension jede Minute mit einer 5ml Pipette vorsichtig auf- und abpipettiert.

Vor einer dreiminütigen Zentrifugation bei 400upm, um Zelltrümmer, kleinere Zellen und die Kollagenaselösung von den intakten Herzmuskelzellen zu trennen, wurde die Suspension durch ein Nylonnetz mit einer Maschenweite von 200µm filtriert. Nach der Resuspension des Sediments in Powell-Medium mit 200µmol/l CaCl<sub>2</sub> folgte eine erneute Zentrifugation mit 400upm für zwei Minuten, um damit eine erhöhte Zelltrennung sowie eine langsame Gewöhnung der Kardiomyozyten an Kalzium zu erreichen. Das gewonnene Zellpellet wurde nochmals mit Powell-Medium mit einem 400µmol/l CaCl<sub>2</sub>-Anteil aufgenommen und zu einer homogenen Suspension aufgeschüttelt. Diese Zellsuspension wurde dann auf eine der Ausgangszahl an Herzen entsprechende Anzahl an Reagenzröhrchen aufgeteilt.

Zum Abschluss erfolgte eine einminütige Zentrifugation bei 300upm, wodurch man ein Sediment mit ca. 40-60% intakten, stäbchenförmigen Kardiomyozyten erhielt.

### 3.3. Zellkultur

#### 3.3.1. Vor- und Ausplattierung

Damit sich die isolierten Kardiomyozyten auf der Kulturschale anheften konnten, wurden die Schalen vor dem Ausplattieren über Nacht bei 37°C mit CCT-Medium<sup>+</sup> behandelt.

##### CCT-Medium<sup>+</sup>

M199/HEPES gepuffert	x ml
Creatin	5 mmol/l
Carnitin	2 mmol/l
Taurin	5 mmol/l
Penicillin	100 IE/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Cytosin-β-Arabinofuranosid	10 µmol/l

Auf pH 7,4 titriert und sterilfiltriert.

Vor dem Ausplattieren der Zellen wurde dieses wieder abgesaugt. Die isolierten Kardiomyozyten in dem Zellpellet wurden mit CCT-Kulturmedium zu einer homogenen Suspension vermischt. Anschließend erfolgte das Ausplattieren mit CCT-Medium und 2% Pen/Strep auf die Kulturschalen, sodass eine Platierungsdichte von  $5 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  erreicht wurde. Die Anheftung der Zellen an den Kulturschalenboden erreichte man durch Inkubation bei 37°C für eine Stunde. Zur Reinigung der Kulturschalen von apoptotischen Zellen, die sich als abgerundete Zellen im Mikroskop darstellten, wurden diese vorsichtig mit CCT-Medium und 2% Pen/Strep gewaschen. Das Ergebnis waren ca. 90% stäbchenförmige und angeheftete Zellen auf den Kulturschalen.

#### 3.3.2. Kurzzeitkulturen der isolierten Kardiomyozyten

Da die Kardiomyozyten vor ihrer Präparation schon einen dreistündigen Versuch hinter sich hatten, konnten diese nach der Isolierung direkt verwendet werden, um einen möglichst großen Anteil an stäbchenförmigen Zellen zu erhalten.

### **3.4. Messung von Myokardzellkontraktionen im elektrischen Feld**

#### **3.4.1. Probenvorbereitung**

Bei der Messung der Myokardzellkontraktionen im elektrischen Feld wurde mit Kurzzeitkulturen isolierter Kardiomyozyten gearbeitet. Vor der Messung wurden die ausgewählten Kulturschalen aus dem 37°C warmen Inkubator genommen und das CCT-Kulturmedium abgesaugt. Danach folgte das Auffüllen der Schalen mit 3ml 37°C warmen CCT-Medium. Je nach Versuch wurde den Zellen fünf Minuten vor der Messung Isoprenalin zugefügt.

#### **3.4.2. Elektrische Stimulation und Steuerung der Myokardzellkontraktion**

Bei der bereits 2003 beschriebenen Methode nach Langer et al. wurde die mit Zellkontraktionspuffer und je nach Versuch mit Isoprenalin befüllte Kulturschale auf den Objektisch eines Lichtmikroskops gestellt. Die Kulturschale musste dann mit einem speziellen Deckel verschlossen werden. Dieser Deckel zeichnete sich durch vier Löcher aus, die annähernd die Eckpunkte eines Quadrates bildeten. Das Quadrat füllte den Kreis des Deckels maximal aus. Die Kathode des Elektrostimulators stellte ein Draht dar, der durch zwei der gegenüberliegenden Löcher geführt wurde und in den Zellkontraktionspuffer der Kulturschale eintauchte. Der Draht war dabei so gebogen, dass er annähernd senkrecht in den Puffer eintauchte, abknickte und horizontal durch den Puffer verlief, um anschließend wieder senkrecht die Flüssigkeit zu verlassen. Mit dem Draht, der die Anode darstellte, wurde auf gleiche Art verfahren.

Nach Anschluss der Drähte an das Stimulationsgerät wurde ein elektrisches Feld zwischen den beiden Polen aufgebaut. Durch die Art der Führung des Drahtes war das Feld zwischen den Polen annähernd homogen. Ein relativ gleichmäßiger Stromfluss durch die Zellen konnte so zwischen den Drähten gewährleistet werden.

Mit biphasischen Stromstößen, welche durch zwei 20 Volt starke entgegengesetzte Rechteckspannungen ausgelöst wurden und jeweils fünf Millisekunden dauerten, wurden die Myokardzellen zur Kontraktion stimuliert. Die durch die Eigenfrequenz der Zellen zeitweise auftretende Spontankontraktionen wurden durch die Stimulation vereinheitlicht. Wenn Zellen diese Frequenz nicht aufnahmen, wurden diese nicht im Experiment berücksichtigt.

Durch die Änderung der Stimulationsfrequenz konnten den Zellen verschiedene Frequenzen vorgegeben werden.

### **3.4.3. Aufbau der Messapparatur**

Zur Messung der Kontraktionsparameter wurde eine Geräteanordnung der Firma Scientific Instruments GmbH aus Heidelberg verwandt. Die zu messende Kulturschale stand während der elektrischen Stimulation auf dem Objektisch des Mikroskops der Firma Leica. Durch dieses konnte die Kontraktion der Zellen beobachtet werden. Zwei an das Mikroskop angeschlossene Kameras wurden zur Messung und Zellidentifizierung verwendet. Die erste Kamera war eine Videokamera zur Beobachtung des Okularbildes auf einem Monitor. Bei der zweiten handelte es sich um eine Zeilenkamera, welche durch Wahrnehmung des hell-dunkel bzw. dunkel-hell Überganges zwischen Zelle und Hintergrund die Zellgrenzen erkennen konnte.

Damit nun die Kamera die Kontraktionen der Zellen registrieren konnte, wurde die Zeilenkamera so positioniert, dass die Längsrichtung der Zelle annähernd parallel zur Längsrichtung der Kamerazeile war. Zur Einrichtung der Kamera bewegte man die Kulturschale so, dass sich die zu untersuchende Zelle genau in der Mitte des Okularbildes befand. Anschließend wurde die Zeilenkamera so eingerichtet, dass man erkennen konnte, dass die beiden Zellenden sich in deren Erfassungsbereich befanden. Auf einem Oszillographen wurde das umgewandelte elektrische Signal der Zeilenkamera dargestellt. Der Vertikalverstärker war auf 5V/div geregelt, während die Ablenkzeit auf dem Horizontalverstärker fest auf 0,1ms/cm eingestellt war. Durch interne Triggerung wurde ein stehendes Bild für die Darstellung erzeugt. Die unterschiedlichen Helligkeiten, welche durch die Zeilenkamera erfasst wurden, konnten am Oszillographen in Form von verschieden starken y-Auslenkungen sichtbar gemacht werden. Die Zellgrenze war durch die Amplitude mit den horizontalen Bewegung zu erkennen. Dadurch war es möglich, mittels des Zweikanaloszillographen die Kontraktionen zu beobachten.

Am zweiten Kanal des Oszillographen lag eine feste Spannung des Interface an. Beim Ablesen stellte sie sich als eine weitere horizontale Linie in einer bestimmten Höhe auf dem Bildschirm des Oszillographen heraus.

Diese zweite Spannung wurde extern über das Interface getriggert: Zuerst setzte man eine Triggermarke des Interface, die auch auf dem Oszillographen durch eine

Amplitude sichtbar gemacht wurde, vor eine Amplitude des Zellbildes. Wenn nun die ansteigende Spannung des Zellbildes den Wert überstieg, der durch die Triggermarke vorgegeben wurde, so begann der Oszillograph die Spannung am zweiten Kanal aufzuzeichnen.

Am Bildschirm des Oszillographen sah man an dieser Stelle im Bild des zweiten Kanals einen Sprung der Horizontalen aus der Null-Position auf einen höheren Wert. Wenn sich nun die Amplitude der Zellgrenze im Zuge der Kontraktion in ihrer Position veränderte, so änderte sich auch die Position, an der der Triggerwert erreicht wurde. So veränderte sich ebenfalls die Stelle, an der die Horizontale sich nach oben verschob. Auf dem Monitor sah man, wie sich die obere Horizontallinie an der Zellkante vor und zurückbewegt. Dadurch konnte man die Zelllänge und die Zellkontraktion an dieser Zellkante anhand der Horizontalen ermitteln. Analog wurde an der anderen Zellkante verfahren.

Die Information der Interface-Spannung „An“ bzw. Interface-Spannung „Aus“ wurde durch den Oszillographen über das Interface an einen Computer weitergegeben. Durch das Programm MUCCELL der Firma Scientific Instruments GmbH wurde die Information Spannung „An“ bzw. „Aus“ registriert, aus der die Zelllänge zu einem bestimmten Zeitpunkt ermittelt werden konnte. Mittels der gemessenen Zelllängen zu verschiedenen Zeitpunkten erstellte das Programm einen Graphen, der die Zelllänge in Abhängigkeit der Zeit darstellte. Es wurde eine Kurve, die die Kontraktion der Zelle darstellt, erzeugt.

Der Beginn der Kontraktion konnte durch den Computer an der einsetzenden Längenverkürzung erkannt werden. Es wurden jeweils fünf Kontraktionen aufgenommen und folgende Mittelwerte aus diesen ermittelt:

1. Die maximale Zelllänge (diastolische Zelllänge) in Mikrometer
2. Die minimale Zelllänge (systolische Zelllänge) in Mikrometer
3. Die Zeit von Beginn der Kontraktion bis zur maximalen Kontraktion (time to peak in Millisekunden)

4. Die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit in Mikrometer pro Sekunde (bestimmt aus der ersten Ableitung der Kontraktionskurve)
5. Die maximale Relaxationsgeschwindigkeit in Mikrometer pro Sekunde ( $Rel_{max}$ )
6. Die Zeit von der 10 %-igen Kontraktion bis zur vollständigen Zellkontraktion in Millisekunden
7. Die Zeit von der maximalen Kontraktion bis zur Relaxation um 90% der Zellverkürzungsstrecke

Aus diesen Parametern wurden noch drei weitere Parameter errechnet:

1. Der Quotient  $dL/L$ : Aus diastolischer und systolischer Zelllänge wird die Differenz gebildet und durch die diastolische Zelllänge dividiert. Man erhält die Angabe der Verkürzung der Zelle im Vergleich zur diastolischen Länge.
2. Die  $Con_{max}$  als Ratenkonstante für die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit:  
Zur Normierung der Geschwindigkeit auf die Länge wurde die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit durch die Zelllänge der betreffenden Zelle dividiert. Die  $Con_{max}$  wurde in der Einheit [ $\mu\text{m s}^{-1}$ ] angegeben.
3. Die  $Rel_{max}$  als Ratenkonstante für die maximale Relaxationsgeschwindigkeit:  
Analog zur  $Con_{max}$  wurde die maximale Relaxationsgeschwindigkeit durch die Zelllänge dividiert und in der Einheit [ $\mu\text{m s}^{-1}$ ] angegeben.

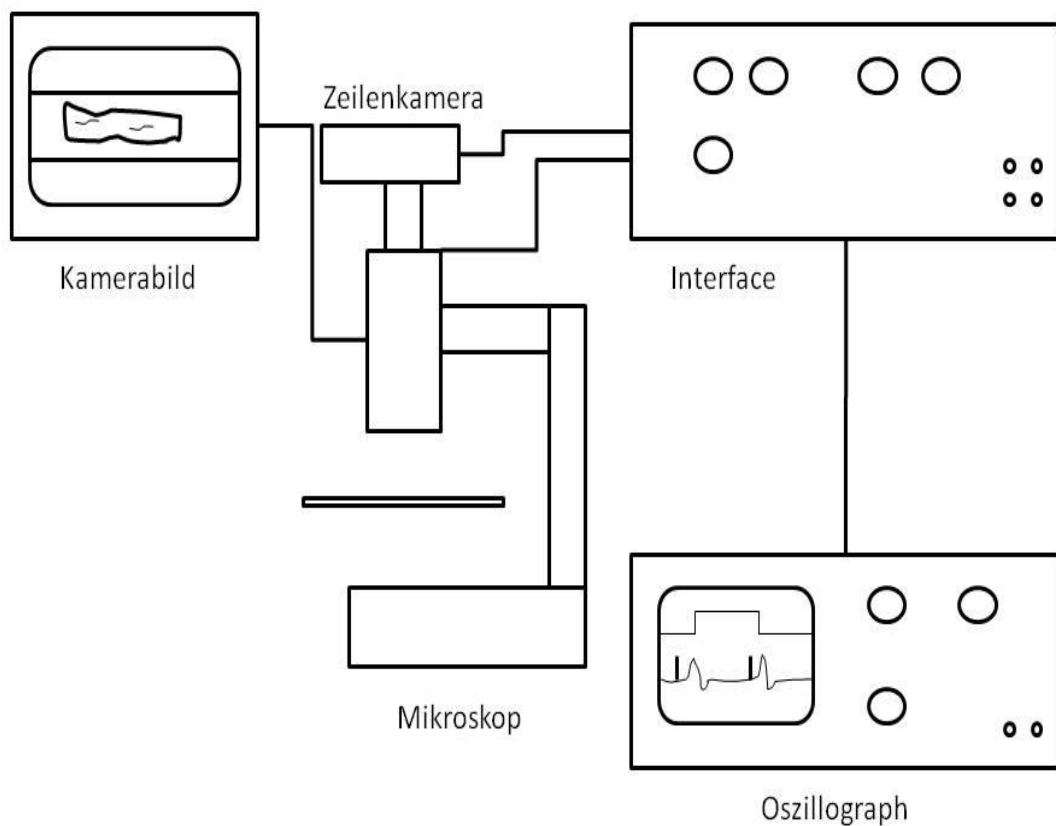


Abb. 3.3.: Aufbau Elektrostimulationsanlage

#### 3.4.4. Messprotokoll

Aus jeder Kulturschale wurden drei repräsentative Zellen ausgewählt. Eine Rattenherz-Präparation ergab jeweils 12 Kulturschalen, sodass insgesamt 36 Zellen eines Rattenherzes untersucht wurden. Die Hälfte der Kulturschalen diente als Kontrolle, während den anderen eine Reagenz zugegeben wurde. Wie oben beschrieben, wurde jede Zelle bei einer Frequenz von 1Hz viermal ausgemessen. Die erhaltenen Mittelwerte der Kontraktionsparameter wurden in das Programm Excel übermittelt und bearbeitet. Aus allen Mittelwerten wurden wiederum Mittelwert, Standardabweichung und Median bestimmt. Gleiches wurde bei 0,5Hz und 2Hz vorgenommen.

### 3.4.5. Auswertung der Kontraktionsparameter

Bei der Auswertung wurden die Mediane der jeweiligen Kontraktionsparameter aus den Versuchen betrachtet. Für jede Zelle und Frequenz wurde so immer ein Wert beurteilt. Bei dem Vergleich zweier Telexperimente (z.B. Schale mit oder ohne Isoprenalin) wurden die errechneten Werte mit dem t-Test verglichen. Bei einem Signifikanzniveau von unter 0,05 wurde Hypothese als bestätigt gewertet.

Dem Vergleich mehrerer Gruppen ging eine Varianzanalyse mittels ANOVA-Test voraus. Bei angedeuteten Unterschieden wurde der Student-Newmann-Keuls-Test als post hoc Test angewendet. Werte kleiner 0,05 wurden hier auch als signifikant anerkannt.

### 3.4.6. Darstellung der Experimentierergebnisse

Die Ergebnisse wurden in dem Programm Excel in Graphen und Tabellen dargestellt.

Folgende Tabellenform wurde ausgewählt:

In der ersten Spalte erschien die Reagenz, mit der die Proben behandelt wurden. Es folgte in der nächsten Spalte die Anzahl aller so behandelten Zellen („n“). Anschließend habe ich die untersuchten Parameter mit den ermittelten Mittelwerten, Medianen und den Standardfehlern des Mittelwertes aufgeführt.

### 3.4.7. Zellernte

Um die intrazellulären Reaktionen zu stoppen, wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Kulturschalen mit 1ml kaltem Phosphat Buffered Saline (PBS) gewaschen.

PBS

NaCl 1,5mmol/l

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>xH<sub>2</sub>O 0,16mmol/l

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>xH<sub>2</sub>O 0,04mmol/l

pH 7,3

Anschließend gab man 200µl Lysis-Puffer in jede Schale und ließ diese für zehn Minuten bei Raumtemperatur auf einem Rüttelbrett inkubieren. Die Bestandteile des Puffers sorgten für eine Zellmembranlyse, Denaturierung der Proteine sowie gleichmäßige Verteilung der negativen Ladungen und Aufspaltung der Quartärstruktur.

#### Lysis-Puffer

Tris/HCl	50mmol/l
Natriumdodecylsulfat (SDS)	2% (wt/vol)
Mercaptopropandiol	2% (vol/vol)
Natrium-ortho-Vanadat	1 mmol/l

pH 6,7

Durch Zugabe von Benzonase (50IE/ml) für fünf Minuten wurden die Nukleinsäuren lysiert. Nach dem Abschaben der Zellen aus den Kulturschalen konnten diese mittels einer Pipette in ein Eppendorf-Gefäß überführt werden. Dieser Suspension wurden jeweils 20µl Probenauftragspuffer zugeführt und für fünf Minuten auf 95°C zur endgültigen Denaturierung der Proteinstruktur erhitzt.

#### Probenauftragspuffer-Puffer

Glycerin	20% (vol/vol)
Aqua bidest.	80% (vol/vol)
Bromphenolblau	0,05 (wt/vol)

Durch das Glycerin wurde die Probe beschwert und so eine Voraussetzung für das Beladen des SDS-PAGE-Gels geschaffen. Das Bromphenolblau hatte nur eine Markerfunktion, da es vergleichbar schnell wie Proteine von 5kD Molekulargewicht wandert. Es interagiert nicht mit der Probe. Dadurch konnte später der Verlauf der Lauffront kontrolliert werden.



### **3.5.3. Messung**

Das in dem Zellkulturmedium befindliche Fura-2 gelangte als Acetoxymethylester in die Kardiomyozyten. Dort wurde dies durch Esterasen gespalten und konnte so, als geladenes Molekül, nicht mehr durch die Membran aus der Zelle heraus.

Die Anregung von Fura-2 erfolgte mit den Wellenlängen 320nm und 340nm. Diese Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 510nm registriert. Zunächst wurden je Petrischale unter Elektrostimulation drei Zellen mit einer normalen Kontraktion ausgewählt und für jeweils 30 Sekunden gemessen. Die Hälfte der Petrischalen wurden zuvor mit Isoprenalin in der Konzentration von 1:100 behandelt.

### **3.5.4. Auswertung**

Die Datenerfassung und Auswertung erfolgte computergesteuert mit dem Programm TILL photonics Imaging System (TILL photonics, Martinsried, Deutschland). Die gemessene Fluoreszenz der beiden Wellenlängen wurde in Bezug gesetzt, sodass die eigentlichen Daten eine Ratio aus 320nm zu 340nm darstellen. Besondere Beachtung fand die Dauer (TTP) und Geschwindigkeit (TT10%) des Calciumeinstroms.

### 3.6. Gelelektrophoretische Methoden

Das Mittel der Wahl zum Nachweis von Proteinen ist die Auftrennung dieser nach der Behandlung mit Natriumdodecylsulfat (SDS) und Mercaptopropandiol in der Gel-Elektrophorese.

#### 3.6.1. Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese haben wir auf das diskontinuierliche System nach Laemmli (1970) zurückgegriffen. Durch Verwendung eines Sammel- und eines Trenngels entsteht eine biphasische Gelstruktur. Dabei bestehen Unterschiede im pH-Wert und der Konzentration des Acrylamids.

Nach gründlicher Reinigung der Ohrglasplatte und der Standardglasplatte (150 x 150mm) wurden die befeuchteten Spacer auf die Ohrglasplatte aufgelegt und diese mittels der Silikonabdichtung nach außen abgeschlossen. Beide Glasplatten wurden anschließend mit Klammern aneinander gepresst.

Das 1,5mm starke Trenngel machte ca. 2/3 des Gesamtvolumens des Hohlraumes zwischen den Platten aus. Bei den vorgenommenen Versuchen wurden Gele unterschiedlicher Stärke verwendet. Nach dem Einfüllen des Trenngels und dem Überschichten mit ca. 3ml Aqua bidest. polymerisierte dieses unter Sauerstoffabschluss für 20 min aus. Es folgte das vollständige Überschichten mit Aqua bidest. und das Aushärten für 60 Minuten.

Nach Ablauf der 60 Minuten wurde vorsichtig das Wasser abgegossen, die Klammern und die Silikondichtungen entfernt und die Glasplatten anschließend mit der Ohrenseite nach innen an der Gelelektrophoresekammer befestigt.

Trenngel:	12,5 %	15%
AA/BA (ml)	12,5	15,0
Trenngelpuffer (ml)	7,5	7,5
Aqua bidest (ml)	10,0	7,5
APS 10% (µl)	200,0	200,0
TEMED (µl)	25,0	25,0
SDS 10% (µl)	300,0	300,0

Die oben gemachten Angaben für die Gele beziehen sich auf die Menge, die man für ein Gel benötigt.

Trenngelpuffer:

Tris/HCl                      1,5mmol/l    pH 8,6

In das anschließend gegossene Sammelgel wurden mit Hilfe von Plastikkämmen Taschen zur Probenaufnahme freigelassen. Das Sammelgel war nach 30 Minuten auspolymerisiert und verwendungsbereit.

Bei den hier eingesetzten SDS-Polyacrylamidgelen mit einem SDS-Anteil von 0,2 % konnten Rückschlüsse auf das Molekulargewicht über die Wanderungstrecke der Proteine geschlossen werden. Durch ein Standardspektrum (250kD – 10kD) ließen sich die Molekulargewichte der Proteine ermitteln.

Sammelgel:

AA/BA	1,2 ml
Sammelgelpuffer pH 6,8	2,5 ml
Aqua bidest	6,4 ml
APS 10%	100 µl
TEMED	12 µl
SDS 10 %	50 µl

Sammelgelpuffer:

Tris/HCl 0,5 mol/l (pH 6,8)

SDS 0,4%

Nach Befüllung der Laufkammer mit Laufpuffer wurden die Plastikkämme und mögliche Sammelgelreste aus den Taschen entfernt und Luftblasen zwischen den Glasplatten beseitigt.

Laufpuffer:

Glycin 1,44% (wt/vol)

Tris 0,3% (wt/vol)

SDS 0,1% (wt/vol)

Von den vorbereiteten Proben wurden jeweils 10- 30µl mittels einer Hamiltonspritze in die Taschen gegeben. Die erste Tasche wurde mit Spectron Multicolor Broad Range Proteinladder von Fermentus beschickt. Bei 200V für 3-4 Stunden erfolgte nun die Gelelektrophorese. Man konnte dabei, um eine schärfere Auftrennung der Proben zu erhalten, diese bei ca. 120 V in das Sammelgel laufen lassen, um anschließend kurz vor dem Trenngel auf 200V hoch zu regulieren. Man sollte aber darauf achten, dass eine Stromstärke von 160mA nicht überschritten wird, da sonst die Platten zu warm und so der Puffer zu schnell verbraucht würde.

### **3.6.2. Western-Blot-Verfahren**

Die 1979 von J. Renart et al. entwickelte und von H. Towbin et al. weiterentwickelte Western Blot-Methode erlaubt das Übertragen von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen eines SDS-Polyacrylamid-Gels auf eine Nitrocellulosemembran. In dieser Arbeit wurde das Semidry-Blotting als eine der gebräuchlichsten Methoden angewandt. Dabei wird zwischen zwei Plattenelektroden ein Blotsandwich horizontal aufgebaut.

Durch das diskontinuierliche Puffersystem mit zwei in Puffer getränkten Filterpapieren konnte ein relativ störungsarmer und gleichmäßiger Transfer gewährleistet werden.

Die Blotmembran mit dem darüber befindlichen Trenngel wurde wie ein Sandwich durch die mit Anodenpuffer A und Kathodenpuffer K getränkten Filterpapiere gesäumt. Mögliche Luftblasen zwischen den jeweiligen Lagen mussten mittels eines Glasstabes vorsichtig ausgerollt werden. Die benötigte Stromstärke berechnete sich mit der Formel  $a \times b \times 0,8$ . Dabei waren a und b die Breite und Länge des Filterpapiers. Es war darauf

zu achten, dass die Filterpapiere genau auf die Größe des Gels zugeschnitten waren, um so den Transfer nicht zu erschweren. Auch sollte die Deckplatte mit Puffer A bestrichen werden.

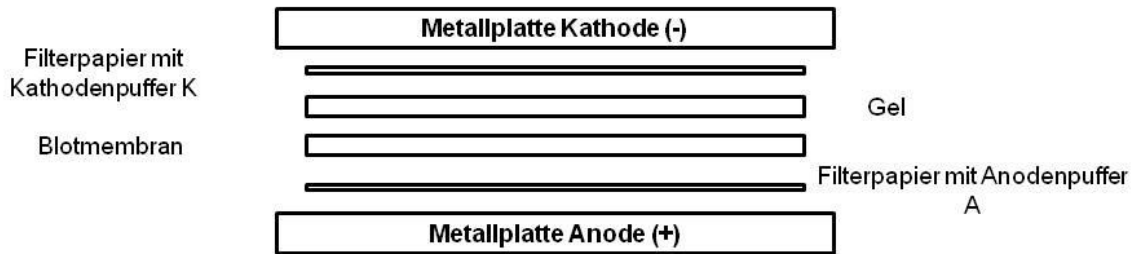


Abb. 3.4.: Querschnitt durch den Aufbau eines Blotsandwich

Anoden- und Kathodenpuffer

Zur Herstellung wurden jeweils 100ml Roti Blot A und K von Roth jeweils 10fach verdünnt. Die einzelnen Ansätze wurden anschließend mit 200ml Methanol und 700ml Aqua bidest. gemischt.

Die Blotzeit richtete sich nach dem Proteingewicht:

20kD	1 Stunde
38-50kD	2 Stunden
50-100kD	2,5 Stunden

### 3.6.3. Immunologische Nachweisverfahren

Die Proteine, die jetzt auf der Blotmembran in derselben geometrischen Anordnung vorlagen wie nach der Auftrennung im Gel, mussten nun durch ein geeignetes Detektionssystem dargestellt werden. Bei der hier gewählten Technik haben Primärantikörper spezifisch an ihr immobilisiertes Antigen auf der Membran gebunden, während ein zweiter Antikörper, der mit einem Amplifikator markiert war, sich an alle Primärantikörper derselben Spezies anlagerte. Diese sogenannte indirekte Anordnung bot eine hohe Sensitivität bei gleichzeitig einfacher Durchführung.

Zunächst wurde die Blotmembran für eine Stunde in 5% Bovinem Serum Albumin (BSA)-Lösung (in Tris Buffer Saline gelöst) auf dem Schüttler geblockt, um sie anschließend mit dem 1. Antikörper zu inkubieren.

Tris Buffer Saline (TBS) :

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

Dies erfolgte über Nacht in 5% BSA in 1xTBS+0,1%Tween20 gelöst. In diesem Fall handelte es sich bei dem Primärantikörper um einen polyklonalen Antikörper, der in einer entsprechenden Konzentration eingesetzt wurde. Durch das anschließende dreimalige Waschen für jeweils 10 Minuten in 1xTBS + 0,1% Tween20 wurde der Primärantikörper, der nicht gebunden hatte, entfernt.

Es folgte die Beschichtung mit dem Sekundärantikörper in 1xTBS, 5%BSA und 0,1%Tween20 für eine Stunde. Bei diesem Antikörper handelte es sich um polyklonale anti-IgG-Antikörper.

	<b>Primärantikörper/ Konzentration</b>	<b>Sekundärantikörper/ Konzentration</b>
anti-Serca2a	anti-rabbit/ 1:1000 (Sigma)	sheep-anti-rabbit/1:2000 (Affinity Biologicals)
pPhospholamban	anti-goat/ 1:1000 (abcam)	donkey-anti-goat/1:2000 (Jackson Immuno Research)
gesamtPhospholamban	anti-rabbit/ 1:200 (Santa Cruz)	sheep-anti-rabbit/1:2000 (Affinity Biologicals)
anti-Actin	anti-rabbit/ 1:1000 (Sigma)	sheep-anti-rabbit/1:2000 (Affinity Biologicals)

Durch anschließendes zweimaliges 10-minütiges Waschen in TBS+Tween 20 und einmaliges in TBS wurden die ungebundenen Sekundärantikörper entfernt.

Die Blotmembran konnte jetzt entwickelt werden. Dazu wurde ein spezieller Phosphoimager verwendet. Nach der Inkubation mit ECL-Sprühlösung für zwei Minuten und abschließendem Abtropfen konnte mit dem Programm ChemiCapt und des Phosphoimager nach dem Einrichten des Bildes ein Lichtbild geschossen werden. Das Programm errechnete darauf automatisch die nötige Belichtungszeit. Die fertigen Aufnahmen wurden im Original und Invers gesichert und mit dem Programms „Quantity One“ ausgewertet.

#### **3.6.4. Auswertung**

Durch einzelne Markierungen der Banden des Western Blots konnte das Programm diese erkennen und den Kontrastunterschied zum Hintergrund bestimmen. Durch Vergleichswerte bestimmte das Programm darauf die Proteinkonzentration je Bande. Die Ergebnisse wurden in Excel exportiert. In Excel konnten die Ergebnisse auf das Vergleichsprotein Aktin bezogen und so die relativen Proteinwerte abgelesen werden. Die Messwerte wurden als Mittelwerte und Standardabweichung aus den unabhängigen Experimenten angegeben. Ebenso wurde der Median ermittelt. Statistische Differenzen innerhalb einer Gruppe wurden mittels T-Test berechnet und das Signifikanzniveau ermittelt. Differenzen mit  $p < 0,05$  galten als statistisch signifikant.

### **3.7. Real Time PCR im iCycler®**

#### **3.7.1. RNA-Isolierung aus adulten Rattenherzen**

Die gesamte Probenaufbereitung wurde mit Handschuhen zur Vermeidung von Kontamination der Proben durchgeführt. Ebenso wurden ausschließlich sterile, UV-bestrahlte 1,5ml Reaktionsgefäße verwendet und sämtliche Schritte auf Eis durchgeführt. Dadurch konnte eine möglichst hohe Ausbeute an reiner RNA gewährleistet werden.

Die tiefgefrorenen (-80°C) linken Ventrikel der Rattenherzen wurden in ein Reagenzglas überführt und mit 1ml TRIzol®-Reagenz überschichtet, um anschließend mit einem ULTRA-Tourax kleingehechelt zu werden. Die so entstandene Zellsuspension wurde zusammen mit 100µl Chloroform in ein Eppendorfgefäß überführt und auf einem Schüttler gut durchmischt. Es folgte eine fünfzehnminütige Zentrifugation bei 4°C und 12.000upm. Es entstand ein dreigeschichtetes Endprodukt, von dem ~450µl des klaren, oberen, RNA-haltigen Überstandes abpipettiert wurden. Die mittlere dünne Schicht enthielt die Proteine, während die untere Schicht DNA-haltig war. Der RNA-haltige Überstand wurde dann mit der gleichen Menge an Isopropanol, also ~450µl, versetzte und zum Fällen der RNA für 20 Minuten bei -20°C gelagerte. Eine anschließende Zentrifugation für 15 Minuten bei 4°C und 12.000xg lieferte am Boden des Eppendorfgefäßes ein Pellet, welches nach Absaugen des Überstandes mit 1ml 70%igem Ethanol gewaschen wurde. Nach einer weiteren Zentrifugation konnte das Ethanol abgeschüttet und das Reaktionsgefäß mit dem Pellet zum Trocknen unter den Abzug gelegt werden. Es folgte die Resuspension des Pellets mit 20µl Aqua bidest und bei 4°C im Kühlschrank für zwei Stunden.

#### **3.7.2. Bestimmung der RNA-Konzentration**

Da jedes Eppendorfgefäß eine unterschiedliche Konzentration an RNA enthielt, musste diese erst bestimmt und an die Versuchsbedingungen angepasst werden. Deshalb wurde der RNA-Gehalt quantitativ mittels eines NanoDrop® bestimmt. Dazu wurden 1,5µl des RNA-Extraktes auf die Meßstelle gegeben, worauf der Computer den RNA –Gehalt der Probe in ng/µl angab. Es sollten dabei alle Proben auf ein RNA-Gehalt von 1µg normiert werden. War dies nicht der Fall, so wurde durch schrittweises Verdünnen mit Aqua bidest. ein solches Verhältnis herbeigeführt.

### 3.7.3. cDNA-Synthese

Zur Vervielfältigung der DNA wurden zuerst die Proben im Thermocycler für 15 Minuten bei 60°C denaturiert. Währenddessen konnte der Reaktionsmix entsprechend der Probenzahl angesetzt werden. Dazu wurde die Anzahl der Proben mit drei multipliziert und das jeweils entsprechende Mixrezept aus der Tabelle abgelesen.

<b>Reaktionsmix</b>	1x	2x	4x	6x	8x	12x
5xRT-Puffer	2	4	8	12	16	24
Oligo dt	1	2	4	6	8	12
dNTP's (N)	1	2	4	6	8	12
DTT	0,5	1	2	3	4	6
RNAsin	0,2	0,4	0,8	1,2	1,6	2,4
M-MLV-RT	0,3	0,6	1,2	1,8	2,4	3,6

Abb. 3.5.:Zusammensetzung des Reaktionsmixes

Zur cDNA-Synthese wurde zu den Proben der entsprechend berechnete Reaktionsmix gegeben. Für die Dauer von einer Stunde erfolgte bei 37°C und anschließend für fünf Minuten bei 95°C die Synthese im Thermocycler.

Durch die anschließende Zugabe von 45µl Aqua bidest. zu 5µl der cDNA konnte eine Konzentration von 1:10 erzeugt werden. Die so erzeugte cDNA ließ sich bei -20°C aufbewahren.

### 3.7.4. Real-time Polymerase-Ketten-Reaktion (real-time PCR)

#### 3.7.4.1. Einführung in die Methode

Die real-time PCR, die zurzeit modernste Technik zur Quantifizierung von Nukleinsäuren, hat sich aus der 1983 von Kary Mullis beschriebenen PCR-Methode entwickelt. Der Vorteil dieser Methode ist ihre hohe Sensitivität, Spezifität, Nachweisgeschwindigkeit und Reproduzierbarkeit, die eine absolute und korrekte Quantifizierung erlauben. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bereits während oder nach jedem Zyklus die Fluoreszenzsignale gemessen werden und so auch Aussagen zu

der anfänglichen DNA-Menge getroffen werden können. Dies ist durch den gleichzeitigen Ablauf der Reaktion und der Datenauswertung möglich. Die 1983 entwickelte Methode ist dagegen eher semiquantitativ. Einen weiteren entscheidenden Schritt zur heutigen PCR-Technik machten HIGUCHI und Mitarbeiter im Jahre 1992. Sie statteten die Geräte mit einer UV-Lampe und einer CCD-Kamera aus und versetzten den PCR-Ansatz direkt mit Ethidiumbromid. Diese Ethidiumbromid fluoreszierte unter UV-Licht Anregung.

Anstelle des bewährten Ethidiumbromid werden andere interkalierende Farbstoffe verwendet. So wurde in dieser Arbeit SYBR® Green I verwendet. Dieser Farbstoff interkaliert in doppelsträngiger DNA und liefert ein besseres Signal-Hintergrund-Verhältnis als Ethidiumbromid. Die relative schwache Signalstärke in gelöster Form kam nicht zum Tragen, da jedes DNA-Molekül mehrere Fluoreszenzmoleküle in seine „minor grooves“ einbaute und so die Signalstärke direkt proportional zu der Anzahl an doppelsträngiger DNA anstieg. Zudem war der Farbstoff universell einsetzbar, da er relativ unspezifisch bindet.

Die Extinktion betrug bei diesem Farbstoff 490nm und die Emission 530nm.

Aber auch die verwendeten Geräte haben sich weiterentwickelt, während jedoch die Methode nach Higuchi et al. (1993) gleich geblieben ist. Der in dieser Arbeit verwendete iCycler® der Firma Bio-Rad war mit einer ventilatorgekühlten 50W Wolfram-Halogen-Lampe sowie mit verschiedenen Anregungs- und Emissionsfiltern und einer CCD-Kamera ausgestattet.

Durch Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes (CT-Wert) konnte die PCR quantifiziert werden. Während zu Beginn der Reaktion nur die Hintergrundfluoreszenz gemessen werden konnte, da die Farbstofffluoreszenz in den ersten Zyklen noch nicht detektierbar war, nahm die Fluoreszenz im Verlauf der Zyklen stetig zu. Derjenige PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenz die des Hintergrundes signifikant überstieg, wurde als CT-Wert bezeichnet.

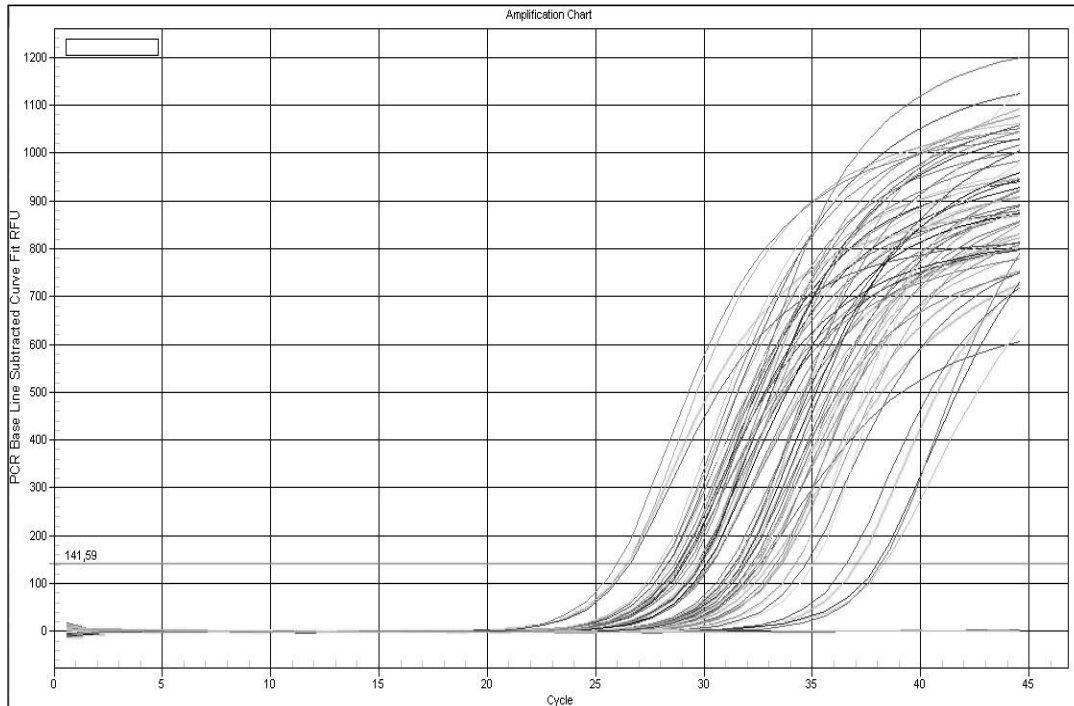


Abb. 4.: Beispiel für den Verlauf von real-time PCR (Threshold cycle).

Diese Quantifizierung der DNA-Menge beruhte nicht auf der absoluten Menge an PCR-Produkten, sondern auf der Kinetik der PCR-Reaktion. Der ermittelte CT-Wert galt als Richtwert. Zu diesem Zeitpunkt war die Amplifikation exponentiell. Es wurde sichergestellt, dass es keinen Mangel an Primern oder Nukleotiden gab und so konnte eine nachlassende Enzymaktivität durch Produktmangel ausgeschlossen werden. Wenn nun der Vergleich mit einer Standardkurve erfolgte, bei der die Template-Mengen bekannt waren, konnte man von einem CT-Wert auf eine Template-Konzentration schließen.

Die Differenzierung zwischen spezifischem Produkt und Artefakten war im Anschluss der PCR-Reaktion mit Hilfe einer Schmelzkurvenanalyse möglich.

Bei dieser Analyse wurde die Auftrennung der DNA-Doppelstränge in ihre Einzelstränge an den jeweiligen Schmelzpunkten in Beziehung zu dem Temperaturanstieg gesetzt. Die daraus resultierende Fluoreszenzabnahme wurde aufgezeichnet. Da Primer-Dimere bei geringeren Temperaturen schmolzen, konnte so zwischen Artefakt und Produkt unterschieden werden.

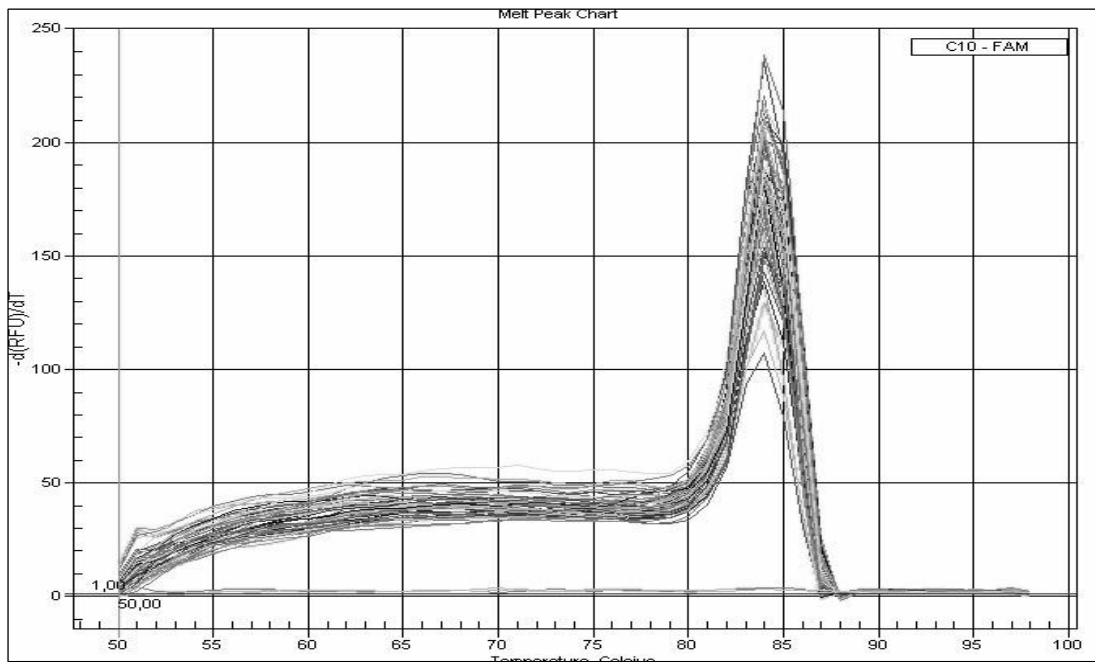


Abb. 4.1.: Beispiel einer Schmelzkurve bei einer Schmelztemperatur von 83,5°C°

### 3.7.4.2. Durchführung der Methode

Die in Punkt 3.7.2. hergestellte 1:10 verdünnte cDNA diente jetzt als Template für die PCR-Primer. Um auf einen Standard Bezug nehmen zu können, wurde HPRT als Housekeeping-Gen gewählt, da es nicht durch die Versuche beeinflusst wurde.

#### 3.7.4.2.1. Primerauswahl

Um die richtigen Primer für die Untersuchungen auszuwählen, wurden verschiedene Faktoren betrachtet. Erstens durften die entstehenden Produkte nicht größer als 200bp sein.

Zweitens musste die Primersequenz komplementär zu dem Genom des Versuchstieres (Ratte) sein. Die Überprüfung dieses Elementes wurde über das Internetprogramm BLAST vollzogen.

Des Weiteren haben allgemeine Untersuchungen ergeben, dass die eingesetzten Primer eine Länge von 18 bis 30 Basenpaaren und einen G/C-Gehalt von 20-80% haben sollten. Auch die Schmelztemperatur von ca. 65°C durfte nicht unter- bzw. überschritten werden.

Primer:

HPRT	CCA GCG TCG TGA TTA GTG AT (fw-Primer) CAA GTC TTT CAG TCC TGT CC (rev-Primer)
ANP	AAT ACG TCA GAC ATT CGG GAA (fw-Primer) GTG GAG TAC ATT ATC TTT GCT (rev-Primer)
BNP	TGG GCA GAA GAT AGA CCG GA (fw-Primer) ACA ACC TCA GCC CGT CAC AG (rev-Primer)
BCL 2	ATC TTC TCG TTC CAG CCT GA (fw-Primer) TCA GTC ATC CAC AGA GCC AT (rev-Primer)
Bax	CAA GAA GCT GAG CGA GTG TCT CC (fw-Primer) AGC AAA GTA GAA GAG GGC AAC CAC (rev-Primer)
Ncx	CTT CGT CCC ACC TAC AGA AT (fw-Primer) GCC AGG TTC GTC TTC TTA AT (rev-Primer)
Serca2a	CCG ATG GGT TGT ACC TTG TC (fw-Primer) GGG CTG GGT AGA GAA TGG AT (rev-Primer)
PLB	TAT GTC TGC TGC TGA TAT GC (fw-Primer) ACT CTT AAA TCG TGA CCC TTC (rv-Primer)

#### **3.7.4.2.2. Real-time PCR-Ansatz**

Um ein möglichst gutes Ergebnis zu erhalten, wurde ein Supermix der Firma Bio-Rad verwendet, welcher bereits alle wichtigen Ingredienzien in der richtigen Konzentration enthielt.

Zuerst wurden die Primer zu gleichen Teilen 1:10 verdünnt.

Für einen Ansatz:

iQ™ SYBR® Green Supermix	10µl
Primer	0,6µl (1:10 )
Aqua bidest.	6,4µl
DNA-Template (1:10)	3 µl
$\Sigma$	20 µl/Probe

Zum Ausschluss von Fehlern wurde für jede Probe eine Doppelbestimmung durchgeführt. Zusätzlich erfolgte eine Laufkontrolle des Ansatzmixes ohne Template. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei maximal 4°C.

#### **3.7.4.2.3. PCR-Laufprogramme**

Die PCR-Reaktion besteht im Wesentlichen aus drei Schritten. Dabei enthält jeder Zyklus einen Denaturierungsschritt bei 95°C, bei dem die beiden DNA-Stränge voneinander getrennt wurden, einen Hybridisierungsschritt, in dem die beiden Primer an die jeweils komplementären cDNA-Strang gebunden haben und einen Syntheseschritt. Während dieses letzten Schrittes erfolgte die Synthese der zwischen den Primern liegende DNA-Abschnitten mit Hilfe der DNA-Polymerase und der im Reaktionsmix vorhandenen Desoxyribonukleotide.

Durch Programmierung von unterschiedlichen Laufprogrammen im iCyclers® konnten die unterschiedlichen Temperaturen während der PCR eingestellt werden.

Zyklus 1: (1x)

Step 1: 95°C für 3,0 min

Zyklus 2: (45x)

Step 1: (Denaturierung) 95°C für 30s

Step 2: (Annealing) X für 30s

Step 3: (Amplifikation) 72°C für 30s

Zyklus 3: (100x)

Step 1: 50°C für 10s

Nach dem zweiten Zyklus erfolgte eine Temperaturerhöhung in 0,5°C Schritten, um eine Schmelzkurve zu erhalten. Dies liegt daran, dass die unterschiedlichen Primer spezifische Annealingtemperaturen benötigten, die in den vorhergehenden Programmierungen berücksichtigt wurden. Durch dieses Verfahren konnte kontrolliert werden, ob nur ein Endprodukt entstanden war.

Annealingtemperaturen:

HPRT 63°C

BNP 58°C

BCL 2 56°C

Bax 58°C

Ncx	53°C
Serca2a	57°C
PLB	55°C

Die endgültige Zyklenzahl zur Vermeidung von Artefakten musste nicht bestimmt werden, da sich bei der real-time PCR die Zyklenzahl nicht spezifisch für die Primer ändert. Die Reaktion endete mit einer Schmelzkurve, in der eventuelle Primer-Dimere etc. anhand der Schmelztemperatur identifiziert werden konnten.

#### **3.7.4.2.4. Real-time PCR-Auswertung**

Die Auswertung erfolgte über die von PFAHL et al. (1991) entwickelte  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode. Bei dieser wurde die relative Expression eines Gens im Vergleich zu einem Housekeeping-Gen (z.B. HPRT) berechnet. Durch die angewandte Doppelbestimmung bei jedem PCR-Lauf konnten jeweils die Mittelwerte der CT-Werte bestimmt werden. Es folgte die Bildung der Differenz zwischen der Probe und dem Standard. Man erhielt dabei den  $\Delta CT$ -Wert.

$$\Delta CT\text{-Wert} = CT\text{-Wert (Gen)} - CT\text{-Wert (Standard)}$$

### **3.8. Proteinbestimmung im Perfusat**

#### **3.8.1. Durchführung der Messung**

Während der Langendorff-Versuche (unter 3.1. beschrieben) wurden in regelmäßigen Abständen Perfusatproben unterhalb der Herzen aufgefangen und bei -20°C eingefroren, um den Gewebeschaden zu quantifizieren (Maier et al., 2009). Nach dem Auftauen und Durchmischen der Suspension wurde der Protein-Gehalt semiquantitativ mittels eines NanoDrop® bestimmt. Dazu wurden 3µl des Perfusates bei einer Wellenlänge von 260nm und 280nm photometrisch gemessen. Diese Messung wurde jeweils dreimal durchgeführt. Die registrierten Extinktionswerte wurden aufgezeichnet. Durch den Abgleich mit den Extinktionswerten bei 260nm wurden die relativen Proteinwerte ermittelt. Ebenfalls wurde eine proteinfreie Perfusatprobe als Vergleichsparameter gemessen.

#### **3.8.2. Auswertung**

Die Ergebnisse der Versuchsmessungen wurden um den Wert der proteinfreien Perfusatprobe korrigiert und mit der Formel

$$\text{Protein [mg/ml]} = (A_{260} - A_{280}) / 2,51$$

der reine Proteingehalt ermittelt.

Es erfolgte die Berechnung der Mittelwerte und der Standardabweichung von den Mittelwerten.

### **3.9. Statistik**

Die Ergebnisse der Messungen wurden als Mittelwerte plus Standardabweichung (SD) oder als Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus der Anzahl der gemachten unabhängigen Experimente angegeben. Mögliche statistische Unterschiede innerhalb einer Gruppe wurden durch die Varianzanalysen (ANOVA) unter Nutzung des Student–Newmann–Keuls–Testes durchgeführt und das Signifikanzniveau ermittelt (Godfrey et al., 1985). Differenzen mit  $p < 0,05$  galten als statistisch signifikant.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Untersuchungen an isoliert perfundierten Rattenherzen**

Um den Einfluss von Carbachol auf die postischämische Erholung zu untersuchen, wurden isolierte Rattenherzen flusskonstant perfundiert und der Perfusionsdruck (PerfPres), die Herzfrequenz (HF), sowie der systolische und diastolische Druck aufgezeichnet. Nach einer 15minütigen Stabilisierungsphase mit einem Zielaortendruck von etwa 50mmHg wurde für drei Minuten Carbachol in der Konzentration von 100nM eingewaschen und anschließend für zwei Minuten wieder ausgewaschen. Diese Carbacholinkonzentration wurde einer bereits publizierten Studie entnommen, die sich mit der Konzentrationsfindung bei gleichem Versuchsaufbau beschäftigte (Pisarenko et al., 1999). Es folgte eine Ischämie von 45 Minuten. Bei der Kontrollgruppe erfolgte eine dreiminütige Perfusion mit Standardperfusat vor der Ischämie. Der sich nun anschließenden Reperfusion schloss sich nach 120 Minuten das Einwaschen mit 10nM Isoprenalin an.

Für die Kontrollgruppe ergaben die aufgezeichneten Werte der Herzfrequenz und des systolischen und diastolischen Druckes einen Anstieg des linksventrikulären enddiastolischen Drucks, eine Abnahme des linksventrikulär entwickelten Drucks (Differenz zwischen systolischem Spitzendruck und diastolischem Druck) und eine leichte Zunahme der Herzfrequenz am Ende der Reperfusionphase (Minute 165) gegenüber der präischämischen Kontrollphase (Abb. 4.1.). Für den Vergleich der verschiedenen Behandlungsgruppen wurde im Zuge einer einheitlichen Auswertung der für die Beurteilung der postischämischen Erholung wichtigste Wert, der linksventrikulär entwickelte Druck am Ende der Reperfusionphase gewählt, da wie aus Abbildung 4.1. zu entnehmen ist, die hämodynamischen Verhältnisse nach Reperfusion zu diesem Zeitpunkt weitgehend stabilisiert sind.

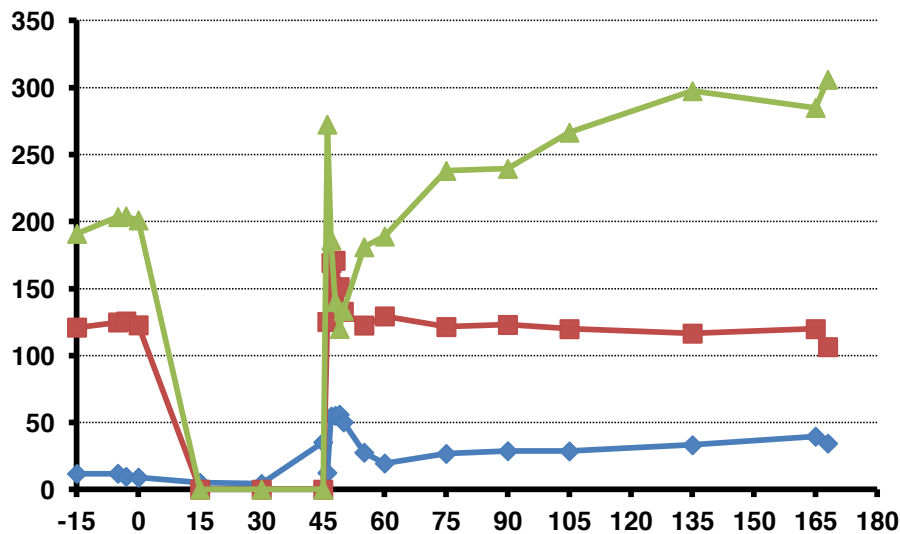


Abb. 4.1.: Verlaufsprotokoll der Änderungen im diastolischen Druck (blaue Kurve), im systolischen Druck (rote Kurve) und der Herzfrequenz (grüne Kurve) während der Stabilisierungsphase (Minute -15 bis 0), der Ischämie (Minute 0-45), der Reperfusion (Minute 46-165) und nach Einwaschen von Isoprenalin (Minute 165-168). X-Achse: Zeit in Minuten; Y-Achse: linksventrikulärer Druck (mmHg; für die blaue und rote Kurve) oder Schläge pro Minute (für die grüne Kurve). Dargestellt sind die Mediane aus n=8 Herzen. Auf die Darstellung von Standardabweichungen wurde hier aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

#### 4.1.1. Wirkung von Carbachol auf die funktionelle Erholung nach Ischämie

Ziel der folgenden Experimente war es zu untersuchen welchen Einfluss die Gabe von Carbachol auf die funktionelle Erholung nach Ischämie hat. Dazu wurden sieben verschiedene Bedingungen getestet, die sich jeweils in der Konzentration an Carbachol, dem Zeitpunkt der Gabe, und der Zeit zwischen präischämischer Gabe und Beginn der Ischämie unterschieden. Die Basalfunktion der Herzen aus den verschiedenen Gruppen vor Versuchsbeginn war dabei vergleichbar (Tabelle 4.1.)

Tabelle 4.1.: Basalfunktion der Herzen aus den sieben untersuchten Gruppen

	LVDP (mmHg)	RPP (mmHg*bpm)	LVeDP (mmHg)
ANOVA	p=0.839	p=0.657	p=0.109
I/R	113.7±23.6	22,777±8,065	11.7±0.7
I/R + Cch 0 min 100 nM	113.5±18.9	20,980±6,700	11.9±1.2
I/R + Cch 3 min 100 nM	107.2±27.2	21,593±4,628	11.4±0.4
I/R + Cch 5 min 100 nM	121.9±17.3	26,665±3,554	11.9±0.7
I/R + Cch 0 min 100 pM	120.4±25.8	24,274±5,792	12.5±1.2
IPoC	106.9±17.3	23,434±5,152	12.9±1.0
PPoC Cch 100 nM	122.2±36.8	21,365±6,254	12.7±1.3

Angegeben sind Mittelwerte±Standardabweichungen von n=6-8 Herzen pro Gruppe.

#### 4.1.1.1. Positiver Einfluss von Carbachol auf das LVDP-Recovery

Wie oben beschrieben wurde zur Bewertung der generellen funktionellen Erholung das LVDP-Recovery nach 120 Minuten herangezogen (Abb.4.2.).

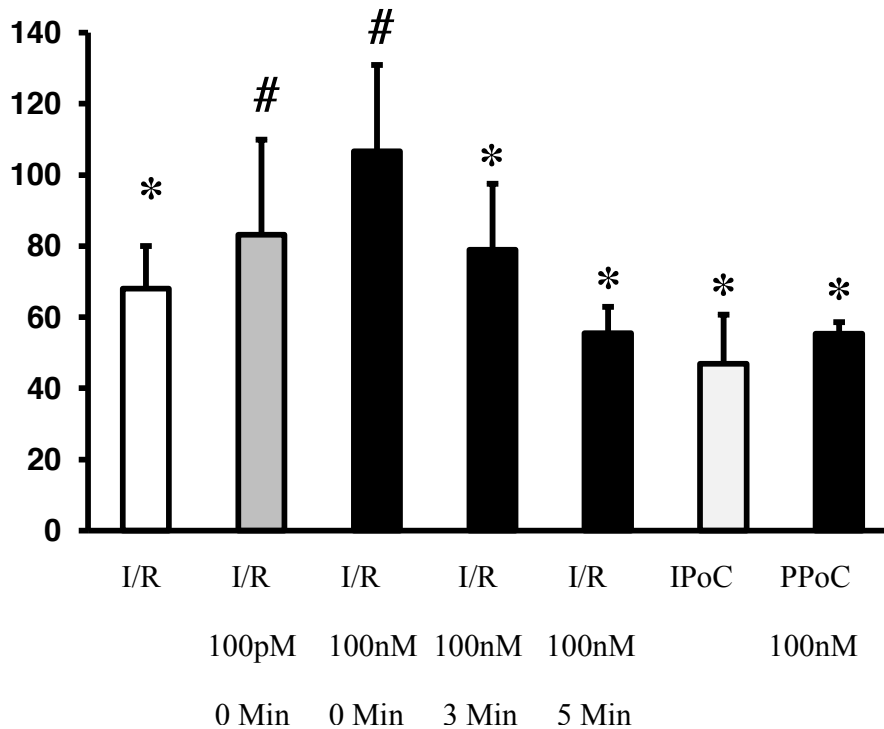


Abb. 4.2.: LVDP-Recovery in % des Ausgangswertes; I/R = Ischämie und Reperfusion; in den grau und schwarz gekennzeichneten Gruppen wurde Carbachol in den jeweils angegebenen Konzentrationen vor der Ischämie für 10 Minuten eingewaschen und vor der Ischämie für die angegebenen Zeiten ausgewaschen. IPoC = Ischämische Post-Konditionierung; PPoC= Pharmakologische Präkonditionierung. Dargestellt sind Mittelwerte+Standardabweichungen von n=6-8 Herzen je Gruppe; \*, p<0,05 vs. präischämische Werte; #, p < 0,05 vs. I/R. Versuchsprotokolle siehe Absatz 3.1.9.

Zunächst wurde beobachtet, dass es durch die Zugabe von Carbachol vor der Ischämie zu einem sofortigen Herzstillstand kam. Somit kam es in diesen Gruppen bereits vor dem Einsetzen der Ischämie zu einem geringeren Energieumsatz. Der Effekt von Carbachol auf die Spontanaktivität des Herzens war reversibel und nach 5 Minuten Auswaschen vor der Ischämie waren die ursprünglichen Schlagfrequenzen und Druckverhältnisse wieder eingestellt. Aufgrund dieser Beobachtung wurde Carbachol entweder gar nicht (Gruppen 0 Min.), partiell (Gruppe 3 Min.) oder vollständig (Gruppe 5 Min.) vor der Ischämie ausgewaschen. Des Weiteren wurde überprüft, ob sich durch ischämische Postkonditionierung oder pharmakologische Postkonditionierung mittels Carbachol eine protektive Wirkung nachweisen lässt.

Die in Abb. 4.2. dargestellten Befunde zeigen für die unbehandelte Kontrollgruppe (I/R) eine Funktionserholung von  $68 \pm 12\%$  gegenüber den präischämischen Werten also eine infarktbedingte Abnahme der linksventrikulären Funktion von 32% (Abb. 4.2.). In den Gruppen mit präischämischer Zugabe von Carbachol ergab sich eine signifikant bessere Funktionserholung ( $83 \pm 27\%$  beziehungsweise  $106 \pm 24\%$  der präischämischen Werte; Abb. 4.2.). Ein partielles oder vollständiges Auswaschen des Carbachols vor der Ischämie führte zu kleineren oder fehlender Protektion gegenüber der Kontrolle (Abb. 4.2.). Ischämische Postkonditionierung ( $47 \pm 14\%$ ) und pharmakologische Postkonditionierung ( $55 \pm 3\%$ ) führten zu keiner Verbesserung (Abb. 4.2.). Zusammenfassend zeigen diese Befunde eine verbesserte Funktionserholung durch präischämische Behandlung der Herzen mit Carbachol aber auch die Notwendigkeit der carbacholvermittelten Wirkung während der Ischämie, da weder durch Vorbehandlung mit vollständigem Auswaschen noch durch nachträgliche Zugabe von Carbachol während der Reperfusion eine Protektion erzielt werden konnte.

#### 4.1.1.2. Positiver Einfluss von Carbachol auf die linksventrikuläre enddiastolischen Funktionswert

Neben dem LVDP-Recovery zeigt uns der linksventrikuläre enddiastolische Wert (LVEDP-Wert) an, wie stark der Schaden durch die Ischämie am linken Ventrikel des Herzens ausgeprägt ist. Beim zuvor dargestellten linksventrikulär entwickelten Druck (LVDP) kann ein großer Schaden zumindest im Zeitrahmen dieser Versuche durch eine Kompensation mittels verstärkter systolischer Kontraktion teilkompensiert werden und den tatsächlichen Schaden überspielen. Dazu wurden die Werte des LVEDP-Werte nach 120 Minuten Reperfusion betrachtet (Abb. 4.3.).

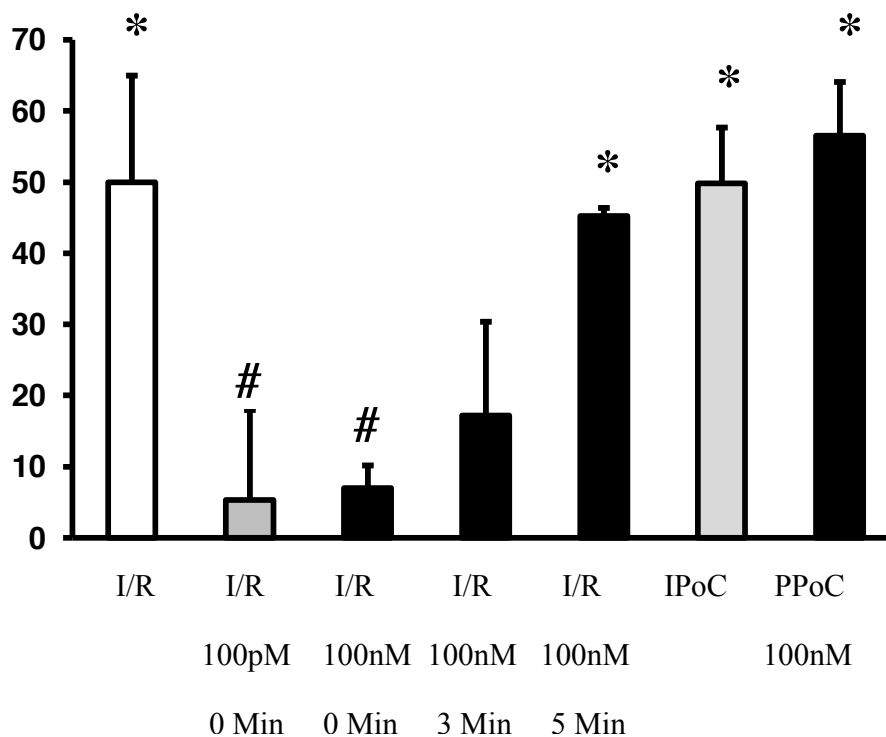


Abb.4.3.: Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP) in mmHg nach 120 Minuten Reperfusion aufgeschlüsselt nach Versuchsreihen (siehe Abb. 4.2); Dargestellt sind Mittelwerte+Standardabweichungen von n=6-8 je Gruppe; \*, p<0,05 vs. präischämischer Wert; #, p<0,05 vs. I/R.

Es konnte festgestellt werden, dass das LVEDP bei der Kontrollgruppe signifikant gestiegen war ( $50 \pm 15$  mmHg), während er bei beiden Gruppen mit Auswaschen des Carbachols annähernd gleich blieb. Bei unvollständigem Auswaschen (3 Minuten) blieb ein tendenziell verbessertes LVEDP aber den anderen Gruppen hatte der LVEDP wie in den unbehandelten Kontrollen zugenommen.

#### 4.1.1.3. Einfluss von Carbachol auf das „Rate-Pressure-Product“

Beim „Rate-Pressure-Product (RPP)“ handelte es sich um das Produkt aus Herzfrequenz und linksventrikulärem Druck. Dieser Wert ist, wenngleich indirekt, mit dem myokardialen Sauerstoffverbrauch assoziiert.

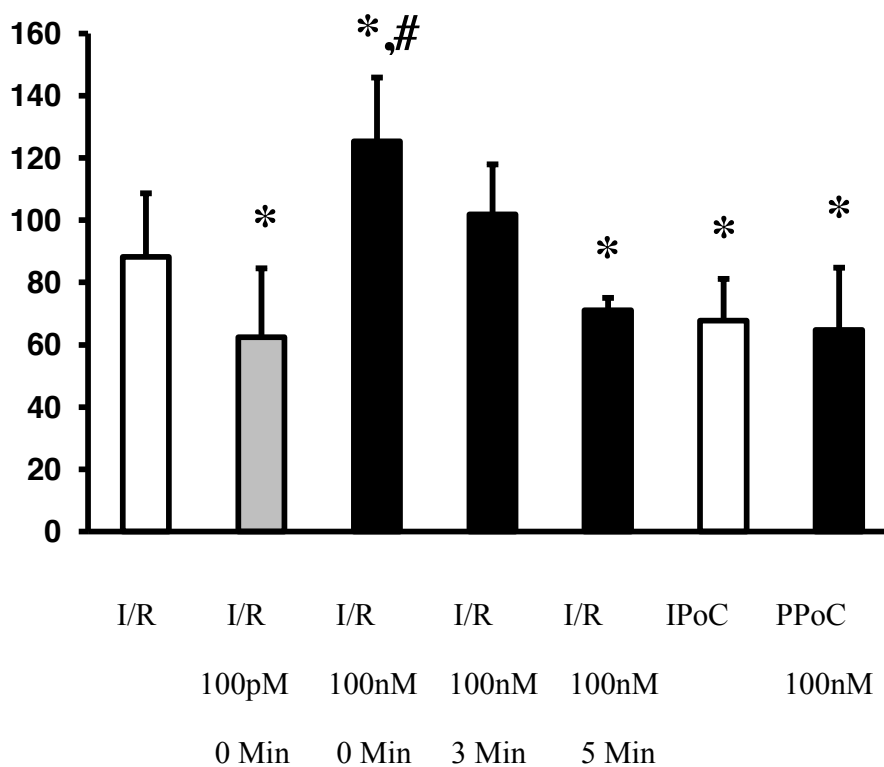


Abb. 4.4.: Erholung des „Rate-Pressure-Products“ in % des Ausgangswertes für die unter Abb. 4.2. beschriebenen Versuchsgruppen. Dargestellt sind Mittelwerte+Standardabweichungen von  $n=6-8$  Herzen je Gruppe; \*,  $p<0,05$  vs. präischämische Werte; #,  $p<0,05$  vs. I/R.

Erneut fand sich in der Gruppe der Herzen, die vor der Ischämie mit der höheren Konzentration an Carbachol vorbehandelt worden waren, die beste Erholung (Abb. 4.4). Dagegen zeigten alle anderen Behandlungsgruppen sogar eine schlechtere Erholung gegenüber der Kontrollgruppe I/R (Abb. 4.4).

#### 4.1.2. Wirkung von Carbachol auf die Infarktgröße

Ein Maß für die durch die Ischämie geschädigten Gebiete (Infarktgröße) ist die Proteinfreisetzung. Durch das Zerreißen des Gewebes kommt es zur Lyse der Zellen und Freisetzung von Proteinen in das Perfusat. Die Messung der Proteinfreisetzung ermöglicht so eine Abschätzung der Infarktgröße. Diese Messungen wurden aus dem Perfusat, das während der ersten 15 Minuten der Reperfusion gesammelt wurde, bestimmt (Abb. 4.5).

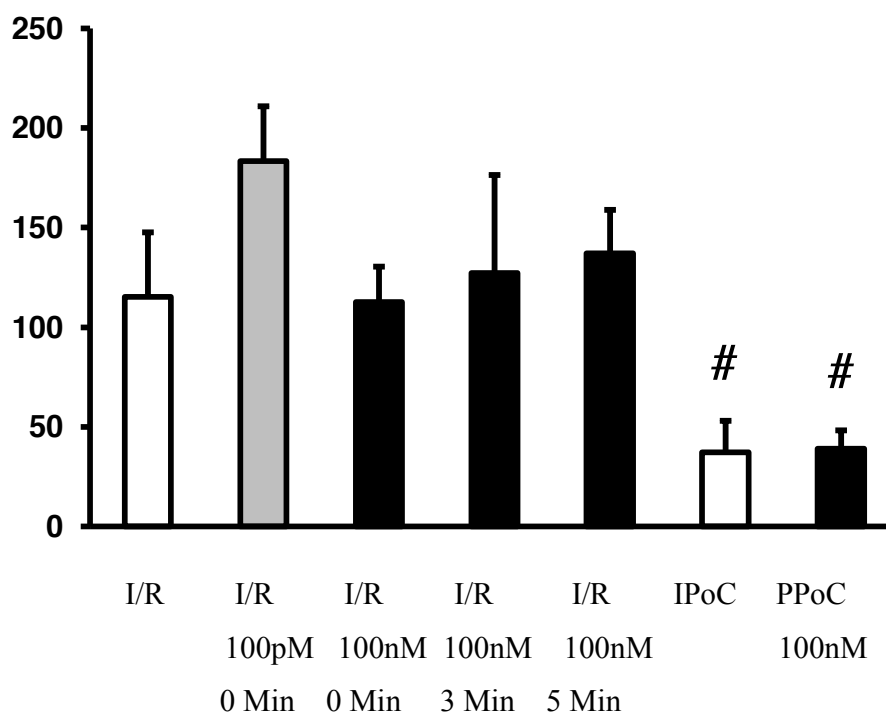


Abb. 4.5.: Kumulative Proteinfreisetzung in das Perfusat während der ersten 15 Minuten nach Reperfusion als Relative Einheiten (AU). Die Versuchsgruppen entsprechen der Beschreibung aus Abb. 4.2.. Die Daten sind Mittelwerte+Standardabweichungen von n=6-8 Herzen je Gruppe; #, p<0,05 vs. I/R

Die ischämische Präkonditionierung (IPoC) gilt als Verfahren zur Infarktgrößenreduktion. Anhand des hier gewählten Parameters der Proteinfreisetzung ließ sich dies wie erwartet bestätigen (Abb. 4.5.). Ebenso konnte anhand der pharmakologischen Präkonditionierung mittels Carbachol (PPoC) eine solche Protektion erzielt werden. Beide Gruppen hatten hinsichtlich der funktionellen Erholung keine protektiven Effekte gezeigt (Abb. 4.2.-4.4.). Andererseits zeigten die mit Carbachol behandelten Herzen der I/R-Gruppen trotz funktionell besserer Erholung keine Reduktion der Infarktgröße. Das bedeutet, dass die protektive Wirkung von Carbachol auf der verbesserten Funktion des überlebenden Restmyokards beruht.

### 4.1.3. Isoprenalin-Ansprechbarkeit der mit Carbachol behandelten Herzen

Um zu überprüfen, inwieweit die Herzen noch auf Stimulation von außen reagieren, wurde nach der Reperfusion jeweils für drei Minuten 1nM Isoprenalin, ein nicht selektives Betasympathomimetikum, eingewaschen. Isoprenalin wirkt sowohl an Beta-1- also auch an Beta-2-Rezeptoren und gibt daher Aufschluss darüber, ob die Beta-1-Rezeptoren des Herzens nach der Ischämie noch erregbar sind. Des Weiteren wird durch den positiv chronotropen, inotropen, bathmotropen und dromotropen Effekt des Isoprenalins das Herz zum Ende des Versuches noch einmal an die Belastungsgrenze herangeführt (Abb. 4.6).

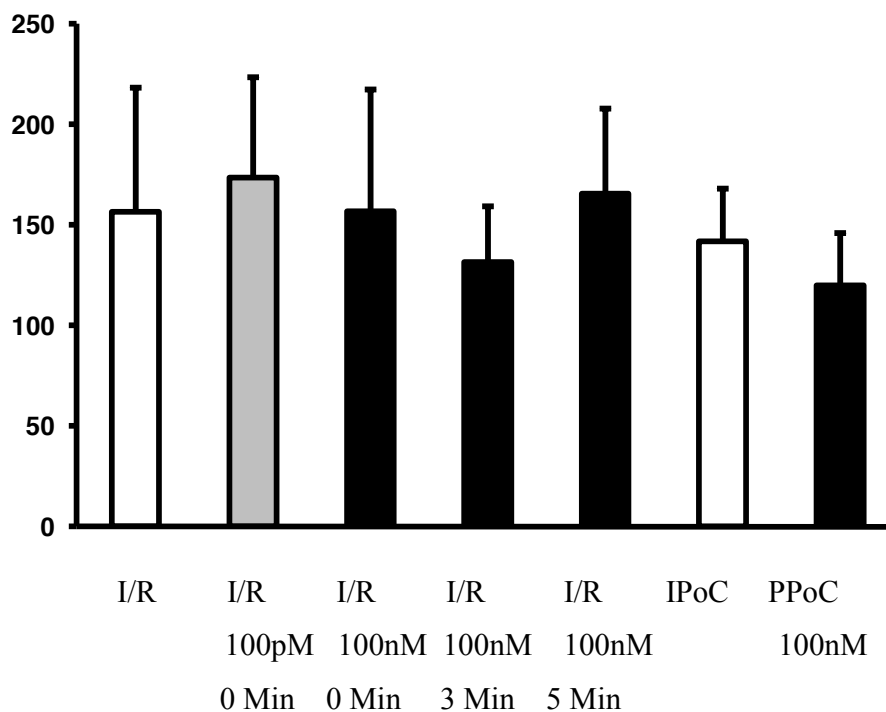


Abb. 4.6.: Zunahme des linksventrikulär entwickelten Drucks (LVDP) nach dreiminütiger Einwaschphase durch Isoprenalin (1 nM) in % des Ausgangswertes. Dargestellt sind Mittelwerte+Standardabweichungen von n=6-8 Herzen pro Gruppe. Zur Gruppenbezeichnung siehe Abb. 4.2. ANOVA: p=0,457.

In allen Gruppen kam es zu einer Steigerung des LVDP allerdings gab es keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 4.6.).

#### 4.2. Effekt von Carbachol auf die frühe mRNA Expressionsveränderung im linken Ventrikel

Die bisherigen Befunde hatten für die mit Carbachol behandelten Gruppen eine carbacholabhängige Verbesserung der postischämischen Erholung ergeben. Nunmehr wurden die Expressionen von Proteinen untersucht, die in der frühen Reperfusionstranskriptionell reguliert werden und für das Postinfarktremodelling von Bedeutung werden können, auch wenn der Zeitrahmen dieser Untersuchungen eine genauere Untersuchung des Remodellings nicht ermöglicht. Als solche wurden untersucht die Expression von BNP, bcl-2, bax, NCX, SERCA2a und PLB.

Tabelle 4.2.a.: mRNA Expression nach 2 Stunden Reperfusion

	BNP	bcl-2	bax
ANOVA	p=0,041	n.s.	n.s.
I/R	1,00±0,58	1,00±1,09	1,00±1,30
I/R 100pM 0 Min	0,81±1,07	0,29±0,06	0,78±0,45
I/R 100nM 0 Min	2,01±1,07*	0,23±0,18	0,97±0,45
I/R 100nM 3 Min	1,06±0,31	0,59±0,68	0,88±1,09
I/R 100nM 5 Min	0,59±0,64	0,32±0,64	0,78±0,31

Tabelle 4.2.b.: mRNA Expression nach 2 Stunden Reperfusion

	NCX	SERCA2a	PLB
ANOVA	p=0,000	p=0,000	p=0,001
I/R	1,00±1,26	1,00±0,74	1,00±0,59
I/R 100pM 0 Min	3,11±1,41*	2,57±0,88*	1,56±0,71
I/R 100nM 0 Min	1,22±0,67	4,59±1,28*	5,88±1,99*
I/R 100nM 3 Min	0,55±0,52	0,73±0,23	1,32±0,84
I/R 100nM 5 Min	0,24±0,16	0,35±0,17	1,68±0,47

Mittelwert±Standardabweichungen von n=4-7 Proben. \*, p<0,05 vs. I/R

Hinsichtlich der expressionellen Veränderungen traten Unterschiede vorwiegend bei den für den Calciumhaushalt der Zelle kodierenden mRNA Sequenzen auf. Dies gilt einerseits für die Heraufregulation des NCX in der niedrig dosierten Carbacholgruppe

mit präischämischer Einwaschphase (Tab. 4.2.b.) und für die SERCA2a und PLB in der hochdosierten Carbacholgruppe mit präischämischem Einwaschen. Genau diese Gruppen hatten zudem die beste Erholung, die hochdosierte Carbacholgruppe darüber hinaus auch eine bessere diastolische Funktion, was gut mit den Expressionsdaten übereinstimmt, auch wenn die in diesem Abschnitt gezeigten Befunde auf die mRNA Expression beschränkt ist. Hinsichtlich der Wirkung auf die SERCA2a ergab sich eine konzentrationsabhängige Wirkung. Auch die BNP-Expression war in dieser Gruppe am höchsten. Interessanterweise zeigten alle Carbacholgruppen eine geringere Expression an bcl-2. Dagegen war die Expression an bax nicht verändert.

### **4.3. Effekt von Carbachol auf isolierte postischämische Kardiomyozyten**

Die bisherigen Befunde zeigen eine protektive Wirkung von Carbachol auf die überlebenden Myozyten nicht aber auf die Infarktgröße. Um diese Befunde besser abzusichern wurden aus den post-ischämischen Herzen Myozyten isoliert und ihre Funktion unter elektrischer Stimulation im Frequenzbereich von 0,5 bis 2,0 Hertz bestimmt ( $\pm$  Isoprenalin 10nM).

#### **4.3.1. Wirkung von Carbachol auf die längenspezifische Längenänderung isolierter postischämischer Kardiomyozyten**

Zur Beurteilung der kontraktilen Funktion der isolierten Kardiomyozyten unter Carbacholeinfluss wurde die Längenänderung bei kontrahierenden Kardiomyozyten durch die diastolische Länge des jeweiligen Myozyten dividiert und in Prozent ausgedrückt (dL/L).

In Abb. 4.7. stellt sich nun diese spezifische Längenänderung (dL/L) dar. Die Gruppe der Normoxenherzen, die keine Behandlung oder Ischämie an der Langendorffanlage erfahren haben, verkürzten sich im Mittel um  $14,76 \pm 1,47\%$  und besaßen damit im Vergleich zu der Kontrollgruppe (I/R;  $11,78 \pm 1,58\%$ ) eine signifikant besser spezifische Längenänderung (Abb. 4.7.). Wie aus den vorherigen Experimenten erwartet, zeigten die Kardiomyozyten aus der Carbacholgruppe (I/R 100nM 0 Min) mit  $13,14 \pm 1,57\%$  Zellverkürzung eine gegenüber der I/R-Gruppe signifikant bessere lastfreie Zellverkürzung (Abb. 4.7.).

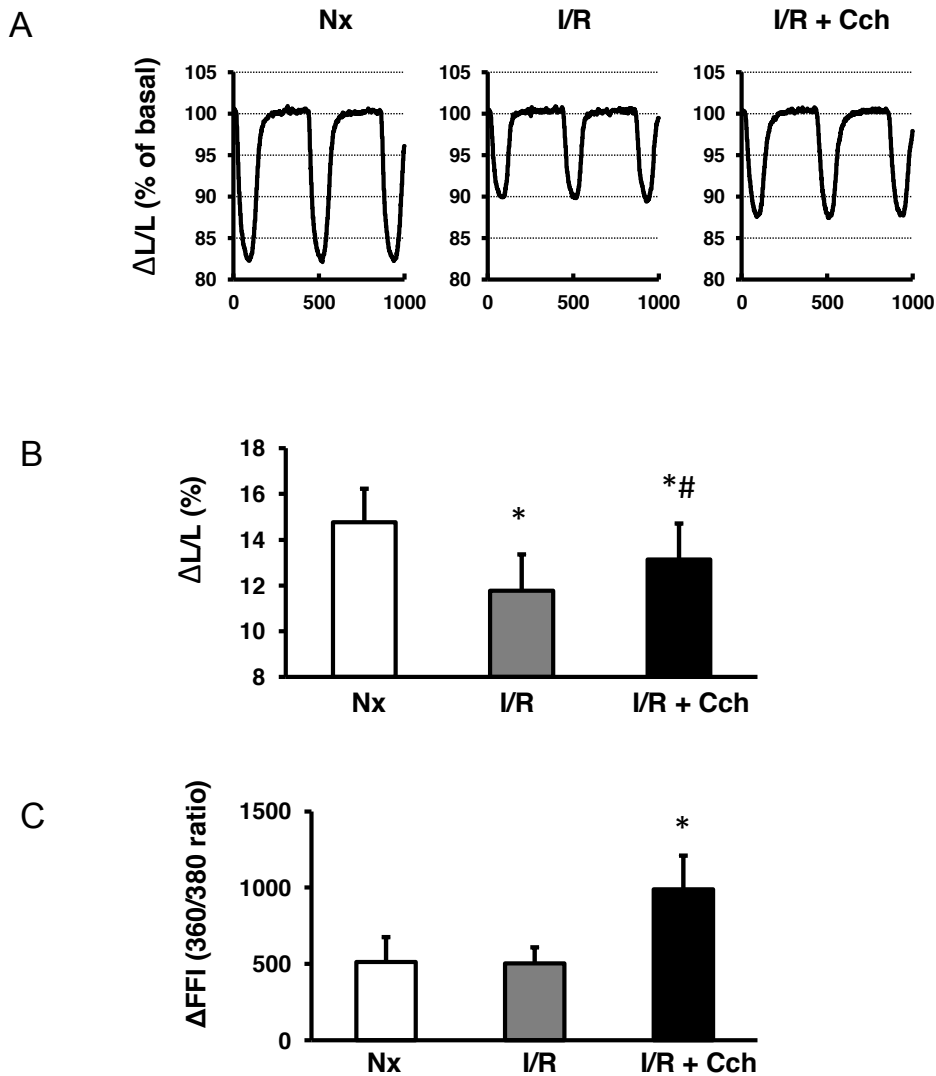


Abb. 4.7.: Kontraktionverhalten isolierter Herzmuskelzellen. Die Zellen wurden aus Herzen ohne Ischämie und Reperfusion isoliert (Nx), sowie aus den Gruppen I/R (s. Abb. 4.2) und I/R 100nM 0 Min (= I/R+Cch; siehe Abb. 4.2). Dargestellt sind die Mittelwerte+Standardabweichungen von n=13-14 Zellen. A) Repräsentative Zellverkürzung bei 2 Hz; B) Mittelwerte bei 0,5 Hz; C) Calciumtransienten bei 0,5 Hz.

Neben der längenspezifischen Längenänderung ist die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit ebenfalls ein guter Marker für die Funktionsparameter der isolierten Kardiomyozyten. Diese lag in der normoxen Gruppe  $340 \pm 94 \mu\text{m/s}$  und in der Carbacholgruppe mit  $348 \pm 83 \mu\text{m/s}$  auf einem annähernd gleichen Niveau, während die Kontrollgruppe mit  $270 \pm 31 \mu\text{m/s}$  signifikant schlechtere maximale Kontraktionsgeschwindigkeiten aufwies. Diese Befunde bestätigen die aus den Langendorff-Experimenten getroffenen Hypothese, dass Carbachol die Funktion der überlebenden Restmyozyten verbessert.

Die Relaxationsgeschwindigkeit als dritter Parameter der Funktionsfähigkeit der Kardiomyozyten lässt, ebenfalls wie die Kontraktionsgeschwindigkeit, Rückschlüsse auf die Aktivität der Serca2a, weiterer Enzyme und ATPasen zu, da sie für die Bereitstellung des  $\text{Ca}^{2+}$  verantwortlich sind. Hier ließen sich allerdings kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen feststellen. Erst unter höherer Stimulation mit 2 Hz zeigt sich bei der Carbacholgruppe eine signifikante Steigerung der Relaxationsgeschwindigkeit ( $281 \pm 59 \mu\text{m/s}$  vs.  $249 \pm 81 \mu\text{m/s}$  (Nx) und  $243 \pm 57 \mu\text{m/s}$  (I/R)).

Die anhand der Zellverkürzung erzielten Ergebnisse zusammen mit den Expressionsanalysen ließen auf einen verbesserten Calciumhaushalt in den carbacholbehandelten Zellen/Herzen schließen. Dies wurde anhand der Bestimmung des Calciumtransienten überprüft. In einer separaten Serie an Zellen, fand sich in der Tat ein höherer Calciumtransient (Abb. 4.7.c.). Dieser wurde anhand des fluoreszierenden Fura-2 abgeleitet und als Differenz zwischen maximal erreichbaren Werten während der Systole und Basalwerten während der Diastole kalkuliert.

#### 4.4. Einfluss von Carbachol auf die Serca2a- und Phospholambanexpression

Um die bisherigen Expressionsergebnisse abschließend auf Proteinebene zu bestätigen, wurden die isolierten Kardiomyozyten mittels WesternBlot-Verfahren auf die Expression der Serca2a und des phosphorylierten Phospholambans hin untersucht. Abb. 4.8. fasst die Befunde zusammen.

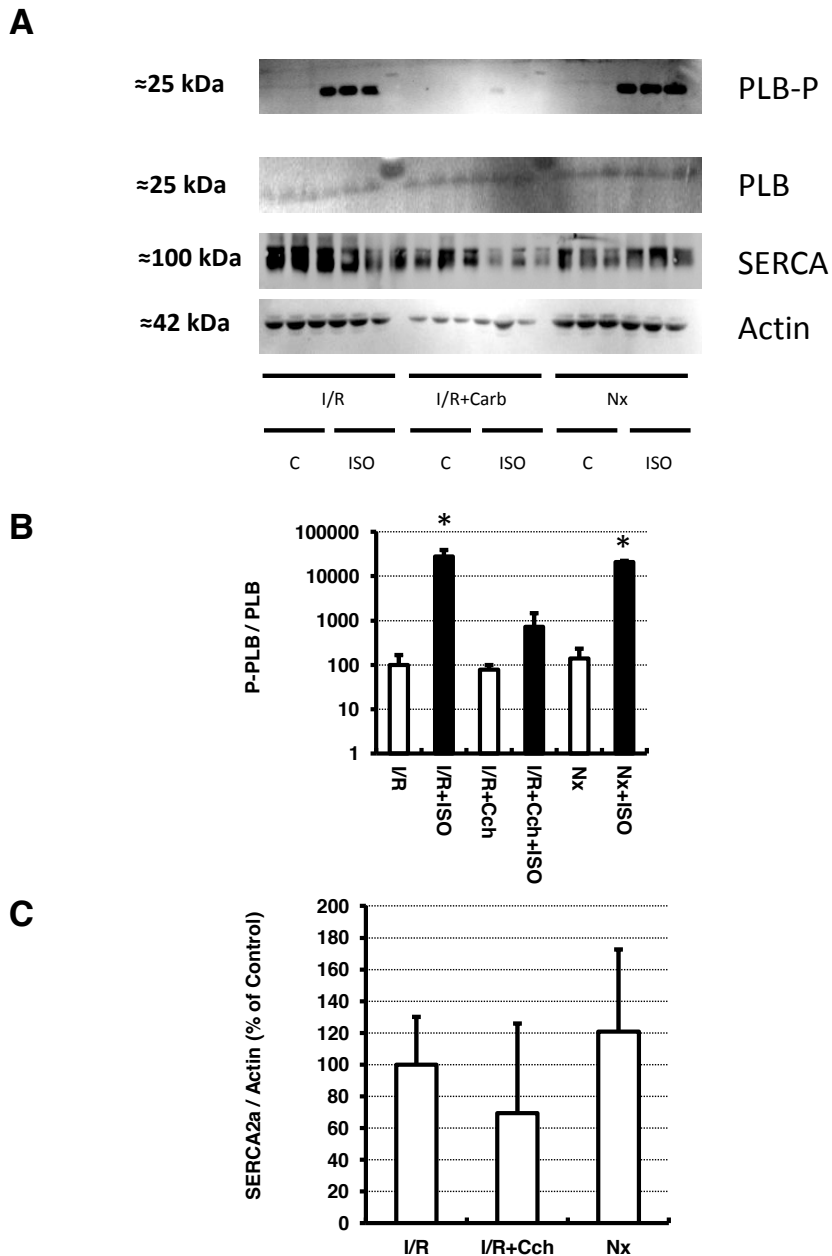


Abb. 4.8.. Western-Blot Analyse zur Proteinexpression von phosphoryliertem PLB und SERCA2a aus den unter Abb. 4.7 spezifizierten Gruppen. Dargestellt sind

Mittelwerte+Standardabweichungen aus n=3 Präparationen. A) Repräsentative Western Blots; B) Quantitative Auswertung des Verhältnisses von phosphoryliertem PLB zu Gesamt-PLB; C) Expression von SERCA2a (normiert auf die Beladungskontrolle Actin). \*, p vs. ohne Isoprenalin

Die Überprüfung der Westernblot-Daten zeigte, dass die zuvor beobachteten Änderungen in der Expression auf mRNA-Ebene hinsichtlich der SERCA2a-Expression, in der Kürze der Reperfusionzeit (2 Stunden) noch nicht zu einem signifikanten Anstieg der Proteinmenge führen (Abb. 4.8.a. und 4.8.c.). Allerdings zeigte sich anhand des Phospholambans überraschender Weise, dass die  $\beta$ -adrenerge Kopplung hinsichtlich der Phosphorylierung von Phospholamban gehemmt ist (Abb. 4.8.a. und 4.8.b).

## 5. Diskussion

Die Stimulation cholinergere Rezeptoren adulter Rattenkardiomyozyten bedingt eine Einflussnahme auf die Funktion der Myozyten. Ein bekannter Effekt ist eine negative Inotropie, die indirekt durch die Aktivierung eines hemmenden G-Proteins, dessen Alpha-Untereinheit wiederum die Adenylatcyclase hemmt, erreicht wird. Die Beta-Gamma-Untereinheit aktiviert dabei zusätzlich den GIRK (G protein activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel). Dadurch wird die Depolarisation der Membran und der Calcium Einstrom erschwert. Der cAMP-Spiegel der Kardiomyozyten sinkt, der transsarkolemmale Calciumstrom wird vermindert und die Inotropie der Zellen lässt nach. Diese Wirkung einer cholinergen Rezeptorstimulation auf das Ventrikelmyokard ist seit langem bekannt und hat längst Eingang in die gängigen Lehrbücher der Physiologie gefunden. Des Weiteren kann ein Effekt durch Präkonditionierung vor der Ischämie beobachtet werden, wie es bereits Murry et al. im Jahre 1986 beschrieben hat.

Der Hauptbefund dieser Arbeit zeigt nun zusätzlich eine dritte, neue Reaktion der Kardiomyozyten auf die cholinerge Rezeptorstimulation: Es handelt sich um eine langfristige Verbesserung der postischämischen Funktion der behandelten Kardiomyozyten, wenn die cholinerge Stimulation während der Ischämie erfolgt.

## 5.1. Hauptbefunde

Im Rahmen dieser Studie wurde auf drei Schwerpunkte eingegangen:

1. Bereits Murry et al. stellte fest, dass die Präkonditionierung von Tierherzen den postischämischen Schaden reduziert (Murry et al 1986). Die Untersuchungen in dieser Arbeit zeigten, dass zudem eine deutliche Verbesserung der postischämischen Herzfunktion bei pharmakologischer Stimulation cholinergerezeptoren eintritt. Es kann allerdings hier nicht von einer Präkonditionierung gesprochen werden, da beim vollständigen Auswaschen des Carbachols vor der eigentlichen Ischämiephase die protektive Wirkung wieder verloren ging.
2. Die Betrachtung der postischämischen Erholung am Ganzherzpräparat (Langendorff-Herz) unter Gabe von Carbachol erlaubte den Einfluss der präischämischen cholinergen Rezeptorstimulation für die funktionelle Erholung am ganzen Herzen nachzuweisen und dabei sowohl eine mögliche Wirkung auf das überlebende Restmyokard als auch auf die Infarktgröße zu untersuchen. Ein wesentlicher neuer Befund dieser Arbeit ist die Erkenntnis, dass Carbachol während der Ischämie mittelfristig die funktionelle Erholung des überlebenden Restmyokards begünstigt.
3. Durch die Reperfusion postischämischen Myokards kann die ursprüngliche Funktion wieder erlangt werden. Dieser Vorgang braucht allerdings viel Zeit. Die Eigenschaft des überlebenden Myokards nach einer Minderversorgung mit Sauerstoff sich vorübergehend nicht vollständig funktionell zu erholen, ist bekannt und wird als „Stunning“ beschrieben. Dabei nennt man in Analogie zu einem Boxer, der nach einem Schlag betäubt zu Boden geht, die betroffenen Herzareale „stunned myocardium“. Man kann zusammenfassend sagen, dass „Stunned Myocardium“ normal perfundiert ist, aber vorerst akinetisch bleibt (Picano 2003). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch selektive Aktivierung cholinergerezeptoren während der Ischämie das „Stunning“ effektiv unterdrückt werden kann.

### **5.1.1. Wirkung von Carbachol auf das überlebende Restmyokard**

Um zu zeigen, dass gerade die Kardiomyozyten, die die Ischämie überlebten, für die carbacholabhängige Funktionsverbesserung verantwortlich sind, wurden zwei unterschiedliche Ansätze ausgewählt. Zum einen wurden Rattenherzen, als Gesamtorgan, einer cholinergen Rezeptorstimulation während der Ischämie ausgesetzt. Hier konnte gezeigt werden, dass der Reperfusionsschaden, welcher durch die Zellkontraktionen entsteht, trotz cholinergischer Stimulation nicht geringer war. Dieser wurde anhand der Menge an ausgeschiedenen Proteinen im Herzperfusat bestimmt. Trotzdem war die funktionelle Erholung der isolierten Rattenherzen postischämisch besser. Es kann an dieser Stelle kritisch hinterfragt werden, ob die hier verwendete Methode (Proteinfreisetzung) geeignet ist einen möglichen Effekt auf die Infarktgröße zu untersuchen. Dies kann aber eindeutig bejaht werden, da in der vorliegenden Arbeit der klassische Ansatz einer ischämischen Postkonditionierung wie erwartet eine verminderte Proteinfreisetzung zeigte. Interessanterweise war ein ähnlicher Effekt auch durch Carbachol zu erzielen (pharmakologische Postkonditionierung). Allerdings führten beide Verfahren im hier untersuchten Zeitrahmen (2 Stunden Reperfusion) zu keiner funktionellen verbesserten Erholung. Ein unabhängiger Ansatz um zu zeigen, dass die Wirkung auf das überlebende Restmyokard zielt, waren die Untersuchungen an isolierten Zellen, die aus den post-ischämischen Herzen isoliert wurden.

### **5.2. Behandlung von Kardiomyozyten mit Carbachol führt zu einer verbesserten Zellfunktion bei niedrigen Schlagfrequenzen**

Für die Funktion der Kardiomyozyten spielt die Aufnahmegeschwindigkeit von Calcium aus dem Intrazellularraum in das Sarkoplasmatische Retikulum (SR) eine grundlegende Rolle (Periasamy and Huke, 2001). Dies gilt vor allem bei höheren Schlagfrequenzen. Die Aufnahme von Calcium in das sarkoplasmatische Retikulum wird durch die Serca2a gesteuert, wobei eine größere Serca2a-Aktivität auch eine vermehrte Aufnahme von Calcium bedeutet. Ihrerseits wird die Aufnahmegeschwindigkeit der Serca2a durch das Protein Phospholamban reguliert. Durch die Phosphorylierung des Phospholambans wird eine Trennung von der Serca2a bewirkt, wodurch eine höhere Pumpaktivität von Calcium in das sarkoplasmatische Retikulum erreicht wird (MacLennan et al., 2003) (s. Abb.: 5.1). Die Untersuchungen zeigten, dass durch eine präischämische Gabe von Carbachol die isolierten und mit

Isoprenalin behandelten Kardiomyozyten nicht in der Lage sind, das Phospholamban zu phosphorylieren (Abb. 5.2). Dennoch war die Funktion der Zellen unter die  $\beta$ -adrenorezeptor Stimulation leicht verbessert, denn die durchschnittliche Verkürzungsamplitude der isolierten Zellen und die Calciumtransienten hatten zugenommen. Dies beruhte vorwiegend auf einer besseren Kontraktion und weniger auf einer besseren Relaxation.

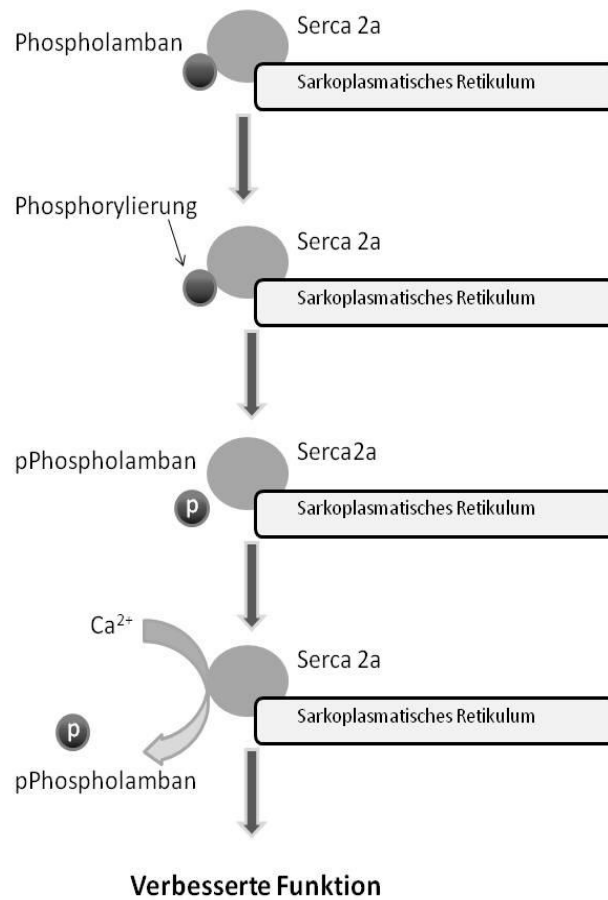


Abb.5.1.: Einfluss einer Phosphorylierung von Phospholamban auf die Aktivität der Serca2a von Phospholamban auf die Zellfunktion

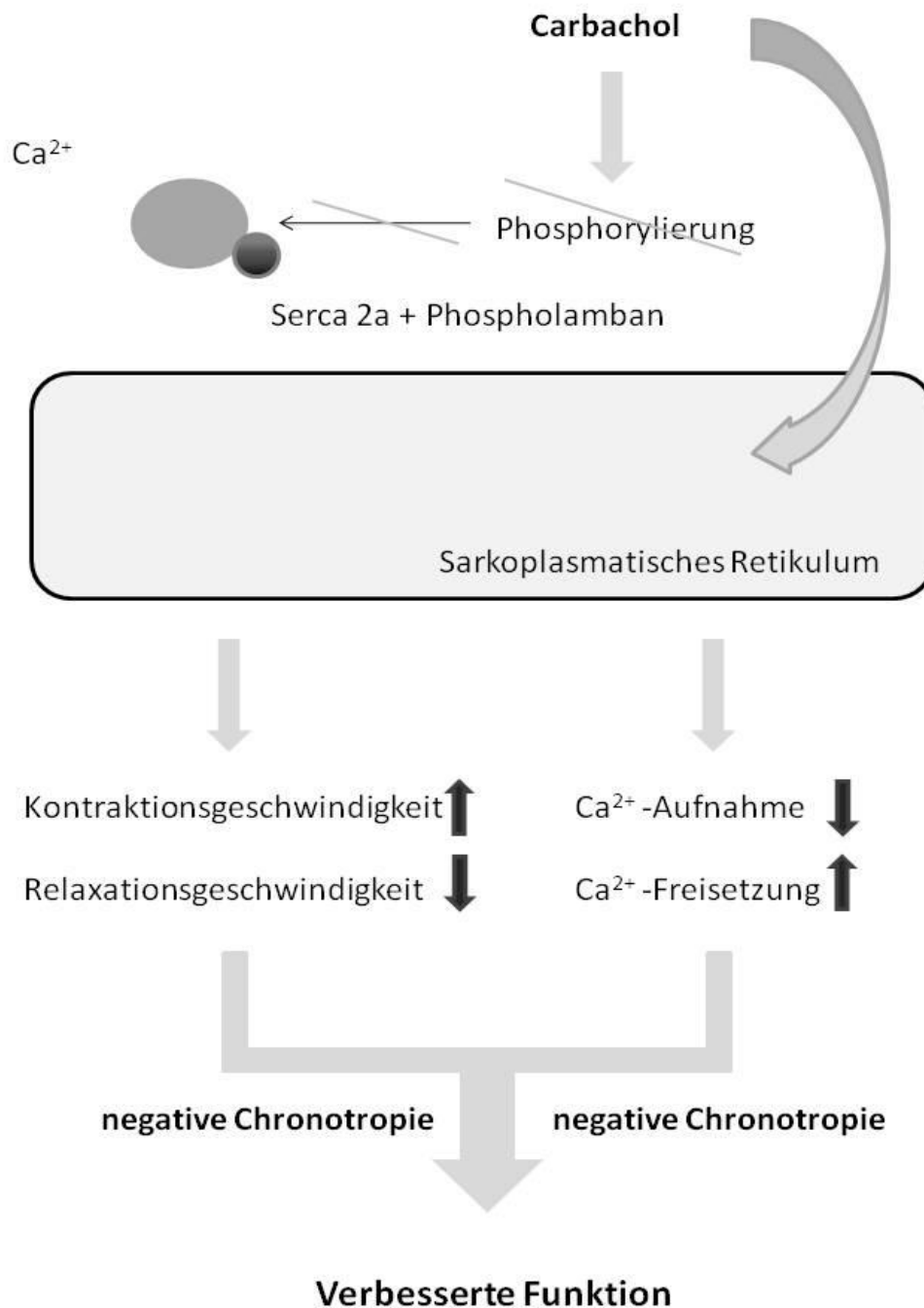


Abb.5.2.: Einfluss von Carbachol auf die Serca2a und die Zellfunktion

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass präischämische Gabe von Carbachol zu einer signifikant verbesserten Funktion der überlebenden Kardiomyozyten in der Reperfusionphase führt, ohne dass zum jetzigen Zeitpunkt der exakte Mechanismus als gesichert angenommen werden kann.

### **5.3. Die Rolle von Carbachol als Präkonditionierungsstimulus**

In dieser Hinsicht zeigt diese Untersuchung keinen präkonditionierenden Effekt von Carbachol in dem hier angewandten Versuchsprotokoll wie ihn Murry et al. (1986) beschrieben hat. Ein erwarteter Schutz der Kardiomyozyten durch eine ausschließlich präischämische Vorbehandlung mit Carbachol blieb aus. Dies zeigt vor allem das Protein leakage der Carbachol- und der Kontrollgruppen. Dies steht im Kontrast zu anderen Studien, in denen Acetylcholin als cholinerges Rezeptor Agonist einen präkonditionierenden Effekt im Sinne einer Infarktgrößenreduktion hat (Cave et al, 2000; Critz et al., 2005; Kawada et al., 2002). Eine Begründung hierfür könnte sein, dass Carbachol durch die Acetylcholinesterase nicht abgebaut wird und dadurch im Gewebe akkumuliert und dadurch eine klassische Präkonditionierung nicht auslöst.

Zudem gibt es viele unterschiedliche Rezeptoren, die auf die cholinerge Stimulation reagieren können. Zu nennen sind hier die nikotinergen und muskarinergen Rezeptoruntergruppen. Vor dem Hintergrund, dass hier der Rezeptor, welcher für den beobachteten Effekt der Funktionsverbesserung verantwortlich ist, nicht spezifisch untersucht wurde, lässt sich hier keine definitive Aussage über die Signalkaskade und den Rezeptor tätigen. In einer unabhängigen weiteren Doktorarbeit aus dieser Gruppe wurde deshalb in einer ähnlichen Serie die Wirkung von Nikotin untersucht. Hier fanden sich keine vergleichbaren Befunde, sogar eine Verschlechterung der postischämischen Funktion, sodass eine muskarinerg-vermittelte Wirkung für die hier dokumentierten Befunde als wahrscheinlich gelten kann (pers. Mitteilung von Prof. Dr. K.-D. Schlüter). Die Schlussfolgerung liegt nahe, dass Nicotin und Carbachol als Vertreter der muskarinergen und nikotinergen Rezeptoren als Antagonisten wirken. Dies könnte den infarktreduzierenden Effekt von Carbachol in dem hier angewandten Versuchsprotokoll reduziert haben.

#### **5.4. Kein funktioneller positiver Effekt bei der Nutzung von Carbachol mittels pharmakologischer Postkonditionierung**

Die Verbesserung der kardialen Funktion konnte des Weiteren nicht durch eine Gabe von Carbachol nach der Ischämie erreicht werden. Allerdings konnte der Ischämieschaden (Infarktgröße) durch ein Postkonditionierung signifikant verringert werden. Dies betont nochmals, dass Carbachol während der Ischämie für den hier beobachteten Effekt der Funktionsverbesserung der Kardiomyozyten unbedingt vorhanden sein muss. Andererseits bestätigen die Befunde die ursprünglich gefundenen Ergebnisse einer Infarktgrößenreduktion ohne frühe verbesserte Funktion bei der klassischen Postkonditionierung (Zhao et al., 2003).

#### **5.5. Einfluss von Carbachol auf das Post-Infarkt Remodelling**

Um die Veränderungen in den Kardiomyozyten zu verstehen und den Weg der Einflussnahme nachvollziehen zu können, ist es unabdingbar, den Einfluss der Rezeptorstimulation auf das Remodelling zu untersuchen. Als ersten Schritt auf diesem Weg wurde die frühe mRNA- und Protein-Expression der Kardiomyozyten untersucht. Dabei lag der Schwerpunkt auf dem natriuretischen Peptid (BNP), den Apoptose-Proteinen (bcl-2 und bax) und den Proteinen des Calcium-Haushaltes. Ein wichtiges Ergebnis dabei ist, dass durch den hier neu beschriebenen Effekt des Carbachols während der Ischämie die BNP mRNA Expression gesteigert wird. Zusätzlich hat die Expression der Serca2a mRNA zugenommen. Dies spricht alles für einen positiven Remodellingeffekt. Hinsichtlich der apoptotischen Parameter fand sich eine verminderte Expression von bcl-2 in allen carbacholbehandelten Gruppen unabhängig von Zeitpunkt und Dauer der Einwirkung. Dagegen blieb die Expression des pro-apoptotischen Gens bax unbeeinflusst. Dies deutet zumindest die Gefahr einer höheren Apoptoserate in den carbacholbehandelten Herzen an und könnte eine mögliche Anwendung des Prinzips erschweren.

## 6. Schlussfolgerung

Es konnte gezeigt werden, dass durch die prä-ischämische und per-ischämische Stimulation cholinergere Rezeptoren adulter Rattenkardiomyozyten eine Verbesserung der postischämischen Funktion erreicht wird. Ein positiver Effekt auf das Remodelling nach der Ischämie konnte ansatzweise ebenfalls nachgewiesen werden. Ein erhoffter infarkt-reduzierender Effekt durch dieses Verfahren mit Carbachol konnte nicht gefunden werden. Inwiefern die Erkenntnis dieser Studie sich auf die Reperfusionstrategie in dem klinischen Alltag transferieren lässt, bleibt abzuwarten. Vorerst müssen in weiteren Untersuchungen der Rezeptor und die dazu gehörige Rezeptorkaskade identifiziert werden. Einen Hinweis auf die Relevanz dieser Untersuchungen wird momentan durch klinische Studien gegeben. Dabei wird die Rolle der vagalen Stimulation für die Behandlung von Herzkrankheiten untersucht (Schwartz 2008). Allerdings ist hier vielleicht der Anspruch auch falsch gestellt. Die hier gezeigten Befunde zeigen, dass ein Herz von einer per-ischämischen Stimulation cholinergere Rezeptoren profitieren könnte. Umgekehrt ist es unter pathophysiologischen Aspekten aber genau anders herum. Da während eines ischämischen Insults es zu einer massiven Aktivierung des sympathischen Nervensystems kommt, bleibt umgekehrt die vagale Stimulation gehemmt. Somit entfällt der hier pharmakologisch gezeigte protektive Effekt auf die post-ischämische Erholung und das Fehlen des hier gezeigten Effektes fördert das „stunned myocardium“.

## 7. Zusammenfassung

In neueren Untersuchungen wurden funktionell gekoppelte muskarinerge Rezeptoren im linken Ventrikel beschrieben. Dies bedingt die Frage nach der funktionellen Relevanz dieser Rezeptoren für den Ventrikel. Deshalb wurden die Effekte einer cholinergen Stimulation während und vor einer Ischämie durch Gabe unterschiedlicher Konzentrationen eines stabilen Agonisten cholinergere Rezeptoren untersucht.

Die Gabe von Carbachol als Präkonditionierungsstimulus zeigte im Ganzherzexperiment keinen infarkt-reduzierenden Effekt. Jedoch war trotz gleicher Infarktgrößen die postischämische Funktionserholung unter Carbachol während der Ischämie signifikant verbessert (Kontrolle  $68,0 \pm 4,4\%$ , Carbachol 100 nM:  $106,7 \pm 10,5\%$ , Carbachol 100 pM:  $83,2 \pm 11,6\%$ ).

Isolierte Myozyten aus Carbachol-behandelten Herzen zeigten bei höheren Stimulationsfrequenzen eine höhere Kontraktionsgeschwindigkeit verglichen mit Myozyten aus post-ischämischen Kontrollherzen. Der Effekt war in Gegenwart von Isoprenalin, welches die SERCA-Aktivität begünstigt, nochmals signifikant verbessert. Dies belegte auch die Messung des ausströmenden Calciumtransienten, welcher bei behandelten Herzen signifikant höher war.

Es zeigte sich eine signifikant höhere mRNA Expression von SERCA2a und Phospholamban, was sich jedoch nicht in den jeweiligen Proteinexpressionen widerspiegelte.

Unter Carbacholschutz nahm die mRNA Expression von BNP, aber nicht von ANP, bcl-2 und bax zu.

Eine cholinerge Rezeptorstimulation während der Ischämie begünstigt somit die frühe post-ischämische Funktionserholung. Dies begünstigt auch mittelfristig eine postischämische Erholung. Hinweise für einen positiven Effekt auf das Remodelling fanden sich. Die Infarktgrößenreduktion durch eine Präkonditionierung mittels Carbachol konnte nicht nachgewiesen werden.

Weitere Untersuchungen müssen nun den genauen Aktivierungsmechanismus der funktionellen Erholung klären.

## 8. Summary

Some investigations show that there are functionally coupled cholinergic receptors in the left ventricle. This has led to the question of their functional relevance. Here the consequences of the activation of these receptors by an acetylcholin mimetic that is inert to acetylcholine esterases was tested.

Preischemic administration of Carbachol to isolated perfused rat hearts shows no infarct sparing effect. Certainly carbachol during ischemia is able to improve postischemic functional recovery (Control  $68,0\pm 4,4\%$ , Carbachol 100 nM:  $106,7\pm 10,5\%$ , Carbachol 100 pM:  $83,2\pm 11,6\%$ ).

Isolated cells from hearts after ischemia and reperfusion show a lower cell shortening. A significant improvement of contraction velocity was recognized, but not of the relaxation velocity. This was also accompanied by a higher velocity to increase intracellular calcium concentration.

On the mRNA expression level, the drug increased phospholamban and SERCA2a expression, but this was not accompanied by significant change in protein expression during the time we analyzed the cells on functional recovery level. However, with carbachol protection the ventricular mRNA expression of BNP was also increased, but not of bax, bcl-2 or ANP.

Stimulation of cholinergic receptors of cardiomyocytes during ischemia improves the post-ischemic cell function. This leads to a long-lasting functional recovery by acting on surviving cardiomyocytes. Even the stunned myocytes receive a quick functional recovery. A protective effect of carbachol on the treated cardiomyocytes was not able to be shown at all.

Whether these effects can be used in clinical practice has yet to be proven. First we must analyze the exact way of activating the shown functional recovery and recover the signal pathways.

## 9. Abkürzungen

% (vol/vol)	Volumenprozent
% (wt/vol)	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
AA/BA	Acrylamid / Bisacrylamid
ANF	atrialer natriuretischer Faktor
Ang II	Angiotensin II
AON	Antisense-Oligonukleotide
APS	Amoniumpersulfat
aqua bidest	aqua bidestillata
AU	arbitrary unit
AV-Knoten	Artrioventrikularknoten
Bax	proapoptotische Zelle
BCIP	5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
Bcl2	B-cell lymphoma 2
BNP	B-Type Natriuretic Peptide
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum-Albumin
ca.	Zirka
Ca <sup>2+</sup>	Calciumionen
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cDNA	komplementäre DNA
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
Con <sub>max</sub>	maximale Relaxationsgeschwindigkeit
cpm	counts per minute
CPP	coronarer Perfusionsdruck
CT-Wert	Fluoreszens-Schwellenwertes
DiasP	diastolischer Druck
div	Divisionen
dL/L	Längenänderung
DNA	Desoxyribonukleinsäure

EKG	Elektrokardiogramm
ERK	extracellular regulated kinase
fw-Primer	Vorwärts
GIRK	G protein activated inwardly rectifying K <sup>+</sup> channel
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-2-ethanolsulfonsäure
HF	Herzfrequenz
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
Hz	Hertz
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
L	Länge
LVDP	Left Ventricular Developed Pressure
LVDP	linksventrikulärer diastolischer Druck
LVeDP	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck
MAP- Kinase	Mitogen aktivierte Proteinkinase
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimol/l
ms	Millisekunde
NaCl	Natriumchlorid
NBT	Nitro-Blue-Tetrazolium
Ncx	Natrium-Calcium-austauscher
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
ø	Durchmesser
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD98059	2-Amino-3-Methoxyflavone
PE	Phenylephrin
PerfP	Perfusionsdruck
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Aktivität

PKC	Protein-Kinase C
PLB	Phospholamban
PS	Proteinsynthese
Rel <sub>max</sub>	maximale Relaxationsgeschwindigkeit
rev-Primer	Rückwärts
RNA	Ribonukleinsäure
Rpp	Rate Pressure produkt
SD	Standardabweichung
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Serca2a	Calciumpumpe des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Reticulums
SR	sarkoplasmatische Retikulum
SysP	systolischer Druck
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetrabutylammoniumhydrogensulfat
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
TT10%	Geschwindigkeit des Calciumeinstromes
TTP	Dauer des Calciumeinstromes
U	Unit
upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
V/div	Volt/Divisionen
vs.	Versus

## 10. Literaturverzeichnis

Abdallah Y, Gkatzoflia A, Pieper H, Zoga E, Walther S, Kasseckert S, Schäfer M, Schlüter K-D, Piper HM, Schäfer C. Mechanism of cGMP-mediated protection in a cellular model of myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2005; 66:123-131

Abdallah Y, Gkatzoflia A, Gligorievski D, Kasseckert S, Euler G, Schlüter K-D, Schäfer M, Piper HM, Schäfer C. Insulin protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture by a survival pathway targeting SR Ca<sup>2+</sup> storage. *Cardiovasc Res* 2006; 70:346-353.

Anwar A, Taimor G, Korkusuz H, Schreckenber R, Bernd T, Abdallah Y, Piper HM, Schlüter K-D. PKC-dependent signal transduction pathways increase SERCA2 expression in adult rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 39:911-919.

Anwar A, Schlüter K-D, Heger J, Piper HM, Euler G. Enhanced SERCA2a expression improves contractile performance of ventricular cardiomyocytes of rat under adrenergic stimulation. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 2008; 457: 485-491.

Armour J. A. Myocardial ischaemia and the cardiac nervous system. *Cardiovasc. Res* 1999; 41: 41–54.

Aschoff Ludwig. Über die Entdeckung des Blutkreislaufes. *H. F. Schulz*. 1938; 5-47.

Bayer Hans. Anatomie des Herzens nach Galen. 1943; 4-16.

Benninghoff Alfred, Drenckhahn Detlev. Anatomie. Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen. Urban & Schwarzenberg. 2008; 59-64.

Boenheim Felix. Von Huang-ti bis Harvey. Zur Geschichte der Entdeckung des Blutkreislaufs. Fischer. 1957; 20-60.

Cave A., Garlick P. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol* 2000; 32: 1759–1760.

Critz SD, Cohen MV, Downey JM. Mechanisms of acetylcholine- and bradykinin-induced preconditioning. *Vasc Pharmacol* 2005; 42: 201-209.

Deichgräber Karl. Galen als Erforscher des menschlichen Pulses. Ein Beitrag zur Selbstdarstellung des Wissenschaftlers. Akad.-Verl. 1957; 3-40.

Doods HN., Dammgen J., Mayer N., Rinner I., Trach V. Muscarinic receptors in the heart and vascular system. *Prog Pharmacol Clin Pharmacol* 1989; 47-72.

Döring H. J. und Dehnert H. Das isolierte perfundierte Warmblüter - Herz nach Langendorff. *Methoden der experimentellen Physiologie und Pharmakologie* 1985; 1: 1-24

Eyster J.A.E and W.J Meek. Experiments on the origin and propagation of the impulse in the heart - the point of primary negativity in the mammalian heart and the spread of negativity to other regions. *Heart* 1914; 370.

Flack M. An investigation of the sinu-auricular node of the mammalian heart. *J Physiol.*1910; 1-14.

Godfrey K et al. Statistics in practice. Comparing the means of several groups. *N Engl J Med*, 1985; 313: 1450-1456.

Groß Dominik, Keil Gundolf. *Medizin in Geschichte, Philologie und Ethnologie*. 2003; Königshausen und Neumann

Habermehl Karl-Heinz; Vollmerhaus, Bernd; Wilkens, Helmut. *Kreislaufsystem, Haut und Hautorgane*. Parey.1984; 37.

Higuchi R., Dollinger G., Walsh PS., Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)*, 1992; 10: 413-417.

Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)*, 1993; 11: 1026-1030.

His Wilhelm, Bast Theodore H., Gardner Weston D. The activity of the embryonic human heart and its significance for the understanding of the heart movement in the adult. *Journal of the history of medicine and allied sciences* 1949; 289-318.

Hodgkin A. L. *The Pursuit of nature. Informal essays on the history of physiology*. Cambridge University Press 1977; 64-83.

Hosey M. M. Diversity of structure, signaling and regulation within the family of muscarinic cholinergic receptors. *FASEB J* 1992; 6: 845–852.

Kary B. Mullis. *The polymerase chain reaction*. Birkhäuser, Boston 1994

Kawada T., Yamazaki T., Akiyama T., Sato T., Shishido T., Inagaki M. et al. Differential acetylcholine release mechanisms in the ischemic and non-ischemic myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol* 2000; 32: 405–414.

Kawada Toru, Yamazaki Toji, Akiyama Tsuyoshi, Mori Hidezo, Inagaki Masashi, Shishido Toshiaki et al. Effects of brief ischaemia on myocardial acetylcholine and noradrenaline levels in anaesthetized cats. In: *Auton Neurosci* 2002; 95: 37–42.

Keith Arthur, Flack Martin William. The form and nature of the muscular connections between the primary divisions of the vertebrate heart. *Cardiac classics*. 1907; 747-762

Klinke Rainer, Bauer Christian. *Physiologie*. Thieme 2005; 163.

Ladilov Y, Efe Ö, Schäfer C, Rother B, Kasseckert S, Abdallah Y, Piper HM. Reoxygenation-induced rigor-type contracture. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35: 1481-1490.

Langer M, Lüttecke D, Schlüter K-D. Mechanism of the positive contractile effect of nitric oxide on rat ventricular cardiomyocytes with positive force/frequency relationship. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 2003; 447: 289-297.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.

Loewi Otto, Navratil E., Engelhart Erich, Fulton John F. Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. 1924-38 v.p.; 16.

Longrigg James. *Greek rational medicine. Philosophy and medicine from Alcmaeon to the Alexandrians*. Routledge 1993; 104-113.

Macklin K. D., Maus A. D., Pereira E. F., Albuquerque E. X., Conti-Fine B. M. Human vascular endothelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 1998; 287: 435–439.

Maier T., Schreckenber R., Schlüter K-D. Effect of preischemic  $\beta$ -adrenoceptor stimulation on postischemic contractile dysfunction. *Life Science* 2009; 84: 437-443.

MacLennam David H., Asahi Michio, Tupling A. Russell. The Regulation of SERCA-Type Pumps by Phospholamban and Sarcoplipin. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2003; 986: 472–480.

Moccia F., Frost C., Berra-Romani R., Tanzi F., Adams D. J. Expression and function of neuronal nicotinic ACh receptors in rat microvascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* 2004; 286: H486-91.

Mufti S, Wenzel S, Euler G, Piper HM, Schlüter K-D. Angiotensin II-dependent loss of cardiac function: Mechanisms and pharmacological targets attenuating this effect. *J Cell Physiol* 2008; 217: 242-249.

Münzel G, Schlier A, Schreckenber R, Abdallah Y, Schlüter K-D. Rat intermedin<sub>1-47</sub> does not improve functional recovery in postischemic hearts. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2011; 311: 535-542.

Murry C. E., Jennings R. B., Reimer K. A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124–1136.

National Institutes of Health: Guide for the care and use of laboratory animals. 1985; No. 86-23

Numa, S. A molecular view of neurotransmitter receptors and ionic channels. *Harvey Lect* 1987; 83: 121–165.

Parry, Caleb Hillier. An inquiry into the symptoms and causes of the syncope anginosa. Commonly called angina pectoris; illustrated by dissections Cadell and Davies 1799; 10-184.

Peralta E. G., Winslow J. W., Peterson G. L., Smith D. H., Ashkenazi A., Ramachandran J. et al. Primary structure and biochemical properties of an M2 muscarinic receptor. *Science* 1987; 236: 600–605.

Picano, Eugenio. *Stress echocardiography*. Springer 2003; 25-120.

Periasamy M., Huke S. SERCA pump level is a critical determinant of Ca(2+)homeostasis and cardiac contractility. *J. Mol. Cell. Cardiol* 2001; 33: 1053–1063.

Pisarenko OI, Shulzhenko VS, Studneva IM. Metabolic and functional effects of carbachol and ischaemic preconditioning in rat isolated heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999; 26: 26-31.

Piper HM.; Probst I.; Schwartz P.; Hutter JF.; Spieckermann PG. Culturing of calcium stable adult cardiac myocytes. *J Mol Cellh Cardiol* 1982; 14: 397-412.

Porter, Roy. *Die Kunst des Heilens. Eine medizinische Geschichte der Menschheit von der Antike bis heute.* Akad. Verl. 2003; 77-215.

Rothschuh, Karl Eduard. *Geschichte der Physiologie.* Springer-Verlag 1953; 9-249.

Hoolihan, C. Companion Encyclopaedia of the History of Medicine. *Bull Med Libr Assoc.* 1994; 82: 447–448.

Hosey MM. Diversity of structure, signaling, and regulation within the family of muscarinic cholinergic receptors. *FASEB J* 1992; 6: 845-852.

Schäfer M. K., Eiden L. E., Weihe E. Cholinergic neurons and terminal fields revealed by immunohistochemistry for the vesicular acetylcholine transporter. II. The peripheral nervous system. *Neuroscience* 1998; 84: 361–376.

Schwartz P., Deferrari G., Sanzo A., Landolina M., Rordorf R., Raineri C. et al. Long term vagal stimulation in patients with advanced heart failure First experience in man. *European Journal of Heart Failure* 2008; 10: 884–891.

Shepherd, Gordon M. *The synaptic organization of the brain.* Oxford Univ. Press. 2004; 1-55

Schlüter K-D., Piper H.M. Trophic effects of catecholamines and parathyroid hormone on adult ventricular cardiomyocytes. *Am J Physiol* 1992; 263: H1739-1746

Schlüter K-D, Schreiber D. Adult ventricular cardiomyocytes: isolation and culture. *Methods Mol Biol* 2005; 290: 305-314.

Schlüter K-D.; Weber M.; Piper H.M. Effects of PTHrP(107-111) and PTHrP(7-34) on adult cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 3057-3065

Sterin-Borda Vila-Echague A.; Perez-Leiros C.; Genaro A.; Borda E. Endogenous nitric oxide signalling system and the cardiac muscarinic acetylcholine receptor-inotropic response. *Br J Pharmacol* 1995; 115: 1525-1531

Su N.; Narayanan N. Age related alteration in cholinergic but not alpha adrenergic response of rat coronary vasculature. *Cardiovasc. Res* 1993; 27: 284–290.

Tawara, Sunao. *Das Reizleitungssystem des Säugetierherzens*. Gustav Fischer 1906; 1-194.

Renart J et al., Transfer of proteins from gels to diabenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure, *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 3116-3120.

Towbin H et al., Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 4350-4354.

Trautwein; W. and K. Zink. Membrane and action potentials of single myocardial fibers of cold and warmblooded animals. *Pflugers Arch* 1952; 64-84.

Tsien R. Y., Rink T. J., Poenie M. Measurement of cytosolic free Ca<sup>2+</sup> in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths. *Cell Calcium* 6 1985; 145–157.

Wang Y, Ashraf M. Activation of alpha1-adrenergic receptor during Ca<sup>2+</sup> preconditioning elicits strong protection against Ca<sup>2+</sup> overload injury via protein kinase C signalling pathway. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 2423-2435

Wessler I., Kirkpatrick C. J. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br. J. Pharmacol* 2008; 154: 1558–1571.

Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol* 2003; 285: H579-H588

## **11. Poster**

A.Westerfeld, R. Schreckenberger, K.-D. Schlüter

Bedeutung cholinergere Rezeptorstimulation während der Ischämie für die postischämische Erholung und das frühe Postinfarktremodeling

76. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung, Mannheim 2010

A.Westerfeld, R. Schreckenberger, K.-D. Schlüter

Bedeutung cholinergere Rezeptorstimulation während der Ischämie für die postischämische Erholung und das frühe Postinfarktremodeling

42. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Wehrmedizin und Wehrpharmazie, Erfurt 2011

## 12. Erklärung zur Dissertation

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

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

### **13. Danksagung**

Im Jahre 2006 wurde ich durch Herrn Professor Dr. K.-D. Schlüter in seine Arbeitsgruppe aufgenommen. Dort konnte ich ein umfangreiches Fachwissen über zellbiologische, molekularbiologische und biochemische Techniken erwerben. Einen großen Verdienst dabei hatten auch Herr Volk und Frau Woitasky, welche mir die wissenschaftlichen Techniken beibrachten und mich bei der Arbeit jederzeit unterstützten. Zu jeder Zeit stand Herr Prof. Dr. K.-D. Schlüter mir bei Fragen und Problemen hilfreich zur Seite. Daher möchte ich mich ausdrücklich bei Herrn Professor Dr. K.-D. Schlüter sowie bei allen Mitarbeitern des Institutes herzlich bedanken.

Einen Dank möchte ich auch an alle richten, die mich im Laufe meiner Arbeit unterstützt haben.